



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

GLICOSILACIÓN COMO MECANISMO DE METÁSTASIS AL CEREBRO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MIGUEL ÁNGEL MAYORAL CHÁVEZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2013.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

GLICOSILACIÓN COMO MECANISMO DE METÁSTASIS AL CEREBRO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MIGUEL ÁNGEL MAYORAL CHÁVEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2013.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

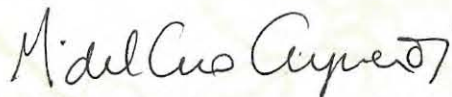
Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 03 de junio de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **MAYORAL CHÁVEZ MIGUEL ÁNGEL** con número de cuenta **505016919** con la tesis titulada "**GLICOSILACIÓN COMO MECANISMO DE METÁSTASIS AL CEREBRO**", realizada bajo la dirección del **DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA**:

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal: DR. JORGE MELENDEZ ZAJGLA
Secretario: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO
Suplente: M. EN. C. ÓSCAR ARRIETA RODRÍGUEZ
Suplente: DR. ARMANDO PÉREZ TORRES

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud del alumno, **con cinco sinodales**, con base en lo establecido en el Artículo 31 y acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, del Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de agosto de 2013



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Son innumerables las personas a quienes debo agradecer la culminación de este trabajo. En especial, le agradezco:

A mi tutor, Dr. M. Á. Jorge Guevara Fonseca. Por su apoyo, por compartir sus conocimientos, su tiempo y amistad en el desarrollo de mis formación; además de innumerables ocasiones de deliciosos y anecdóticos momentos al lado de su bella familia.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Edgar Zenteno Galindo, por impulsar mi superación, dedicar mucho tiempo a aclarar y discutir ideas, y compartir sus vastos conocimientos; es un ejemplo a seguir y estaré en deuda eterna por su invaluable apoyo y atenciones; por su paciencia ante mis necesidades. Y al Dr. Luis Felipe Jiménez García, que durante toda mi formación Doctoral estuvo atento a mi desempeño y siempre extendió su mano para apoyarme e instruirme, fue todo un honor tenerle como asesor y profesor. A ambos, mi respeto y admiración.

A los integrantes del jurado de candidatura: Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, Dr. Emilio Rojas del Castillo, Dr. Jorge Meléndez Zajgla, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, y Dr. Luis Felipe Jiménez García. Sus comentarios inspiraron la culminación de este trabajo.

A los integrantes del jurado de examen de Grado: Dr. Jorge Meléndez Zajgla, Dr. Armando Pérez Torres, Dr. Oscar Arrieta Rodríguez, Dr. Luis Felipe Jiménez García y Dr. Edgar Zenteno Galindo, quienes apoyaron de forma importante mi preparación para el paso final.

Al Dr. Ricardo Lascurain, por las facilidades que me otorgó para iniciar mi adiestramiento en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Por sus acertados comentarios y críticas a mi proyecto Doctoral.

Al Departamento de Neuropatología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", por las facilidades para obtener tejido para este proyecto. Especialmente, al Dr. Daniel Rembao Bojórquez, Jefe del Departamento, por compartir siempre de manera incondicional sus valiosos conocimientos científicos y en anatomía patológica, su tiempo, amistad y entusiasmo. Al Dr. Citlaltepeltl Salinas, por aclarar mis ideas, compartir su amistad y su tiempo.

A quienes dieron las facilidades para la obtención de tejidos: al departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología, particularmente al Dr. Abelardo Meneses; al Servicio de Cirugía Plástica y Reconstructiva del Hospital General "Dr. Manuel Gea González", en particular al Dr. César Mayoral; y a la opción técnica en histopatología de la Escuela Nacional Preparatoria de la UNAM, en particular a la Dra. Aída Gabriela Guzmán y al Dr. Leonardo Villalvazo.

A aquellos profesores que me dieron la honrosa oportunidad de establecer contacto a través de la red de internet, respondieron dudas e hicieron importantes comentarios, e incluso me proporcionaron valiosos artículos de su autoría para enriquecer mis conocimientos y fundamentar mis investigaciones: Dr. Policarp Hortolà, Dr. Ajit Varki, Dr. Joe Tiralongo, Dr. Jan Hofsteenge, Dr. Nathan Sharon (QPD), Dr. Fernando Irazoki, Dra. Marie-Agnès Doucey, Dr. Michael Gröschl, Dr. David Lyden, Dr. Joaquín Arribas, Dr. James Rini, Dr. Thorkild Bøg-Hansen, Dr. Jeri Jenkins, Dr. Lu-Gang Yu, Dr. Herwing M. Strik, Dr. Peter Schledermann Walmod.

A mis compañeros del laboratorio: C a Dra. Minerva Calvillo, Dra. Juanita Villeda, Samuel Estrada, Dra. Aída Guzmán, Mtra. Natyelli García, Dra. Elvis Y. Cuevas, C a Dra. Karla C. Rojas Saavedra, con quienes exploré la maravillosa experiencia de la ciencia.

Al Dr. Daniel I. Limón, un investigador ejemplar, un hombre de ciencia y amigo invaluable. Tuve la oportunidad de compartir gratos momentos y sus conocimientos con siempre valiosos y atinados comentarios. Su labor en pro de la investigación y el avance en el conocimiento científico es ejemplar. Mi respeto y admiración.

Al personal del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, que fueron una mano cálida extendida en todo momento, apoyando, resolviendo y atendiendo mis inquietudes con todo respeto, amabilidad y cordialidad, en especial al Dr. Ernesto A. Rodríguez Reyes, a Erika Rodríguez Reyes, a la MVZ. Rocío Chávez Trejo, a Lilia Jiménez Solís, y a Lilia Judith Espinosa Sánchez.

A mis padres, César Mayoral Figueroa y Rosa Martha Chávez, quienes han sido siempre un ejemplo inalcanzable a seguir, una inspiración y motivación para superarme, por su apoyo, impulso y amor. Espero algún día ser al menos la mitad de lo que son ustedes.

A mi hermano César, mi amigo, mi aliado, por su apoyo y atenciones, compartiendo muchas horas de interesantes conversaciones y siempre dándome ánimo para no detenerme. A su esposa Perla, por sus atenciones durante mi larga y frecuente estancia en la Ciudad de México. A mis hermanas Pau, Rosi y Pati, que en todo momento dieron muestras de apoyo y ánimo para seguir adelante. Por su enorme cariño.

A mi amada esposa Mireya y mis adorados hijos Karla, Dulce y Miguel, por su amoroso apoyo al soportar todos estos años que me obligaron a abandonarles por mucho tiempo, intentando alcanzar un sueño, para que los sueños de ellos se puedan realizar. Por su paciencia y comprensión frente a muchas ocasiones de desesperación (y la enorme pila de artículos y libros que acumulé obsesiva y desordenadamente para leer). Ustedes han sido el más fuerte impulso para no rendirme y seguir adelante. Por su enorme amor, dedico esta tesis a ustedes.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, por haber dado todas las facilidades para desarrollar la parte experimental en el Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas.

A la Facultad de Ciencias y la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT: 188807) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por las becas y apoyo que otorgaron para mi formación Doctoral.

Este trabajo fue en parte apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (G3859ON, 61205, 0129932 y 113815); ECOSM09S02 (CONACyT 189453); Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), PAPIIT-UNAM (IN224011); PAPIIT IN206814 y el Programa Universitario de Epidemiología, Genómica y Proteómica (SDEI.PTID.05.2), Universidad Nacional Autónoma de México.

A mis adorados Karla, Dulce y Migue

Parte de este trabajo fue publicado y presentado como conferencia oral o cartel:

- **Miguel Ángel Mayoral Chávez**, Edgar Zenteno Galindo, Blanca Espinosa Mancilla, Salvador Martínez-Cairo, Jorge Guevara Fonseca. Enfoques moleculares de la metástasis tumoral. *REB* 2004; 23 (3): 117-122 (ISSN: 1665-1995)
- **Miguel Ángel Mayoral Chávez**, Edgar Zenteno Galindo, Blanca Espinosa Mancilla, Salvador Martínez Cairo, Jorge Guevara Fonseca. Perspectiva monográfica del cáncer pulmonar: un enfoque molecular y la metástasis al cerebro. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2004, 17 (4): 283-292 (ISSN: 01877585)
- Presentación **oral**: “Patrones de expresión de antígenos glicosilados en tumores metastásicos cerebrales diversos: significado biológico y su asociación clínico-patológica” en la XX Reunión de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, México, D. F., México. Mayo 19 y 20 de 2005.
- Presentación como **cartel**: “Glycosylation in brain metastasis”, en el XVIII Simposio Internacional en Glicoconjugados, Florencia, Italia. Septiembre 4 al 9 de 2005.
- **Mayoral M**, Mayoral P, Espinosa B, Vazquez L, Zenteno E, Rembao D, Guevara J. Glycosylation in brian metastasis. *Glycoconjugate J*, july 2005; 22 (4/5/6): 318 (P27)
- Presentación como **cartel**: “Patrones de expresión diferencial de ácidos siálicos en tejidos sanos, tumorales primarios y metastásicos al cerebro humano de diverso origen” en la XXI Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” de la Ciudad de México, D. F., México. Mayo 18 y 19 de 2006.
- Presentación como **cartel**: “Expresión de estructuras O-glicosídicas de tipo mucínico en tejidos sanos, tumorales primarios y metastásicos al cerebro humanos y su participación en la metástasis” en la XXI Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” de la Ciudad de México, D. F., México. Mayo 18 y 19 de 2006.
- Presentación como **cartel**: “Expresión de NCAM-PSA en la metástasis al cerebro” en la XXI Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” de la Ciudad de México, D. F., México. Mayo 18 y 19 de 2006.
- Presentación como **cartel**: “Identificación de estructuras O-glicosídicas de tipo mucínico en metástasis en cerebro” en el XXVI Congreso Nacional de Bioquímica, Guanajuato, Gto, México. Noviembre 12 al 17 de 2006.
- Presentación **oral**: “Glicosilación de tumores metastásicos cerebrales y sus primarios” en el IV Congreso Anual del Centro de Investigación en Ciencias Médicas y Biológicas de la Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca. Oaxaca, Oax., abril 27 de 2007.
- Presentación como **cartel**: “Role of Galectin-3 and mucin-type O-glycans in breast cancer and its metastasis to brain” en la Glycobiology Boston Conference, Boston, MA., EUA. Noviembre 11 al 17 de 2007.
- Presentación como **cartel**: Identificación de estructuras O-glicosídicas de tipo mucínico asociadas a la expresión de galectina-3 en tumores de origen mamario y su metástasis al cerebro. XXIII Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” de la Ciudad de México, D. F., Mayo 22 y 23 de 2008.

- **Mayoral MA**, Mayoral C, Meneses A, Villalvazo L, Guzmán A, Espinosa B, Ochoa JL, Zenteno E, Guevara J. Identification of Galectin-3 and Mucin-type O-glycans in breast cancer and its metastasis to brain. *Cancer Investigation* 2008; 26: 615-623. (ISSN: 1532-4192)
- Presentación como **ponencia oral**: O-glicosilación tipo mucínica asociada a galectina-3 en el cáncer. I Encuentro de glicobiología. Oaxaca, Oax., Agosto 6 y 7 de 2010
- Presentación como **cartel**: "Sialic acid expression in human ductal breast tumor and its brain metastasis" en la 2008 Annual Meeting of the Society for Glycobiology, Fort Worth, Texas, EUA. Noviembre 12 al 15 de 2008.
- Presentación como **ponencia oral**: Sialilación en la metástasis cerebral. 1^{er} Congreso Latinoamericano de Glicobiología. Oaxaca, Oax., México Agosto 4 de 2011
- Presentación como **cartel**: Análisis de la presencia de ácido siálico en metástasis cerebrales de origen mamario. XXIX Congreso Nacional de Bioquímica. Oaxaca, Oax., 11 al 17 de noviembre de 2012.

Índice General

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 2: GLICOBIOLOGÍA	8
2.1. LAS FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LOS CARBOHIDRATOS	8
2.2. FORMACIÓN DE COMPLEJOS CON CARBOHIDRATOS: GLICOSILACIÓN	11
CAPÍTULO 3: EL ÁCIDO SIÁLICO	15
CAPÍTULO 4: LAS LECTINAS	18
4.1. DEFINICIÓN E HISTORIA	18
4.2. LECTINAS EN EL ESTUDIO DEL CÁNCER	21
CAPÍTULO 5: GLICOSILACIÓN, CÁNCER Y METÁSTASIS	23
CAPÍTULO 6: MOLÉCULAS DE ADHESIÓN, CÁNCER Y METÁSTASIS	29
6.1. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR	29
6.2. LAS CADHERINAS	31
6.2.1. NCAM Y SU FORMA POLISIALILADA (PSA-NCAM)	32
CAPÍTULO 7: LECTINAS, CÁNCER PRIMARIO Y METÁSTASIS	40
CAPÍTULO 8: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS GENERAL Y PARTICULARES	41
CAPÍTULO 9: MATERIALES	42
9.1. MUESTRAS HISTOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS	42
9.2. LECTINAS	42
9.3. ANTICUERPOS	43
CAPÍTULO 10: MÉTODOS	45
10.1. FIJADO E INCLUSIÓN DE LAS MUESTRAS EN PARAFINA	45
10.2. TÉCNICA BÁSICA DE HEMATOXILINA Y EOSINA	45
10.3. HISTOQUÍMICA CON LECTINAS PARA MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO	45
10.4. HISTOQUÍMICA CON LECTINAS PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	46
10.5. INMUNOHISTOQUÍMICA DE TRIPLE MARCA PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	47
10.6. ESPECIFICIDAD DE LA INTERACCIÓN LECTÍNICA	47
10.7. ENSAYOS ENZIMÁTICOS CON SIALIDASA Y TRIPSINA	48
10.8. MICROSCOPIA DE LUZ DE CAMPO CLARO	48
10.9. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	48
CAPÍTULO 11: RESULTADOS	50
11.1. HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS	50
11.1.1. HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS EN CEREBRO SANO	51
11.1.2. HISTOQUÍMICAS CON LECTINA <i>AMARANTHUS LEUCOCARPUS</i>	51
11.1.2.1. ÓRGANOS SANOS	51
11.1.2.1.1. MAMA	51
11.1.2.1.2. TIROIDES	52
11.1.2.1.3. RIÑÓN	52

11.1.2.1.4. PIEL	52
11.1.2.2. CARCINOMAS PRIMARIOS	53
11.1.2.2.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	53
11.1.2.2.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	53
11.1.2.2.3. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	53
11.1.2.2.4. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	54
11.1.2.2.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	54
11.1.2.3. METÁSTASIS A CEREBRO	54
11.1.2.3.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	54
11.1.2.3.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	55
11.1.2.3.3. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	55
11.1.2.3.4. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	56
11.1.2.3.4. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	56
11.1.3. HISTOQUÍMICAS CON LECTINA <i>ARACHIS HYPOGAEA</i>	58
11.1.3.1. ÓRGANOS SANOS	58
11.1.3.1.1. MAMA	58
11.1.3.1.2. TIROIDES	58
11.1.3.1.3. RIÑÓN	58
11.1.3.1.4. PIEL	58
11.1.3.2. CARCINOMAS PRIMARIOS	58
11.1.3.2.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	58
11.1.3.2.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	59
11.1.3.2.3. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	59
11.1.3.2.4. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	59
11.1.3.2.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	59
11.1.3.3. METÁSTASIS A CEREBRO	59
11.1.3.3.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	59
11.1.3.3.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	60
11.1.3.3.3. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	60
11.1.3.3.4. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	60
11.1.3.3.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	60
11.1.4. HISTOQUÍMICAS CON LECTINA <i>MACHAEROCEREUS ERUCA</i>	62
11.1.4.1. ÓRGANOS SANOS	62
11.1.4.1.1. MAMA	62
11.1.4.1.2. TIROIDES	62
11.1.4.1.3. RIÑÓN	62
11.1.4.1.4. PIEL	62
11.1.4.2. CARCINOMAS PRIMARIOS	62
11.1.4.2.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	62
11.1.4.2.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	63
11.1.4.2.3. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	63
11.1.4.2.4. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	63
11.1.4.2.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	63
11.1.4.3. METÁSTASIS A CEREBRO	63
11.1.4.3.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	63
11.1.4.3.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	64
11.1.4.3.3. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	64
11.1.4.3.4. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	64
11.1.4.3.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	64
11.1.5. HISTOQUÍMICAS CON LECTINA <i>LIMULUS POLYPHEMUS</i>	66
11.1.5.1. ÓRGANOS SANOS	66
11.1.5.1.1. MAMA	66
11.1.5.1.2. TIROIDES	66
11.1.5.1.3. RIÑÓN	66
11.1.5.1.4. PIEL	66
11.1.5.2. CARCINOMAS PRIMARIOS	66
11.1.5.2.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	67
11.1.5.2.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	67
11.1.5.2.3. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	67

11.1.5.2.4. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	67
11.1.5.2.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	67
11.1.5.3. METÁSTASIS A CEREBRO	68
11.1.5.3.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	68
11.1.5.3.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	68
11.1.5.3.3. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	68
11.1.5.3.4. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	68
11.1.5.3.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	68
11.1.6. HISTOQUÍMICAS CON LECTINA <i>MAACKIA AMURENSIS</i>	71
11.1.6.1. ÓRGANOS SANOS	71
11.1.6.1.1. MAMA	71
11.1.6.1.2. TIROIDES	71
11.1.6.1.3. RIÑÓN	71
11.1.6.1.4. PIEL	71
11.1.6.2. CARCINOMAS PRIMARIOS	72
11.1.6.2.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	72
11.1.6.2.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	72
11.1.6.2.3. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	72
11.1.6.2.4. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	72
11.1.6.2.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	72
11.1.6.3. METÁSTASIS A CEREBRO	73
11.1.6.3.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	73
11.1.6.3.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	73
11.1.6.3.3. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	73
11.1.6.3.4. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	73
11.1.6.3.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	73
11.1.7. HISTOQUÍMICAS CON LECTINA <i>SAMBUCUS NIGRA</i>	75
11.1.7.1. ÓRGANOS SANOS	75
11.1.7.1.1. MAMA	75
11.1.7.1.2. TIROIDES	75
11.1.7.1.3. RIÑÓN	75
11.1.7.1.4. PIEL	75
11.1.7.2. CARCINOMAS PRIMARIOS	75
11.1.7.2.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	75
11.1.7.2.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	76
11.1.7.2.3. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	76
11.1.7.2.4. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	76
11.1.7.2.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	76
11.1.7.3. METÁSTASIS A CEREBRO	77
11.1.7.3.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	77
11.1.7.3.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	77
11.1.7.3.3. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	77
11.1.7.3.4. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	77
11.1.7.3.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	78
11.1.8. HISTOQUÍMICAS CON LECTINA <i>MACROBRACHIUM ROSENBERGII</i>	80
11.1.8.1. ÓRGANOS SANOS	80
11.1.8.1.1. MAMA	80
11.1.8.1.2. TIROIDES	80
11.1.8.1.3. RIÑÓN	80
11.1.8.1.4. PIEL	80
11.1.8.2. CARCINOMAS PRIMARIOS	80
11.1.8.2.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	80
11.1.8.2.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	80
11.1.8.2.3. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	80
11.1.8.2.4. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	80
11.1.8.2.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	81
11.1.8.3. METÁSTASIS A CEREBRO	81
11.1.8.3.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	81
11.1.8.3.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	81

11.1.8.3.3. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	81
11.1.8.3.4. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	82
11.1.8.3.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	82
11.1.9. HISTOQUÍMICAS CON LECTINA CONCAVALINA A	84
11.1.9.1. ÓRGANOS SANOS	84
11.1.9.1.1. MAMA	84
11.1.9.1.2. TIROIDES	84
11.1.9.1.3. RIÑÓN	84
11.1.9.1.4. PIEL	84
11.1.9.2. CARCINOMAS PRIMARIOS	85
11.1.9.2.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	85
11.1.9.2.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	85
11.1.9.2.3. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	85
11.1.9.2.4. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	85
11.1.9.2.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	85
11.1.9.3. METÁSTASIS A CEREBRO	86
11.1.9.3.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	86
11.1.9.3.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	86
11.1.9.3.3. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	86
11.1.9.3.4. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	87
11.1.9.3.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	87
11.1.10. HISTOQUÍMICAS CON LECTINA LENS CULINARIS	89
11.1.10.1. ÓRGANOS SANOS	89
11.1.10.1.1. MAMA	89
11.1.10.1.2. TIROIDES	89
11.1.10.1.3. RIÑÓN	89
11.1.10.1.4. PIEL	89
11.1.10.2. CARCINOMAS PRIMARIOS	89
11.1.10.2.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	90
11.1.10.2.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	90
11.1.10.2.3. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	90
11.1.10.2.4. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	90
11.1.10.2.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	90
11.1.10.3. METÁSTASIS A CEREBRO	91
11.1.10.3.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	91
11.1.10.3.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	91
11.1.10.3.3. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	91
11.1.10.3.4. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	92
11.1.10.3.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	92
11.1.11. HISTOQUÍMICAS CON LECTINA LOTUS TETRAGONOLOBUS	94
11.1.11.1. ÓRGANOS SANOS	94
11.1.11.1.1. MAMA	94
11.1.11.1.2. TIROIDES	94
11.1.11.1.3. RIÑÓN	94
11.1.11.1.4. PIEL	94
11.1.11.2. CARCINOMAS PRIMARIOS	94
11.1.11.2.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	94
11.1.11.2.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	94
11.1.11.2.3. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	94
11.1.11.2.4. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	94
11.1.11.2.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	95
11.1.11.3. METÁSTASIS A CEREBRO	95
11.1.11.3.1. ADENOCARCINOMA CANALICULAR DE MAMA	95
11.1.11.3.2. ADENOCARCINOMA PULMONAR	95
11.1.11.3.3. ADENOCARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	95
11.1.11.3.4. ADENOCARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES	96
11.1.11.3.5. MELANOMA CUTÁNEO MALIGNO	96
11.2. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS (SIALIDASA Y TRIPSINA)	98
11.3. INMUNOHISTOQUÍMICAS CON ANTICUERPOS	101

11.3.1. GFAP EN METÁSTASIS A CEREBRO	101
11.3.2. SINAPTOFISINA EN METÁSTASIS A CEREBRO	101
11.3.3. NCAM EN ÓRGANOS SANOS, EN CARCINOMAS PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS A CEREBRO	102
11.3.4. PSA-NCAM EN ÓRGANOS SANOS, EN CARCINOMAS PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS A CEREBRO	103
CAPÍTULO 12: DISCUSIÓN	106
CAPÍTULO 13: CONCLUSIONES	130
CAPÍTULO 14: PERSPECTIVAS	132
BIBLIOGRAFÍA	133
ANEXOS	157

Índice de figuras

FIGURA 1: EJEMPLOS DE GLICOCONJUGADOS	9
FIGURA 2: ALGUNAS FUNCIONES DE LOS GLICOCONJUGADOS	11
FIGURA 3: TIPOS DE GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS (N-, O-, Y C-) EN EUKARIONTES	12
FIGURA 4: LOS ÁCIDOS SIÁLICOS. ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD	16
FIGURA 5: ESQUEMA DE LAS PRINCIPALES INTERACCIONES HETEROFÍLICAS DE NCAM	34
FIGURA 6: ESQUEMA DE LA VIA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR NCAM	35
FIGURA 7: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE PSA-NCAM	36
FIGURA 8: ESTRUCTURA Y UNIÓN DEL ÁCIDO POLISIÁLICO A LA NCAM	37
FIGURA 9: HISTOQUÍMICA CON LECTINAS PARA MICROSCOPIA DE LUZ DE CAMPO CLARO EN CEREBRO SANO HUMANO	51
FIGURA 10: HISTOQUÍMICA CON LECTINA ALL EN ÓRGANOS SANOS, EN CARCINOMAS PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS A CEREBRO	57
FIGURA 11: HISTOQUÍMICA CON LECTINA PNA EN ÓRGANOS SANOS, EN CARCINOMAS PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS A CEREBRO	61
FIGURA 12: HISTOQUÍMICA CON LECTINA MEA EN ÓRGANOS SANOS, EN CARCINOMAS PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS A CEREBRO	65
FIGURA 13: HISTOQUÍMICA CON LECTINA LPA EN ÓRGANOS SANOS, EN CARCINOMAS PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS A CEREBRO	70
FIGURA 14: HISTOQUÍMICA CON LECTINA MAA EN ÓRGANOS SANOS, EN CARCINOMAS PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS A CEREBRO	74
FIGURA 15: HISTOQUÍMICA CON LECTINA SNA EN ÓRGANOS SANOS, EN CARCINOMAS PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS A CEREBRO	79
FIGURA 16: HISTOQUÍMICA CON LECTINA MRL EN ÓRGANOS SANOS, EN CARCINOMAS PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS A CEREBRO	83
FIGURA 17: HISTOQUÍMICA CON LECTINA CON-A EN ÓRGANOS SANOS, EN CARCINOMAS PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS A CEREBRO	88
FIGURA 18: HISTOQUÍMICA CON LECTINA LCH EN ÓRGANOS SANOS, EN CARCINOMAS PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS A CEREBRO	93
FIGURA 19: HISTOQUÍMICA CON LECTINA LTA EN ÓRGANOS SANOS, EN CARCINOMAS PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS A CEREBRO	97
FIGURA 20: TRATAMIENTO CON SIALIDASA DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGES</i> EN METÁSTASIS A CEREBRO DE ORIGEN MAMARIO	99
FIGURA 21: TRATAMIENTO CON TRIPSINA EN METÁSTASIS A CEREBRO DE ORIGEN MAMARIO	100
FIGURA 22: INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTICUERPO ANTI-GFAP EN METÁSTASIS A CEREBRO	101
FIGURA 23: INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTICUERPO ANTI-SINAPTOFISINA EN METÁSTASIS A CEREBRO	102
FIGURA 24: INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTICUERPO ANTI-NCAM EN METÁSTASIS A CEREBRO	103
FIGURA 25: INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTICUERPO ANTI-PSA-NCAM EN METÁSTASIS A CEREBRO	104
FIGURA 26: POSIBLES RUTAS A TRAVÉS DE LAS CUÁLES OBSERVAMOS ESTRUCTURAS O-GLICOSÍDICAS DE TIPO MUCÍNICO	121
FIGURA 27: BIOSÍNTESIS DE ESTRUCTURAS O-GLICOSÍDICAS TIPO MUCÍNICO TEMPRANAS Y TARDÍAS	122

Índice de tablas y gráficas

TABLA 1: LECTINAS EMPLEADAS EN EL PROYECTO	43
TABLA 2: ANTICUERPOS PRIMARIOS EMPLEADOS EN EL PROYECTO	43
TABLA 3: ANTICUERPOS SECUNDARIOS EMPLEADOS EN EL PROYECTO	44
TABLA 4: REACTIVIDAD DE ANTÍGENOS GFAP, SINAPTOFISINA, NCAM Y PSA-NCAM	105
GRÁFICA 1: PRUEBA ESTADÍSTICA DE MANN-WHITNEY A CARCINOMAS CANALICULARES DE MAMA	123

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Aparato de Golgi
ALL	Lectina <i>Amaranthus leucocarpus</i>
Ara	Arabinosa
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
BSA	Albúmina bovina sérica
CAMs	Moléculas de adhesión
CEC	Electrocromatografía capilar
CMP	Citidin-mono-fosfato
Con-A	Lectina <i>Concanavalina A</i>
COOH	Carboxilo
CRD	Dominio de reconocimiento a carbohidratos
Cys	Cisteína
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GD3	Gangliósido GD3
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
Glc	Glucosa
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
HIF	Factor inducible de hipoxia
HPAE	Cromatografía de intercambio aniónico
HPLC	Cromatografía de alta densidad líquida
I.N.N.N.	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
Ile	Isoleucina
Lac	Lactosa
LacNAc	<i>N</i> -Acetilactosamina
LcH	Lectina <i>Lens culinaris</i>
Le	Antígeno Lewis
Le ^a	Antígeno Lewis a
Leu	Leucina
Le ^x	Antígeno Lewis x
LFA-2	Antígeno funcional leucocitario-2
LFA-3	Antígeno funcional leucocitario-3
LPA	Lectina <i>Limulus polyphemus</i>
LTA	Lectina <i>Lotus tetragonolobus</i>
MAA	Lectina <i>Maackia amurensis</i>
MadCAM	Molécula de adhesión celular de mucosas

MAG	Glicoproteína asociada a mielina
Man	Manosa
MeA	Lectina <i>Machaerocereus eruca</i>
Met	Metionina
MgAT5	Manosido acetil glucosaminil transferasa
MRL	Lectina <i>Macrobrachium rosenbergii</i>
MS	Espectrometría de masa
NADPH	Nicotinamida adenosin dinucleótido reducido
NCAM	Molécula de adhesión celular neural
NeuNAc	Ácido N-acetilneuramínico
NF-κB	Factor de transcripción nuclear κB
OH-	Oxidril
PBS	Amortiguador de fosfatos-salino
PE-CAM	Molécula de adhesión celular plaqueta-endotelio
Phe	Fenilalanina
PNA	Lectina <i>Arachis hypogaea</i>
ppGalNAcTs	Polipéptido-GalNAc transferasas
Pro	Prolina
PSA	Ácido polisiálico
PSA-NCAM	Molécula de adhesión celular neural polisialilada
RE	Retículo endoplásmico
S.S.A.	Secretaría de Salubridad y Asistencia
Ser	Serina
Sia	Ácido siálico
SLe ^a	Antígeno sialil Lewis a
SLe ^x	Antígeno sialil Lewis x
SNA	Lectina <i>Sambucus nigra</i>
T	Antígeno <i>T</i> (disacárido Galβ1,3GalNAcα1,0-Ser/Thr)
TF	Antígeno de <i>Thomsen Friedenreich</i>
Thr	Treonina
Tn	Antígeno <i>Tn</i> (GalNAcα1-ol)
Trp	Triptófano
U.N.A.M.	Universidad Nacional Autónoma de México
UDP	Uridin-di-fosfato
Val	Valina
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
Xyl	Xilosa

Resumen

La metástasis es la principal y más grave complicación del cáncer. Las interacciones celulares son uno de los diversos factores que median la metástasis. En estas interacciones celulares, los glicoconjugados desempeñan un papel clave para generar una serie de procesos que culminan con la liberación celular tumoral, la evasión del reconocimiento inmunológico, la resistencia a la muerte celular y la implantación celular a distancia en sitios secundarios. Mediante histoquímicas con lectinas con especificidad a *N*- y *O*-glicanos (*Amaranthus leucocarpus*, *Arachis hypogaea*, *Machaecereus eruca*, *Limulus polyphemus*, *Maackia amurensis*, *Sambucus nigra*, *Macrobrachium rosenbergii*, *Lens culinaris*, Concanavalina A, y *Lotus tetragonolobus*) realizamos la identificación de residuos glicosilados en órganos humanos sanos, carcinomas primarios, y metástasis a cerebro. A través de inmunohistoquímicas con anticuerpos identificamos la participación de moléculas de adhesión celular neural sola (NCAM) y en su forma polisialilada (PSA-NCAM), ambas íntimamente relacionadas con la progresión tumoral y la regeneración celular. Finalmente identificamos la participación de glicoproteínas en los eventos tumorales metastásicos a través de ensayos enzimáticos.

Nuestros resultados demuestran que existe un decremento en la sialilación y un incremento en la presencia de residuos *O*-glicosídicos de tipo mucínico en los estadios metastásicos. A la par, de los ácidos siálicos presentes, evidenciamos la participación del ácido polisiálico en las metástasis de manera importante. Los resultados obtenidos sugieren que puede existir un mecanismo de sobre-regulación en la biosíntesis de *O*-glicanos de tipo mucínico y ácido polisiálico para la progresión tumoral y la metástasis.

Palabras clave: Metástasis, *O*-glicosilación, ácido siálico, ácido polisiálico, NCAM, lectinas.

Abstract

Metastasis is the main and more serious complication in cancer. Cellular interactions are one of several factors that mediate metastasis. From these cell interactions, glycoconjugates play a key role to generate a series of processes that culminate with tumor cell freedom, cell protection against immune recognition, resistance to cell death, and distant secondary sites of cell implantation. By histochemistry with *N*- and *O*-specific lectins (*Amaranthus leucocarpus*, *Arachis hypogaea*, *Machaeocereus eruca*, *Limulus polyphemus*, *Maackia amurensis*, *Sambucus nigra*, *Macrobrachium rosenbergii*, *Lens culinaris*, Concanavalina A, and *Lotus tetragonolobus*) we identify glycosylated residues in healthy, primary tumor, and brain metastatic human tumors. By immunohistochemistry with antibodies we identify single neural cell adhesion molecules (NCAM) as in a polysialylated form (PSA-NCAM), both strongly related with tumor progression and cell regeneration. Finally we identify the presence of glycoproteins in metastatic tumor events through enzyme assays. Our results demonstrate that there are a decrease sialylation and an increase in the presence of *O*-linked mucin-type glycans in metastatic stages. At the same time, from the sialic acids presents, we importantly evidence the role of polysialic acid in metastatic stages. These results strongly suggest an upregulated biosynthesis of *O*-glycans and polysialic acid to favor tumor progression and metastasis.

Key words: Metastasis, *O*-glycosylation, sialic acid, polysialic acid, NCAM, lectins.

CAPÍTULO 1

Introducción

El cáncer representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, siendo una de las principales causas de muerte¹. Las estadísticas muestran que 1 de cada 3 americanos desarrollará algún tipo de cáncer a lo largo de su vida². En México, las estadísticas más recientes muestran que la tasa de defunción por cáncer de mama en mujeres en 2005 fue de 7.9/100 mil mujeres, con 4,220 muertes, lo que representa el 1.9% de en ese año³. En 2006, de cada 100 egresos hospitalarios de mujeres, 20 fueron por cáncer de mama, 13 por cáncer de cérvix y 12 por leucemias; en el mismo año, de hombres, 19 de cada 100 fueron por leucemias, 8 por cáncer de próstata y 6 por cáncer de tráquea, bronquios y pulmón. En 2007, el cáncer representó la tercera causa de muerte entre mujeres con 35,303 defunciones (15.4%), mientras que en los hombres fue la cuarta con 33,509 muertes (11.8%)⁴. Las estadísticas mas actuales en nuestro país estiman que hay entre 50 y 80 casos por cada 100,000 habitantes, siendo la población mayor de 30 años de edad la mas propensa⁵. Se considera como un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento y diseminación celular descontrolados. Las causas de transformación celular maligna y metástasis son multifactoriales tal como alteraciones fenotípicas⁶, genotípicas⁷ y epigenéticas^{8,9}, decremento en la inhibición dependiente de la densidad del crecimiento celular, decremento en los requerimientos de factores de crecimiento¹⁰, pérdida en la dependencia de anclaje celular¹¹, pérdida del control del ciclo celular¹² y resistencia a la apoptosis¹³, cambios en la estructura y función de la membrana celular como el aglutinamiento de células transformadas, hipertermia¹⁴, y alteraciones de la glicosilación¹⁵, entre otros¹⁶.

Una de las más graves complicaciones del cáncer, y principal causa de muerte es la metástasis, siendo considerada el fenotipo letal del cáncer¹⁷. Metástasis es el término que se refiere a la transferencia de células tumorales desde un órgano o parte de él, hacia otro no necesariamente relacionado por contigüidad. Se trata de un proceso complejo de liberación y

transporte celular tumoral a sitios secundarios a través de diversas vías siendo las más frecuentes la linfática¹⁸, y la circulatoria¹⁹, aunque existen otras vías de diseminación²⁰. En general, los carcinomas son los que con mayor frecuencia invaden y se diseminan a través de la vía linfática. Una vez que las masas tumorales han alcanzado un vaso linfático, embolizan y forman nódulos²¹. En el caso de la diseminación hematogena, ésta puede ocurrir tanto a través de plexos venosos como arteriales, siendo los últimos los principalmente implicados²². Se sabe desde hace algunos años que las interacciones que se establecen entre las células cancerosas y la microvasculatura son un paso regulador de la metástasis²³. Los sarcomas son los que con mayor frecuencia se diseminan y metastatizan a través de la vía hematogena. Sin embargo, las células tumorales infiltran los tejidos vecinos y las matrices en forma diversa. Se pueden diseminar en forma de células aisladas individuales, patrón definido como “migración celular individual”, o en forma de masas sólidas, cadenas o agrupaciones celulares, llamado “migración colectiva”²⁴. En muchos tipos tumorales, ambas formas de diseminación se presentan simultáneamente. Las leucemias, los linfomas y la mayor parte de los tumores sólidos como los sarcomas, se diseminan en forma de células aisladas. Los tumores epiteliales comúnmente usan la migración colectiva. En algunas ocasiones se ha descrito la diseminación trans-tisular, en la que no median vasos sanguíneos ni linfáticos su diseminación. Ésta diseminación a través de tejidos se ha descrito fundamentalmente en tumores de cabeza y cuello que pueden dar lugar a metástasis del sistema nervioso central²⁵. La diseminación a través de los espacios tisulares (intercelular) es la que se observa inicialmente durante la diseminación tumoral. La pérdida de la adhesión célula-célula y la aparición de facultades locomotoras, generan esta primera ruta de metástasis. Puede ocurrir una diseminación celular tumoral a través de espacios celómicos, es decir, cavidades corporales (e.g. pericardio, pleura, peritoneo) o ductos epiteliales (e.g. ductos mamarios, pancreático, biliar) estableciendo en estas últimas rutas, las masas tumorales metastásicas en cavidades corporales. Se diseminan en la cavidad e implantan en órganos vecinos dentro de la misma cavidad. Algo similar ocurre a través del espacio cerebroespinal (el

espacio perivascular de Virchow-Robin, los ventrículos cerebrales, y el canal de la médula espinal)²⁶.

En general, la metástasis posee dos criterios esenciales: una preferencia hacia un órgano o sitio de implantación y un potencial celular metastásico²⁷. El reconocimiento celular que favorece a la metástasis es mediado por diversos factores, entre los que destacan los oligosacáridos de superficie celular que juegan un papel clave debido a que una buena parte de estructuras cuya función es de receptores celulares o ligandos, son glicoconjugados²⁸. Los oligosacáridos interaccionan con moléculas de adhesión y otros ligandos intra- y extracelulares. Las interacciones carbohidrato-ligando producen una serie de eventos que culminan con la liberación celular tumoral, la protección contra el reconocimiento inmunológico y finalmente, la implantación en sitios lejanos de colonias tumorales. Durante el proceso de transferencia de células tumorales, muchas de éstas células son destruidas a través del reconocimiento de antígenos tumorales y de la inducción de la apoptosis como mecanismos tempranos de control de la diseminación tumoral²⁹. Sin embargo, la apoptosis es también un evento común en las masas tumorales, evento que se ha propuesto podría diseminar la carcinogénesis por inoculaciones infectoides de material genético tumoral en células no transformadas, de esta forma, el ADN extracelular o libre circulante presente en plasma sanguíneo podrían reincorporarse a células sanas y transformarlas, a través de un evento denominado “genometástasis”³⁰.

Históricamente, una de las primeras teorías biológicas que intentaron explicar el proceso de la formación metastásica fue propuesta por el cirujano y patólogo británico Sir James Paget (1814-1899) en su famosa hipótesis de “la semilla y el suelo” para una metástasis exitosa en 1889³¹. La semilla representaba a las células cancerosas, y el suelo (fértil) al tejido en el cuál los factores de crecimiento apropiados y la matriz extracelular estaban disponibles para el reconocimiento del receptor celular³². El fenómeno clínico de la existencia preferencial de ciertos órganos para implantar metástasis es tan real hoy en día como cuando Paget lo observó. Por

ejemplo, Everett V. Sugarbaker en 1981 analizó los hallazgos de autopsias sistemáticas y demostró la validez de patrones órgano-específicos de la formación de metástasis en muchos cánceres humanos³³. Mientras Paget sugería que había un mecanismo que involucraba interacciones entre el tumor y el órgano secundario, otros investigadores propusieron la importancia de la circulación en el establecimiento del patrón metastásico. Surgiendo así la hipótesis *mecánica-circulatoria* con James Ewing en 1928³⁴. Ésta hipótesis cobró fuerza en 1953 cuando Dale Rex Coman describió el mecanismo hematógeno de la metástasis³⁵. Ambas hipótesis fueron conceptos pioneros en la investigación del proceso metastásico. Como tributo a ambos investigadores, la Sociedad de Investigación de Metástasis instituyó el premio Paget-Ewing en 1988 para los investigadores que aportaran nuevos conocimientos en el campo. Uno de los primeros galardonados con éste premio, Leonard Weiss, discutió extensamente las discrepancias en las observaciones de Paget con respecto a metástasis de mama³⁶. El principal enfoque de Weiss fue que la metástasis de cáncer de mama no necesariamente tenía un soporte mecánico ni un sustento sólido de semilla y suelo. Si bien las hipótesis pioneras explicaban parte del mecanismo observado en los patrones metastásicos, sin duda no era suficiente: la diseminación celular desde un punto de vista espacio-temporal es específica para el tumor en particular, en cierto grado sin embargo, con mayor significancia desde el punto de vista de especificidad hacia un órgano. En este sentido, la especificidad está relacionada con el reconocimiento y la diseminación dirigida hacia un sitio específico. La mayor parte de los reconocimientos celulares son llevados a cabo a través de carbohidratos.

Los tumores que metastatizan a cerebro tienen un origen múltiple³⁷ y necesitan atravesar la barrera hematoencefálica. Ésta última es considerada como una membrana casi impermeable y altamente selectiva. Difiere en su estructura general de otras membranas vasculares³⁸. Es atravesada por células tumorales mediante la participación de moléculas de adhesión. Algunas de estas moléculas implicadas en este paso son las integrinas, las selectinas^{39,40} y las cadherinas de adhesión celular neural (NCAM) tanto sola como en la forma polisialilada (PSA-NCAM)⁴¹. En

la metástasis al cerebro se desconocen los mecanismos implicados en la implantación después del paso de las células tumorales a través de la barrera hematoencefálica. Se han reportado alteraciones de la glicosilación de las células tumorales, la expresión de receptores glicosilados embrionarios como determinantes de malignidad, proliferación e invasión^{42,43}.

CAPÍTULO 2

Glicobiología

2.1. Las funciones biológicas de los carbohidratos

La glicobiología es la ciencia que estudia los aspectos bioquímicos y biológicos de los carbohidratos, con el propósito de definir la estructura, la biosíntesis y la función biológica de éstos unidos a glicoconjugados y determinar la forma en que estas funciones impactan sobre un organismo vivo^{44,45}. Los carbohidratos son un componente esencial para la vida, tanto por sus propiedades de estructuración y almacenamiento de energía, como por las propiedades de estabilización, reconocimiento, señalización y agentes de comunicación^{46,47}. Las múltiples funciones de los carbohidratos radican en la estabilidad y la diversidad estereoquímica de las uniones glicosídicas^{48,49}. La adhesión de carbohidratos a proteínas, lípidos, y nucleótidos es la más extensa modificación co- y pos-traducciona en células eucariontes⁵⁰ y procariontes⁵¹. Se lleva a cabo a través de un proceso enzimático denominado glicosilación⁵². La glicosilación, al adicionar unidades de carbohidrato a otras moléculas genera glicoconjugados: glicoproteínas, glicolípidos, o gliconucleotidos, cuya porción aglicona es una proteína o un péptido, un lípido, o un nucleótido respectivamente, y la porción glicana es la formada por el o los carbohidratos adicionados^{53,54} (Figura 1). Los glicoconjugados son biopolímeros que, junto con las proteínas y los ácidos nucleicos, son los principales responsables de la transferencia de información entre las células, que es un proceso fundamental para la vida y central para todos los sistemas celulares. Es bien conocido que los complejos glicosídicos en la forma de glicolípidos y glicoproteínas, están presentes adornando las membranas celulares y median una gran cantidad de diversas e importantes funciones biológicas⁵⁵. Los carbohidratos predominantemente encontrados en glicoconjugados humanos incluyen glucosa (Glc), galactosa (Gal), manosa (Man), fucosa (Fuc), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), y el ácido *N*-acetilneuramínico (NeuNAc) llamado también ácido siálico (Sia)⁵⁶.

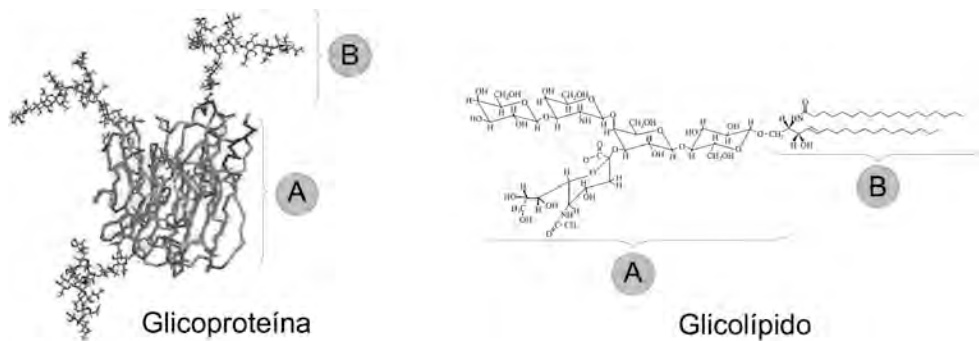


Figura 1. Ejemplos de glicoconjugados. De izquierda a derecha, glicoproteína y glicolípido. A: porciones glicana del glicoconjugado (región de carbohidratos); B: porciones aglicona del glicoconjugado (regiones que corresponden a péptido o proteína, lípido y nucleótido en glicoproteínas y glicolípidos respectivamente).

La función biológica de los carbohidratos depende de muchos factores. Comparado con otros biopolímeros como los ácidos nucleicos, las proteínas y los péptidos, en los que la actividad biológica depende de su secuencia de nucleótidos o residuos de aminoácidos, en el caso de los oligosacáridos la situación es más compleja. Para los oligosacáridos, además de la secuencia de la estructura monomérica, se suman otros aspectos como los grupos funcionales y su estereoquímica, la conformación de los carbohidratos y sus ramificaciones, la formación estereoselectiva de las uniones glicosídicas, el arreglo espacial y tridimensional que guardan las estructuras glicosídicas, el tipo de enlace que establecen, etc., son sólo algunos de los aspectos a considerar⁵⁷.

Por mucho tiempo, se ha asumido que los carbohidratos tienen solamente funciones estructurales y de almacenamiento de energía. Sin embargo, en las últimas décadas, una gran cantidad de glicoconjugados han sido implicados en funciones esenciales en diversos procesos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos⁵⁸. Los carbohidratos participan en importantes eventos de reconocimiento intercelular tanto en procesos celulares normales, como anormales. Un ejemplo de estos eventos es el plegamiento peptídico⁵⁹, la especificidad que confieren a los grupos sanguíneos⁶⁰, el reconocimiento célula-célula⁶¹ y diversos fenómenos de reconocimiento celular^{62,63}, la unión celular esperma-ovocito^{64,65}, la guía del crecimiento celular neuronal^{66,67}, la adhesión de virus^{68,69} y de bacterias⁷⁰ a su huésped, en el que incluso regulan los estados de simbiosis a patogenicidad^{71,72}, la exacerbación de la actividad hormonal⁷³, la señalización apical

en el tráfico biosintético⁷⁴, por sólo nombrar algunas. Más aún, algunos cambios remarcados tienen lugar en carbohidratos de superficie celular que se relacionan con la progresión tumoral, que aparece íntimamente relacionada con la metástasis^{75,76}. La sobreexpresión o pérdida de la regulación de enzimas implicadas en la maquinaria de glicosilación (glicosiltransferasas y glicosidasas) y diversas lectinas está asociada a la expresión de oncogenes y sus productos proteicos⁷⁷. El interés por el estudio de los eventos celulares desde la visión glicobiológica, ha llevado a sugerir que la información que se codifica a través de la presencia específica de residuos de carbohidratos, pueda ser traducida en funciones biológicas⁷⁸. La glicobiología ha encontrado un espacio de acción en la medicina, respondiendo a interrogantes en torno a procesos celulares que sólo se especulaban, y ahora se comprenden mejor⁷⁹. El interés por la glicobiología radica en que los carbohidratos están implicados, directa o indirectamente, en muchos procesos biológicos (Figura 2). Fundamentalmente, debido a que los carbohidratos se encuentran localizados, principalmente, en la superficie celular. Por un lado, los oligosacáridos funcionan como acarreadores de información, debido a su alta posibilidad de combinación cuando se conjugan con otros carbohidratos. Por otro, debido a que las interacciones de afinidad proteína-carbohidrato no son altas y dependen de la multivalencia, ofrecen la posibilidad de crear sistemas específicos de comunicación e interacción, dependientes del tejido, estirpe y circunstancias celulares en particular (e.g. la unión de CD8 al complejo mayor de histocompatibilidad dependiente del tipo de arreglo O-glicano presente⁸⁰, las modificaciones en el patrón glicosídico del transportador de glucosa 2 que promueven la secreción de insulina⁸¹, la regulación condicional del procesamiento glicosídico en el aparato de Golgi que lleva a modificaciones de los receptores a citocinas⁸², etc), más que en sistemas estrictos, además de muchos de ellos irreversibles (e.g. interacciones biotina-streptavidina⁸³).

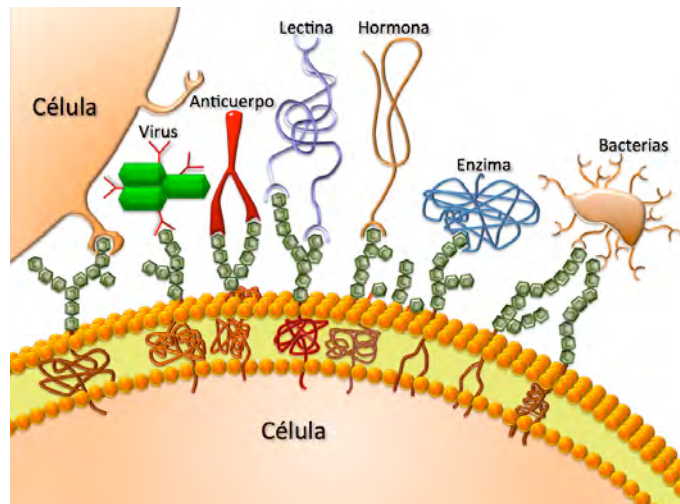


Figura 2. Algunas funciones de los glicoconjugados. Los glicoconjugados ejercen diversas e importantes funciones biológicas a través de la porción glicana. Algunas de las funciones incluyen interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular; comunicación inter- e intracelular; reconocimiento celular; receptores para virus, anticuerpos, lectinas, hormonas, enzimas, bacterias, y como epítopes. Las interacciones de los glicoconjugados se realizan a través de carbohidrato-carbohidrato o carbohidrato-proteína.

2.2. Formación de complejos con carbohidratos: glicosilación.

Muchas de las moléculas clave que participan en reconocimientos antigénicos, presentación y respuestas inmunes adaptativas, señalización, comunicación, etc., son glicoconjugados⁸⁴. Los glicoconjugados tienen diversas funciones, de las que dos destacan principalmente: confieren estabilidad a las proteínas sobre las cuáles se unen, las protegen del ataque proteolítico y de interacciones inespecíficas proteína-proteína por un lado; por el otro, las regiones específicas glicosídicas funcionan como epítopes⁸⁵. Las reacciones de biosíntesis de glicoconjugados ocurren en un amplio espectro filogenético desde *archaea* y eubacterias^{86,87} hasta eucariontes⁸⁸. Las células tienen una efectiva maquinaria de glicosilación que incluye dos grandes familias de enzimas: las glicosiltransferasas y las glicosidasas.

Las glicoproteínas se dividen en tres clases principales (Figura 3): *N*-glicoproteínas, en las que un residuo de GlcNAc une covalentemente su oxhidrilo (OH-) del carbono α -anomérico a la región nitrogenada (*N*-) de residuos de asparagina (Asn) en una secuencia consenso Asn-X-serina (Ser) o treonina (Thr), donde X es cualquier otro residuo de aminoácido, excepto prolina^{89,90}. *O*-glicoproteínas, cuyo enlace covalente se realiza principalmente uniendo el OH- del carbono α -anomérico de un residuo de GalNAc al OH- de un residuo de Ser o Thr en la cadena

peptídica⁹¹; en la O-glicosilación existe también la posibilidad de unir otros residuos: GlcNAc como centro de iniciación, evento reportado en diversas proteínas nucleares y citosólicas^{92,93,94}, fundamentalmente cerebrales⁹⁵; Gal-Ser/Thr que se presenta en colágeno⁹⁶; Glc-Ser/Thr presente en factores de coagulación⁹⁷; Man-Ser/Thr en glicoproteínas de levaduras⁹⁸, en α -dístroglicanos⁹⁹, y en proteoglicanos cerebrales de rata^{100,101}; xilosa (Xyl)-Ser/Thr es frecuente en proteoglicanos; Fuc-Ser/Thr¹⁰² que se ha reportado en algunas proteínas fibrinolíticas y en dominios del factor de crecimiento epidermal (EGF)^{103,104}; y arabinosa (Ara)-Pro¹⁰⁵. Finalmente, la más reciente de los tipos de glicosilación, reportada en 1994¹⁰⁶ es la C-glicosilación, en la que se une de manera covalente el carbono α -anomérico de una aldohexosa, generalmente Man aunque puede ser Glc, al carbono 2 del residuo indol de triptófano (Trp) por unión carbono-carbono en una secuencia consenso Trp-X-X-Trp, donde X es cualquier otro residuo de aminoácido; se lleva a cabo pos-traduccionalmente principalmente a nivel citosólico¹⁰⁷. La N- y la O-glicosilación son los dos tipos de eventos más estudiados y caracterizados, dado el tiempo que tienen de haber sido descritos.

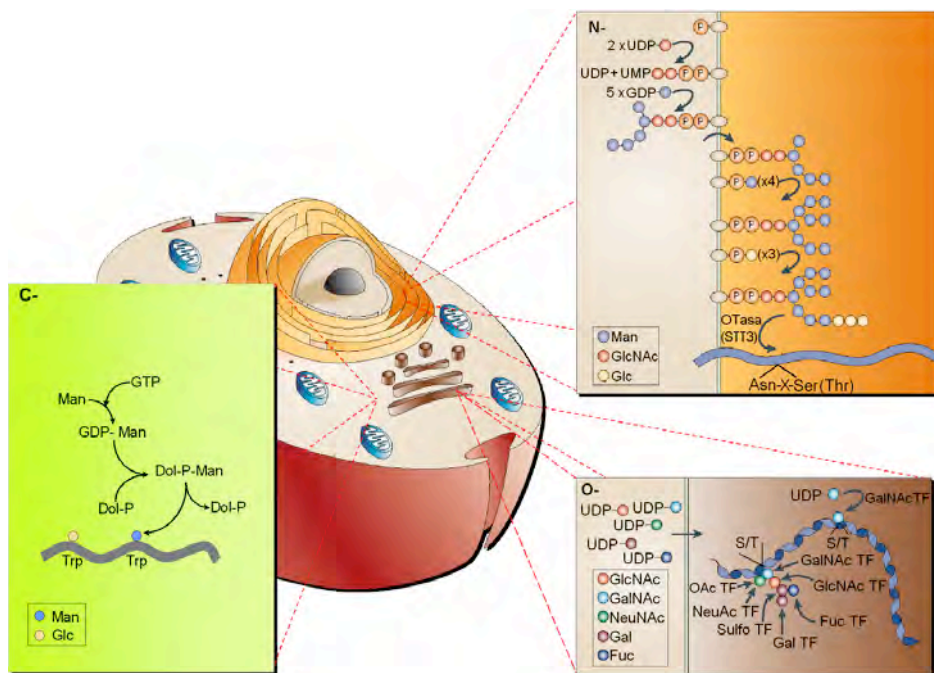


Figura 3. Tipos de glicosilación en proteínas (N-, O- y C-) en eucariotes. La N-glicosilación (recuadro naranja-café) tiene lugar principalmente en el retículo endoplásmico rugoso (RE). La O-glicosilación (recuadro café) ocurre tanto en el RE como en el aparato de Golgi (AG) siendo éste último en donde fundamentalmente tiene lugar. La C-glicosilación (recuadro verde) se realiza a nivel citoplasmático principalmente.

La secuencia del genoma humano completo fue publicada en el 2001 y el número de genes que se reportó que lo conforman fue sorprendentemente pequeño, no excediendo los 30,000^{108,109}. De estos, se ha estimado que existen cerca de 200 a 500 genes implicados en el proceso de la generación o modificación de glicoconjugados en vertebrados¹¹⁰. De esta forma, sólo alrededor del 1% de los genes están involucrados en la producción del glicoma humano.

La biosíntesis y procesamiento de glicoconjugados, difiere de la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Los ácidos nucleicos y las proteínas son moléculas lineales en las que la unión entre monómeros individuales es la misma. La biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas es eficientemente controlada a través de un mecanismo de tipo molde. Los carbohidratos son únicos en cuanto a la complejidad estructural. Primero, la unión entre dos carbohidratos genera dos diastereómeros llamados α - o β -anómeros. Segundo, un residuo de carbohidrato puede establecer su unión en tres o más diferentes grupos OH- con azúcares cercanos, para formar ramas. El ensamblaje de complejos de carbohidratos a través de la glicosilación por lo tanto, no puede ser dirigido por un molde y requiere de una elaborada línea de ensamblaje. Las glicosidasas^{111,112} son las responsables del corte de enlaces glicosídicos, y se clasifican en enzimas catabólicas y accesorias. En la glicosilación, las glicosidasas catabólicas están involucradas en la liberación de oligo- y polisacáridos de la dieta, o cadenas glicosídicas de glicoproteínas y glicolípidos; mientras que las accesorias están implicadas en el procesamiento de cadenas de carbohidrato durante la glicosilación. Las glicosiltransferasas catalizan la transferencia de monosacáridos u oligosacáridos desde un azúcar-nucleótido donador al grupo OH- del carbohidrato aceptor¹¹³⁻¹⁴⁰

Los monosacáridos, que generalmente tienen cinco o seis carbonos, se enlazan con otros carbohidratos en las dos diferentes formas anoméricas: α o β , y a partir de este enlace, se pueden obtener diferentes combinaciones. De hecho, tres hexosas unidas por enlace glicosídico, dan como resultado 27,648 únicos trisacáridos¹²⁰. Al comparar con las solas seis variaciones

posibles obtenidas de la conjugación de tres bases de nucleótidos, las posibilidades glicosídicas son inconmensurables. Dos moléculas de un monosacárido pueden generar 11 diferentes disacáridos, mientras que dos aminoácidos formarán un sólo dipéptido. Cuatro diferentes monosacáridos pueden formar 35,560 distintos tetrasacáridos y cuatro diferentes aminoácidos formarán sólo 24 tetrapéptidos¹²¹. La posibilidad combinatoria para el ensamblaje de un hexasacárido¹²², se ha calculado cerca de 1×10^{12} .

CAPÍTULO 3

El Ácido Siálico

El descubrimiento del ácido siálico tuvo lugar a finales de la década de los años 30 del siglo XX por investigadores como Gunnar Blix, Ernst Klenk, entre otros, como el principal producto formado por la hidrólisis parcial de mucinas salivales o glicolípidos cerebrales. Fue en 1936, cuando el bioquímico Sueco Gunnar Blix aisló de mucina submaxilar bovina un ácido cristalino que luego fue nombrado como “ácido siálico”, por el vocablo griego *sialos* que significa *saliva*, que poseía poder reductor, conteniendo nitrógeno y dos grupos acetilo¹²³. Una sustancia con propiedades similares a las descritas por el profesor Blix fue aislada en Alemania en 1941 por Ernts Klenk, mediante metanolisis a partir de glicolípidos cerebrales, y denominó a esta sustancia como “ácido neuramínico”, por su ubicación en los lípidos del sistema nervioso central (neuro) de los que se aisló por vez primera, que luego en 1942 cambió el nombre a “ácido metoxineuramínico”. La importancia de estos hallazgos en el campo de la bioquímica y la biología no se observó sino hasta los años 1950's cuando surgió un gran interés en los ácidos siálicos antes descritos, con la intención de describir en su totalidad estas estructuras; fue en este campo que el Dr. Alfred Gottschalk tuvo un destacado papel al caracterizar la estructura química completa y la biosíntesis de la molécula. Durante los años 1950's y 1960's diversos grupos, además del grupo del Dr. Gottschalk como los de los investigadores Roseman, Brossmer, Warren, Yamakawa, y Glick, siguieron investigando los aspectos bioquímicos, físicos y biológicos de estos ácidos^{124,125}. Desde entonces, más de 50 derivados que ocurren naturalmente han sido descritos en la actualidad¹²⁶. Los ácidos siálicos (Figura 4), estructuralmente son una familia de azúcares de nueve átomos de carbono, que fueron originalmente descritos como derivados del ácido 5-amino-3,5-dideoxi-*D*-glicero-*D*-galacto-no-2-ulosónico (ácido neuramínico; Neu).

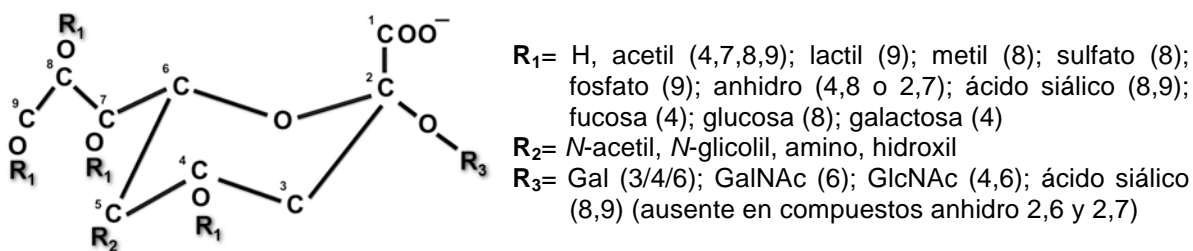


Figura 4. Los ácidos siálicos, estructura y diversidad. El esqueleto de nueve carbonos común a todos los ácidos siálicos se muestra en representación de silla. Se indican las sustituciones naturales descritas (en R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , y R_9). Se genera una diversidad adicional por varios tipos de uniones glicosídicas (en R_2), por la generación de lactonas (en R_1), por formas dehidro- (eliminando R_2) y formas anhídro. Tomado y modificado de Varki A. *Glycobiology* 1992; 2: 25-40. Con autorización de la revista y del autor.

De más de 30 derivados acetilados del ácido neuramínico, el ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico) es el más común en los humanos. Se trata de un monosacárido de nueve carbonos con carga eléctrica negativa que exhibe un peso molecular de 309 y valores de pK de 2.6. El ácido siálico está comúnmente unido a residuos no reducidos de cadenas de oligosacáridos en glicoproteínas y glicolípidos.

Existe sólo una pequeña cantidad de ácido siálico libre en fluidos y tejidos corporales. La unión de ácido siálico tiene gran importancia en la biología celular debido a que se encuentra presente en glicoproteínas y glicolípidos en posiciones externas de las cadenas oligosacáridicas y en las membranas externas celulares. El ácido siálico participa en la estabilización de la conformación de glicoconjugados y membranas celulares. Su presencia en las membranas externas además dificulta la acción de algunas endoglicosidasas y proteinasas. Más aún, el ácido siálico puede enmascarar sitios de reconocimiento celular o ser blanco para el reconocimiento de una proteína receptor. La carga negativa que presenta el ácido siálico le confiere la propiedad que el compuesto participe en la unión y transporte de moléculas cargadas electro-positivamente, y en los eventos de atracción y repulsión celulares y moleculares¹²⁷. El ácido siálico contribuye también en la regulación de la permeabilidad de las membranas basales glomerulares¹²⁸; y es uno de los reguladores de las interacciones celulares y moleculares¹²⁹. Las alteraciones de la glicosilación en células tumorales pueden contribuir a la biosíntesis de estructuras de carbohidratos que contienen células malignas o transformadas cuyo alto contenido es de ácido siálico en sus superficies. El nivel plegamiento y crecimiento celular son influenciados por el

contenido de ácido siálico en las células¹³⁰. En los casos de células metastásicas, se ha observado que se incrementa la expresión de ácido siálico comparado con células no metastásicas¹³¹. El incremento en los niveles de sialilación favorece a las células malignas al enmascarar sus sitios inmunogénicos. Al incrementar su carga negativa la membrana celular externa, la unión y aniquilación por parte de células linfocíticas y macrófagos puede ser eliminada y esconde los sitios de reconocimiento para anticuerpos IgM con los cuáles, las células son eliminadas a través de reacciones mediadas por el complemento. La activación, transformación y el crecimiento maligno celular incrementan la cobertura de la superficie celular por ácido siálico¹³². Además, la sialilación a través de la sobre-expresión de sialiltransferasas en masas tumorales las transforma en un fenotipo resistente a la radiación en la terapia anti-neoplásica¹³³. En nuestro trabajo, analizamos la presencia de ácido siálico de las metástasis a cerebro, en masas tumorales ya establecidas en sitios secundarios.

CAPÍTULO 4

Las lectinas

4.1. Definición e historia

Las lectinas, también llamadas aglutininas, son un grupo de proteínas o glicoproteínas multivalentes con un peso molecular promedio de 60 a 100 KDa que tienen la propiedad de unirse a carbohidratos de manera reversible, aglutinan células animales *in vitro* o precipitan glicoconjugados^{134,135}; la excepción es lectina del ricino (*Ricinus communis*), la primera lectina identificada, que en la actualidad se considera una ARN-*N*-glicosidasa^{136,137} y un potente inhibidor de la síntesis de proteínas¹³⁸. Las lectinas están presentes tanto en células animales como vegetales. En un principio, fueron llamadas fitoaglutininas, debido a que fueron originalmente encontradas en extractos de plantas. El término lectina proviene del vocablo latín *legere* que alude la propiedad de unir o adherir carbohidratos, fue acuñado por William Clouser Boyd en 1954¹³⁹. Sin embargo, fueron inicialmente identificadas en 1888 por Peter Hermann Stillmark, quien las describió en su tesis al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Dorpat, en Estonia¹⁴⁰. Stillmark aisló la lectina de semillas del árbol del ricino (*Ricinus communis*) y la nombró ricina. En 1919, James B. Sumner en la Universidad Cornell en Ithaca, Nueva York, quien había sido el primero en cristalizar en 1926 un enzima, la ureasa (trabajo que le valió el premio Nobel 21 años más tarde), aisló de la leguminosa *Canavalia ensiformis*, una proteína cristalina que llamó Concanavalina A, siendo la primera hemaglutinina obtenida en forma pura. Fue clasificada por Sumner y Howell en 1936 como una lectina¹⁴¹. La afinidad por azúcares es similarmente específica, aunque menor, que las interacciones enzima-sustrato o antígeno-anticuerpo. La reacción de lectina-azúcar guarda muchas semejanzas con las reacciones antígeno-anticuerpo, especialmente la precipitación, fenómeno que ha hecho sugerir que el papel de las lectinas vegetales es el de anticuerpos en el sistema de defensa vegetal. Participan en diversas interacciones del sistema inmune al emplear éste carbohidratos como determinantes de reconocimiento¹⁴². La unión de las lectinas con azúcares además de ser reversible, no modifican

bioquímicamente a los carbohidratos a los que se unen, característica que las distingue de las enzimas. Las lectinas pueden interactuar con azúcares libres, oligosacáridos, residuos de azúcares de polisacáridos, glicoproteínas, glicolípidos¹⁴³, y receptores en la superficie celular¹⁴⁴. Las interacciones lectínicas con sus ligandos modulan las señales de comunicación celular tanto en la célula misma, como el cruce de información célula-célula^{145,146}.

Las lectinas están presentes en el reino vegetal, animal y en microorganismos. En las plantas se han identificado principalmente en los cotiledones, endospermos y semillas, y constituyen del 2 al 10% del total de las proteínas de éstas¹⁴⁷. En el reino animal se han encontrado en invertebrados, tales como cangrejos, camarones, langostinos, caracoles, lombrices y moluscos, en quienes están presentes fundamentalmente en la hemolinfa y en los órganos sexuales¹⁴⁸.

Basándose en el análisis de las secuencias de residuos de aminoácidos, Kurt Drickamer de la Universidad de Columbia (Nueva York, USA) propuso en 1988 que la actividad de unión a carbohidratos residía en un limitado segmento del polipéptido, designado por él como el dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD, por sus siglas en inglés: Carbohydrate-recognition domain)¹⁴⁹. Las lectinas contienen uno o más CRD y pueden contener uno o más de unión a metales. Los metales a los que generalmente se unen son aquellos divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , etc). La unión de la lectina con su ión metálico, provoca un cambio conformacional en la estructura que expone el centro de unión a carbohidratos, y de esta manera, favorece la interacción lectina-carbohidrato, evento que ha sido denominado de *activación lectínica*. En las lectinas de origen vegetal de una misma familia se ha observado que poseen una alta homología en sus secuencias de residuos de aminoácidos, estructuras secundarias, y en su organización tridimensional, como ocurre en el caso de las lectinas de leguminosas. Una de las características estructurales ampliamente estudiada es el CRD, el cual se divide en dos subtipos: el primero de ellos corresponde al sitio en donde tiene lugar la interacción con el monosacárido, mientras que el segundo, que se conoce como "sitio extendido", permite una interacción con oligosacáridos

más complejos. Esta cualidad permite explicar las diferencias en los efectos biológicos que existen entre lectinas con la misma especificidad hacia un monosacárido^{150,151}. El análisis del sitio extendido resulta ser más complejo debido a la dificultad de cristalizar a las lectinas unidas a oligosacáridos. En el caso de lectinas de la familia de las leguminosas, independientemente de su especificidad reconocen a los carbohidratos gracias a la presencia de tres residuos de aminoácidos invariantes: el ácido aspártico, la asparagina y un residuo aromático o una leucina. El ácido aspártico y la asparagina participan en la coordinación del Ca^{2+} . La característica de que los aminoácidos del sitio de reconocimiento se encuentren altamente conservados en todos los miembros de una familia, sugiere que la especificidad está dada por la orientación de los monosacáridos en el sitio de reconocimiento.

Los oligosacáridos son moléculas con una alta flexibilidad en solución y pueden adquirir numerosas conformaciones alrededor de una unión glicosídica, misma que está definida por los ángulos ϕ y ψ ¹⁵². La distribución de las estructuras oligosacáridicas es también importante para la interacción lectina-carbohidrato, como se ilustra en el ejemplo de la lectina *Arachis hypogaea*, en la que la presencia de estructuras oligosacáridicas de manera continua, no afecta el reconocimiento, mientras que en el caso de la lectina *Amaranthus leucocarpus* el sitio de reconocimiento está diseñado para permitir la interacción de estructuras oligosacáridicas donde los residuos de carbohidratos estén separados por cinco o seis residuos de aminoácidos⁴⁷³.

Las lectinas son valiosas herramientas que se emplean en la genética, la biomedicina y la inmunología. Su utilidad se basa en la propiedad de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares y fluidos corporales. Se emplean en la caracterización de oligosacáridos y aislamiento de poblaciones celulares específicas¹⁵³. Sus propiedades mitogénicas permiten su empleo en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos; también son útiles para diferenciar sub-poblaciones de timocitos¹⁵⁴; para tipificar eritrocitos; unirse a espermatozoides, plaquetas y bacterias; inducir mitosis en linfocitos, aglutinación de virus¹⁵⁵; identificar el transporte axonal en el sistema nervioso periférico¹⁵⁶; han

sido empleadas también en la identificación de residuos de carbohidrato, entre otras. Las lectinas regulan el desarrollo cerebral al mediar reconocimientos intercelulares y adhesivos en algunos organismos eucariontes¹⁵⁷. Debido a su especificidad por estructuras sacarídicas, se les considera las traductoras de un lenguaje celular único: el glicocódigo^{158,159}. El estudio del lenguaje codificado por carbohidratos ha hecho surgir un campo nuevo denominado la lectinómica, que emplea a las lectinas como las traductoras¹⁶⁰. El empleo de lectinas ha emergido incluso para describir el papel funcional de las estructuras de carbohidratos que reconocen, siendo así consideradas moléculas de reconocimiento biológico¹⁶¹.

Los métodos de identificación de glicoconjugados existentes requieren de equipo sofisticado, personal calificado y en general, reactivos de alto costo económico y meticulosos procesos de tratamiento. Las lectinas ofrecen la posibilidad de ser herramientas para la identificación de carbohidratos a relativo bajo costo económico, con mínimos requerimientos de equipo y con la posibilidad de ser empleadas por personal con mínimo entrenamiento.

4.2. Lectinas en el estudio del cáncer

Desde hace varios años ha sido identificada la amplia cantidad de glicoconjugados antigénicamente distintos, incluyendo glicolípidos y glicoproteínas presentes en la superficie celular. El progreso en el estudio de las diferencias estructurales de los carbohidratos se ha conseguido en parte, por el uso de lectinas para su estudio. El empleo de las lectinas en el cáncer ha servido para establecer las alteraciones de la glicosilación que se asocian con la invasión neoplásica. Las propiedades de unión a carbohidratos hacen a las lectinas, importantes marcadores para el estudio que involucra técnicas histoquímicas, bioquímicas y funcionales en la caracterización e identificación de células cancerosas¹⁶². Diversos estudios han mostrado una variedad de lectinas en cánceres de mama. Particularmente, la reactividad a *Helix pomatia* (HPA, específica a GlcNAc¹⁶³) a células de cáncer de mama se asocia con pobre pronóstico¹⁶⁴. Incluso, la presencia de residuos de GlcNAc específicos para la lectina *Triticum vulgare* (WGA) han

mostrado ser valiosos en la identificación de potencial metastásico en líneas celulares de adenocarcinoma de colon¹⁶⁵.

CAPÍTULO 5

Glicosilación, cáncer y metástasis

Los oligosacáridos de glicoconjugados participan en las interacciones célula-célula, interacciones celulares con la matriz extracelular y moléculas solubles¹⁶⁶. Cambios en los patrones de glicosilación de glicolípidos¹⁶⁷, glicoesfingolípidos¹⁶⁸, y glicoproteínas^{169,170} se asocia con la transformación maligna. El arreglo de los patrones de glicosilación, ejerce una fuerte influencia en el fenotipo celular y lleva a las células que lo expresan, hacia la conducta biológica benigna o invasiva, proliferante y metastásica^{171,172}. Las alteraciones en los patrones de glicosilación tienen un papel importante en los eventos invasivos y metastásicos¹⁷³. Es común en células tumorales, la modificación en estas estructuras glicosídicas y son marcadores inequívocos de transformación celular maligna¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico y se expresan en la membrana plasmática principalmente. Desempeñan funciones importantes en el crecimiento y diferenciación celular. La sobreexpresión de gangliósidos GD3, se ha observado en diversos tumores de origen neuroectodérmico o epitelial como el glioma, meduloblastoma, neuroblastoma, melanoma, tumores de cabeza y cuello, cáncer de mama y teratomas¹⁷⁷. La acumulación de gangliósidos en las células tumorales estimula el crecimiento tumoral al afectar el receptor o la función de las integrinas, que desempeñan funciones de adhesión celular con componentes de la matriz extracelular y por lo tanto, se convierten en herramientas indispensables en la migración e invasión tumoral y metástasis¹⁷⁸. Por otro lado, los gangliósidos pueden regular el crecimiento tumoral al estimular la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)¹⁷⁹; además, la expresión de este factor es clave para la neovascularización crítica en la metástasis^{180,181}. Los análisis de los carbohidratos de superficie celular en tumores, han revelado que uno de los cambios comunes en glicoproteínas de células tumorales es la presencia de estructuras *N*-glicosídicas grandes, con mayor número de ramificaciones¹⁸². Los *N*-glicanos con enlace β -1,6 unidos a GlcNAc, son estructuras tri- o tetra-antenarias que representan una

fracción de las estructuras *N*-glicosídicas. El incremento de las cadenas con este enlace, es el resultado del incremento de ramas GlcNAc- β -1,6Man- α -1,6Man- β en estructuras centrales (*core*) trimanosídicas de oligosacáridos de tipo complejo que a su vez, son producto del incremento en la actividad del enzima *N*-acetilglucosaminil a su vez transferasa V (GlcNAc-TV) conocida también como MgAT5 (Manosido acetil glucosaminil transferasa 5). GlcNAc-TV cataliza la transferencia de GlcNAc a α -6-D-manosidos para producir cadenas en enlace β -1,6- de *N*-oligosacáridos que controlan el contenido de polilactosamina. El incremento en cadenas β -1,6- de *N*-glicanos, se encuentra presente en estadios iniciales de carcinogénesis inducidas por oncogenes v-Src, H-Ras, v-fps o por virus oncogénicos¹⁸³ y se asocia de manera directa con potencial metastásico¹⁸⁴. La transformación celular maligna, se asocia con el incremento en la expresión del gen de GlcNAc-TV que a su vez, está regulado por Src cinasa¹⁸⁵. La presencia de cadenas beta-1,6- activa al gen K-Ras¹⁸⁶. Además, el incremento en las cadenas β -1,6- provee de antenas lactosaminas adicionales que son útiles para cubrirse con residuos de ácido siálico, dando como resultado un incremento en la sialilación tumoral¹⁸⁷.

Las enzimas responsables de la adición de residuos de ácido siálico en glicoconjugados son las sialiltransferasas, un tipo de enzimas transmembranales tipo II del aparato de Golgi¹⁸⁸. El incremento en la sialilación es debido a la sobre-activación de la actividad de sialiltransferasas. La sialilación es un evento habitual de la transformación celular maligna¹⁸⁹. La presencia de estructuras de ácido siálico (Neu5Ac) de tipo Neu5Ac- α -2,6- se encuentra baja o ausente de manera normal en diversos tejidos¹⁹⁰. Se sobre-expresa asociada a fenotipos celulares metastásicos en carcinomas de colon^{191,192}, de mama¹⁹³ y diversos cánceres ginecológicos¹⁹⁴; en estos cánceres, caracterizados por su alto patrón de agresividad, una de las características que confiere esta estructura es la pérdida de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular mediadas por una reducción en la agregación de tipo homotípico de las células cancerosas. Incluso, la intensidad de la reactividad a glicoconjugados con este tipo de terminaciones sialiladas, permite predecir recurrencias en cánceres colo-rectales¹⁹⁵ y graduar el grado de des-

diferenciación en carcinomas de colon¹⁹⁶. Las células tumorales modifican su patrón de expresión glicosídica de ácido siálico en su superficie, e inducen alteraciones en moléculas de adhesión que le atribuyen fenotipos invasivos, como las integrinas y favorece el potencial migratorio y metastásico¹⁹⁷. Cuando se observa un incremento de estructuras de siálico en enlace α -2,6- y un decremento en las de tipo α -2,3-, ejerce un pobre pronóstico y mayor índice metastásico en carcinomas de colon¹⁹⁸. Las estructuras de tipo α -2,3- son el ligando para moléculas de adhesión de células endoteliales, leucocitarias y plaquetarias (E-, L- y P-selectinas) y, al estar presente en la superficie de células tumorales, ejerce el acoplamiento célula-célula, y como receptor para unirse a estos elementos de la circulación para poder migrar en la circulación, o acoplarse al endotelio y extravasarse para invadir en un sitio lejano¹⁹⁹. La unión de P-selectina a residuos sacarídicos tumorales media la agregación heterotípica tumoral, trombosis, estimulación del crecimiento celular y metástasis²⁰⁰. Aunque las células tumorales pueden interactuar con plaquetas independientemente de la expresión de P-selectina como ligando y formar trombos a través de la cascada de coagulación²⁰¹. El siálico en enlace α -2,3- en glicoproteínas es crucial para la invasión de gliomas malignos, cuyo índice de proliferación es sumamente alto²⁰², mientras que las estructuras de siálico en enlace α -2,6- presentes en *N*-glicanos de la superficie celular inhiben la formación de gliomas²⁰³. Estructuras relacionadas con antígenos Lewis (Le) se asocian de forma íntima con la migración tumoral, agresividad y potencial metastásico. Tanto el antígeno sialil Lewis X (SLe^x) [NeuNAc- α -2,3Gal- β -1,4(Fuc- α -1,3)GlcNAc] como el antígeno sialil Lewis a (SLe^a) [NeuNAc- α -2,3Gal- β -1,3(Fuc- α -1,4)GlcNAc] presentes en la superficie celular, contienen las formas α -2,3- que son los ligandos a selectinas. La participación de estas estructuras tiene tal importancia en la migración tumoral metastásica, que ensayos realizados con un disacárido precursor de SLe^x a concentraciones micromolares [(Ac)₆GlcNAc- β -1,3Gal- β -O-naftalenometanol, AcGnG-NM] inhibe el potencial metastásico en células tumorales, al reducir la expresión de SLe^x y disminuir la interacción con ligandos²⁰⁴. Al igual que este modelo *in vitro* del precursor de SLe^x, la deficiencia del ligando a estas estructuras sacarídicas, en particular P-selectina, atenúa el

crecimiento tumoral y la metástasis *in vivo*²⁰⁵. Otro medio por el cuál se ha demostrado la participación de P-selectinas con su ligando glicosídico, es a través del bloqueo de selectinas con heparina, y en consecuencia modular la malignidad y potencial metastásico²⁰⁶.

El ácido siálico puede O-acetilarse en los carbonos 4,5,7,8 y 9²⁰⁷. En estadios embrionarios y de re-generación, las posiciones 5,9 O-acetiladas inducen y dirigen el crecimiento celular²⁰⁸; además de ser comunes en células de origen neuroectodérmico²⁰⁹. En colonias bacterianas y en células malignas, el incremento en el nivel de O-acetilación regula la degradación celular, fundamentalmente de mucinas²¹⁰, es un marcador de progresión tumoral en carcinomas de colon²¹¹ a la vez que es un indicador de potencial metastásico²¹² y, aporta citoprotección contra el reconocimiento inmunológico a través de la prevención de la activación de la vía alterna del complemento, crucial para la metástasis exitosa²¹³. Las alteraciones de la glicosilación puede definir en algunas ocasiones la malignidad cancerosa de algunas estirpes celulares²¹⁴ e incluso caracterizar alteraciones congénitas, adquiridas o no relacionadas con procesos enzimáticos pero que sí involucran cambios en los patrones de glicanos (glicación)²¹⁵. Un factor importante de malignidad y proliferación es la sialilación, como se ha observado en células de linfoma de Burkitt, en la que la expresión de sialilglicoconjugados favorece la adhesión de las células del linfoma al colágeno tipo IV y la fibronectina²¹⁶, o en el adenocarcinoma de próstata, en el que el nivel de sialilación es un marcador directo de condición maligna²¹⁷. En el carcinoma mamario, la sialilación es un evento íntimamente asociado con el avance del grado de malignidad, el potencial invasivo y el metastásico²¹⁸. Se ha mencionado que el incremento de oligosacáridos sialilados unidos a centros β -1,6- incrementa el potencial metastásico tumoral²¹⁹.

Dentro de los mecanismos de metástasis, uno de los factores importantes es la presencia de estructuras sacarídicas determinadas, cuya interacción con ligandos específicos, a través de interacciones proteína-carbohidrato o carbohidrato-carbohidrato, influyen en el fenotipo celular invasivo, proliferativo y metastásico²²⁰. De esta manera, la presencia de una estructura sacarídica en particular, que interacciona con el ligando específico, al modificarse también cambia el ligando

y la función celular²²¹. Algunas moléculas de adhesión como las galectinas y sus ligandos, funcionan como reguladores de la homeostasis celular inmune²²². Algunos miembros de esta familia como galectina-3 es un amplificador de la cascada inflamatoria, otras como galectina-1 desempeñan señales homeostáticas que apagan funciones efectoras de células T. Una asociación importante entre galectina-3 y las estructuras sacarídicas en la superficie celular tumoral, es su ligando Gal- β -1,3GalNAc- α -1,0-, que constituye el antígeno *T* o de *Thomsen Friedenreich*. El antígeno *T* es un antígeno tumoral y factor de riesgo elevado en la formación de metástasis²²³. Al estar presente este antígeno tumoral, interacciona con galectina-3 y favorece el acoplamiento de las células tumorales en órganos y sitios como el hepático o el endotelio vascular y consecuentemente, forma metástasis²²⁴. El antígeno *T* es un O-glicano de tipo mucínico que se expresa en forma incompleta²²⁵. La presencia de estructuras truncadas como este antígeno, ejerce mayor interacción con la membrana basal y la matriz extracelular²²⁶ en hepatocitos²²⁷ y células endoteliales²²⁸. En las células endoteliales, la expresión de galectina-3, a su vez promueve la adhesión y atrapamiento tumoral que exprese el ligando sacarídico, extravasar e invadir²²⁹. Al mismo tiempo, reduce fuertemente el contacto entre células epiteliales²³⁰ y provee de protección contra el reconocimiento inmunológico²³¹. El incremento en la expresión de galectina-3 en el suero²³² y en los tejidos tumorales se asocia significativamente con la presencia de metástasis²³³ y regula la respuesta inflamatoria²³⁴. La presencia de residuos de Gal en células transformadas a la malignidad es un evento frecuente.

Un factor importante en la invasión tumoral es la degradación de la matriz extracelular. La glicosilación influye en la actividad de serin-proteasas como el activador del plasminógeno de tipo tisular y la plasmina, los cuáles actúan en conjunto en un complejo ternario con fibrina. Los serin-proteasas y los metaloproteinasas de la matriz participan a su vez, en una cascada que remodela la matriz extracelular²³⁵ y contribuyen a la migración tumoral²³⁶. La presencia de residuos de ácido siálico en enlace α -2,6- en la metaloproteinasa gelatinasa B, influyen en la actividad catalítica al no permitir interaccionar con el inhibidor de metaloproteinasas-1²³⁷. El incremento en

los niveles de sialilación de moléculas de adhesión integrinas β_1 , contribuye a la progresión tumoral al sobre-regular la motilidad celular²³⁸. La sialilación ha sido ampliamente estudiada en la migración tumoral²³⁹ e incluso ha sido asociada como un marcador de potencial metastásico²⁴⁰. En algunos cánceres como la metástasis a hueso de origen mamario, se ha asociado la sobre-expresión de sialoproteínas de hueso con la génesis de la metástasis, debido a que las sialoproteínas de hueso están incrementadas en hueso, comparado con metástasis no esqueléticas de origen mamario, pudiendo desempeñar un papel importante²⁴¹.

CAPÍTULO 6

Moléculas de adhesión, cáncer y metástasis

6.1. Moléculas de adhesión

Las interacciones específicas entre los receptores en la superficie celular y los ligandos en la superficie de células o sustratos potenciales de adhesión son importantes mecanismos de la comunicación célula-célula y célula-matriz extracelular. Estas moléculas de superficie son colectivamente referidas como moléculas de adhesión (CAMs, por sus siglas en inglés). Algunas de estas CAMs son glicoconjugados, como glicoproteínas que desempeñan funciones críticas en la inflamación^{242, 243} y en la transformación celular neoplásica²⁴⁴. Algunas CAMs en particular, como las cadherinas, están directamente relacionadas en la adhesión célula-célula²⁴⁵. Adicionalmente, las CAMs tienen otras funciones, por ejemplo: participan en el reconocimiento antigénico²⁴⁶, actúan como señales coestimuladoras en la activación de células T²⁴⁷, y estimulan mecanismos efectores de linfocitos T (v.g. citotoxicidad de células T)²⁴⁸ y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos²⁴⁹.

Las CAMs mantienen a las células en su lugar. El mantenimiento integral de las vías de señalización a través de factores solubles, adhesiones célula-matriz extracelular, y adhesión célula-célula es una de las más importantes funciones de la multicelularidad. La correcta integración de estas señalizaciones favorece el crecimiento celular apropiado, la diferenciación y la morfogénesis final; pero la incorrecta integración contribuye a fenómenos patológicos entre los que destaca la proliferación celular, el cáncer y la metástasis. En estos fenómenos de regulación participan activamente las CAMs en sus diversas formas²⁵⁰.

En general existen 5 grandes familias de CAMs: las **cadherinas** (E-, P-, y N-cadherina) son moléculas de adhesión celular calcio-dependientes que desempeñan una función importante en la unión célula-célula y podrían funcionar además como moléculas supresoras de la invasión y la metástasis celular²⁵¹. En general se han encontrado nuevas sub-clases de cadherinas que se escapan de los modelos clásicos y tienen regiones menos conservadas que las consideradas

clásicas²⁵². Algunos autores refieren la presencia de más de tres clases de cadherinas, y muestran la siguiente clasificación²⁵³: E-cadherina (epitelial, uvomorulina), P-cadherina (placentaria, plaquetaria), N-cadherina (neuronal), L-CAM cadherina (hepática), VE-cadherina (endotelio vascular). Las **integrinas** son una larga clase de receptores heterodímeros para la adhesión molecular que controlan la migración y localización celular. Las subunidades β definen diversas sub-familias. Las **galectinas** son lectinas de origen animal, implicadas íntimamente con la inflamación y el cáncer. Se definen por los elementos de secuencia separados o por su afinidad a β -galactósidos, de los cuales, doce miembros humanos han sido reportados²⁵⁴. Las galectinas se encuentran en altas concentraciones (usualmente a 0.1% de proteína celular soluble total) en un limitado rango de tipos celulares, diferente para cada tipo de galectina. Todas las galectinas ligan a residuos de Lac y otros β -galactósidos pero difieren en su actividad a más carbohidratos. Las galectinas extracelulares atraviesan la superficie celular y las glicoproteínas extracelulares y pueden de esta manera modular la adhesión celular e inducir señales intracelulares. Las galectinas pueden también unirse a ligandos no carbohidratos y desempeñan funciones de regulación intracelular en procesos como apoptosis y el ciclo celular²⁵⁵. Una función pro-inflamatoria de galectina-3 se aprecia por su inducción frente a condiciones inflamatorias con una larga variedad de efectos en células del sistema inmune (procesos oxidativos en neutrófilos, quimiotaxis en monocitos), y alteraciones en la respuesta inflamatoria. Un posible papel de las galectina-3 en el choque séptico puede ser propuesto con base en sus efectos sobre neutrófilos²⁵⁶. Las galectina-1 y -9 inducen la apoptosis en células T activadas y la galectina-1 tiene un remarcado efecto inmunosupresor en enfermedades autoinmunes *in vivo*. Galectina-9 se ha reportado como un potente quimioattractante que actúa específicamente sobre eosinófilos. Con relación al cáncer, la evidencia es altamente correlacionada: mayor galectinas en tumores malignos²⁵⁷. La evidencia directa proviene de modelos ratones. En líneas celulares tumorales comparadas con decremento e incremento en la expresión de galectina-3, aquellas con mayor expresión de galectina-3 tienen mayor metástasis. Galectina-3 ha sido propuesta como

proliferativa celular por un mecanismo anti-apoptótico, promotora de angiogénesis o promoviendo la metástasis al afectar la adhesión celular. Los efectos inmunosupresores de galectinas pueden ayudar a la célula tumoral a defenderse de la respuesta inmune de tipo células T del huésped²⁵⁵. Estas moléculas están involucradas en los procesos de migración, adhesión y expansión celulares, en la organización de la matriz extracelular, pudiendo actuar incluso como moduladores de crecimiento celular²⁵⁸. La familia de las **selectinas** comprende tres glicoproteínas denominadas E-, P- y L-selectina. Cada selectina tiene un dominio calcio-dependiente de unión a carbohidratos (dominio tipo lectina-C) en su porción amino-terminal, seguido por un dominio tipo factor de crecimiento epidermal (EGF-like), un número variable de repeticiones de proteínas tipo acopladoras de complemento, un dominio transmembranal y un corto dominio citoplásmico²⁵⁹. Finalmente, la **superfamilia de inmunoglobulinas** se caracteriza por tener dominios de inmunoglobulinas y comprende al antígeno funcional leucocitario-2 (LFA-2 o CD2), al antígeno funcional leucocitario-3 (LFA-3 o CD58), las moléculas de adhesión intercelular (ICAMs), la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1), la molécula de adhesión celular plaqueta-endotelio-1 (PE-CAM-1), y la molécula de adhesión celular de mucosas-1 (MAdCAM-1)²⁶⁰.

6.2. Las cadherinas

En organismos complejos y simples, la formación tisular, la especialización, el mantenimiento y la funcionalidad durante el desarrollo hasta la vida adulta, requieren de un continuo, estable y dinámico contacto celular entre sí y con la matriz extracelular. Algunas de las proteínas a través de las cuales se lleva a cabo este contacto son las cadherinas. Las cadherinas, como otras moléculas de adhesión celular, son capaces de reconocer a otras homologas, inducir el crecimiento, la diferenciación, la migración y formación de diferentes tejidos especializados.

Las cadherinas son moléculas de adhesión que están implicadas en la morfogénesis embrionaria, y la formación de interacciones estables entre las células en tejidos sólidos y epitelios. Todas las formas de cadherinas tienen un dominio extracelular, un dominio transmembranal y uno citoplásmico. Este último, anclado a través de cateninas a los filamentos de actina del citoesqueleto. Las cadherinas se encuentran presentes en un rango amplio de animales desde nematodos hasta humanos. Cada cadherina confiere en la célula sobre la cuál se expresa, propiedades adhesivas específicas. En la adhesión, los dímeros de cadherinas en una célula, ejerce contactos homofílicos a través del dominio 1, con dímeros de cadherinas de otras células. Por lo tanto, el dominio 1 dicta la especificidad de la adhesión. Tanto la dimerización como la adhesión son eventos dependientes de Ca^{2+} . En ausencia de Ca^{2+} la molécula de cadherina permanece monomérica con el dominio extracelular desplegando extensa motricidad relativa a otras, y es incapaz de formar complejos de adhesión.

6.2.1. NCAM y su forma polisialilada (PSA-NCAM)

La molécula de adhesión celular neural (NCAM) también conocida también como el antígeno de superficie de diferenciación leucocitaria (CD, cluster differentiation, por sus siglas en inglés) 56, o D2, fue la primera en ser aislada por criterios estrictos. Fue identificada por dos grupos de investigación simultáneamente: el grupo de Elizabeth Bock de la Universidad de Copenhague en Dinamarca²⁶¹; y el grupo de Gerald M. Edelman de la Universidad Rockefeller en Nueva York en los EUA^{262,263}. En los años sucesivos, ha sido aislada, clonada y caracterizada ampliamente. Es una glicoproteína que se expresa en la superficie de diversos tejidos como las neuronas, la glia, el músculo esquelético²⁶⁴ y cardíaco²⁶⁵, células linfocitos NK, células intersticiales renales²⁶⁶, leucocitos humanos y murinos²⁶⁷, células dendríticas²⁶⁸, entre otras. Incluso, se ha descrito la presencia de PSA en la leche humana, pudiendo desempeñar importantes funciones en el neurodesarrollo del recién nacido²⁶⁹. La estructura de NCAM se dedujo de análisis secuencial de cADN en pollos²⁷⁰ y subsecuentemente en ratones²⁷¹. En ambos

casos, se encontró que guardan un alto grado de homología entre las CAMs correspondientes en diferentes especies. Esta glicoproteína asociada a la membrana celular sirve como ligando homofílico²⁷² y heterofílico²⁷³ a través de estructuras oligomanosídicas²⁷⁴.

Las interacciones heterotípicas que establece NCAM (Figura 5), dentro de algunas de las que realiza se encuentra aquella con el adenosin-tri-fosfato (ATP)²⁷⁵, que en el cerebro, entre otras funciones, actúa como neurotransmisor, particularmente por su ubicación en las vesículas sinápticas a concentraciones mM²⁷⁶. NCAM puede unir cerca de 1000 moléculas de ATP por minuto, causando hidrólisis de ATP dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} , indicando que NCAM actúa como una ATPasa. También puede tener interacción directa con el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), que tiene actividad de tirosin-cinasa²⁷⁷. FGFR contiene un dominio homólogo a las CAMs y la interrupción de este dominio, evita la interacción con NCAM y lleva a la pérdida del crecimiento neurítico²⁷⁸. Más aún, las interacciones homotípicas NCAM-NCAM llevan a la fosforilación de FGFR²⁷⁹, sugiriendo que NCAM se une a FGFR y lo estimula de manera directa o indirecta. Otro factor de crecimiento, el factor de crecimiento derivado de la glia (GDGF) y su receptor, el receptor-alfa anclado a la membrana por un GPI (GFR-alfa), se ha demostrado que se unen a NCAM de manera directa²⁸⁰. La unión con GDNF es independiente de la presencia de ácido polisiálico en la NCAM y no interfiere con las interacciones homofílicas NCAM-NCAM, mientras que la unión con el GFR-alfa a la NCAM inhibe las transinteracciones homofílicas NCAM-NCAM, pero al mismo tiempo potencia las interacciones GDNF a NCAM. La interacción de NCAM-GFR- α -GDNF induce el crecimiento neurítico y la migración de células de Schwann. NCAM también interacciona con los componentes de la matriz extracelular (MEC). Por ejemplo, NCAM contiene una corta secuencia de aminoácidos, de 17 residuos de aminoácidos de longitud, en el módulo II de los dominios tipo Ig, que se une a heparina, un glicosaminoglicano de la MEC²⁸¹, y ocurre de manera independiente de las interacciones homofílicas NCAM-NCAM²⁸². Por otro lado, NCAM también se une a otros proteoglicanos de tipo condroitin sulfato²⁸³ y heparan sulfato como la agrina, el neurocan, y el fosfocan²⁸⁴. NCAM es capaz de unirse también

a colágenos I-V y IX, sin embargo, esta unión tiene lugar de manera indirecta a través de sitios de unión a heparán sulfato ubicados en la NCAM²⁸⁵.

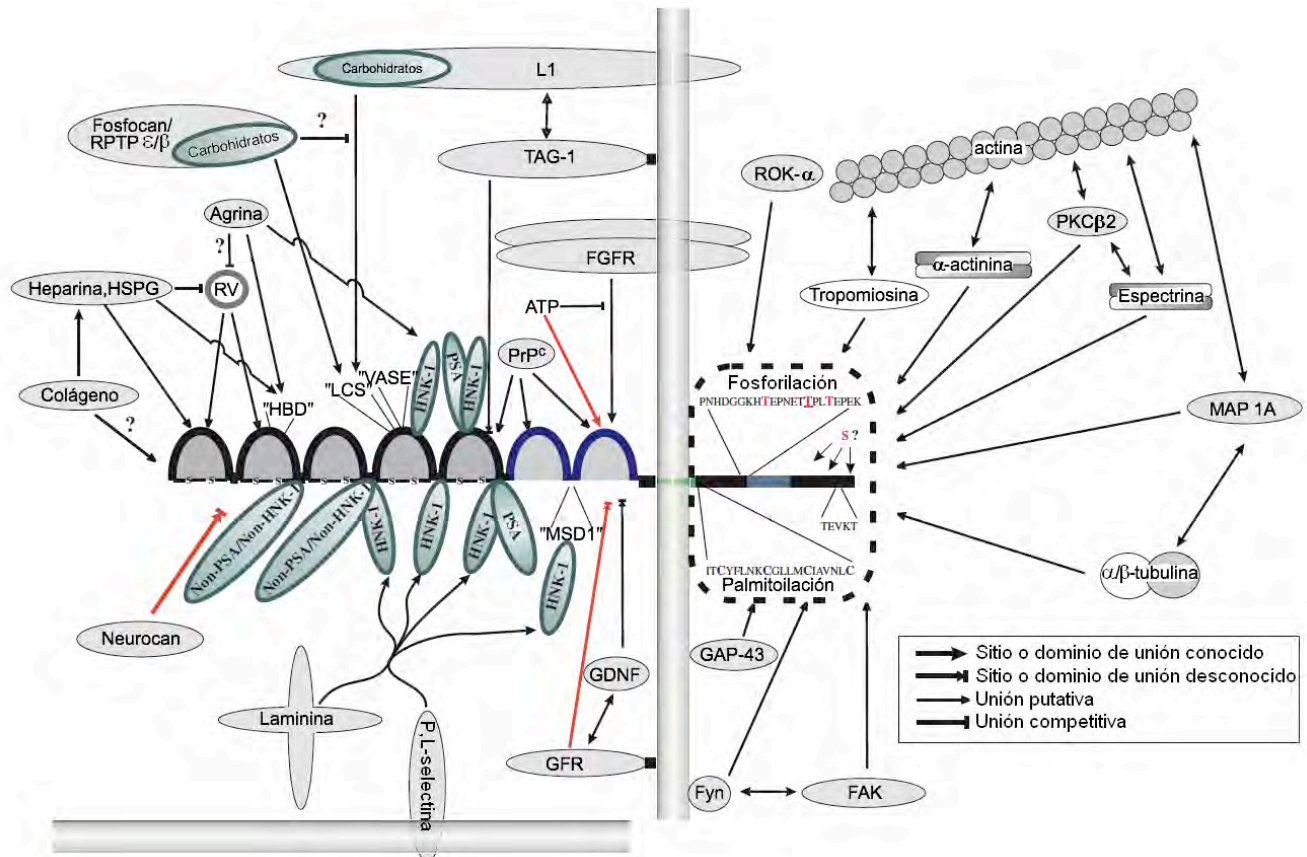


Figura 5. Esquema resumen de las principales interacciones heterofílicas de NCAM. Las moléculas de carbohidrato se muestran en verde. Los sitios putativos de Thr-fosforilación en la región citoplasmática de NCAM se muestran en rojo (el más activo está subrayado). "S?" indica los sitios desconocidos de Ser-fosforilación. Los sitios de palmitoilación en la región citoplasmática de NCAM se muestran en azul. "TEVKT" indica la secuencia de sitios putativos de unión a NCAN con moléculas de señalización citosólicas. Las interacciones que se sabe afectan la unión homofílica NCAM-NCAM se muestran en flechas rojas²⁸⁶. Tomado y modificado de Walmod 2004. Con autorización de la revista y del autor.

Otras interacciones que se observan con NCAM a nivel intracelular, y que funcionan como señalizadoras (Figura 6) es con alfa- y Beta-tubulina, los principales componentes del citoesqueleto. De igual forma, Beta-actina, tropomiosina, la proteína asociada al microtúbulo-1A (MAP1A), y la alfa-cinasa de unión a Rho²⁸⁷. NCAM es capaz de co-inmunoprecipitarse con diversas cinasas asociadas al cáncer como los miembros de la familia Src, las tirosin-cinasas no receptores de Fyn, y las cinasas de adhesión focal FAK, y GAP-43²⁸⁸.

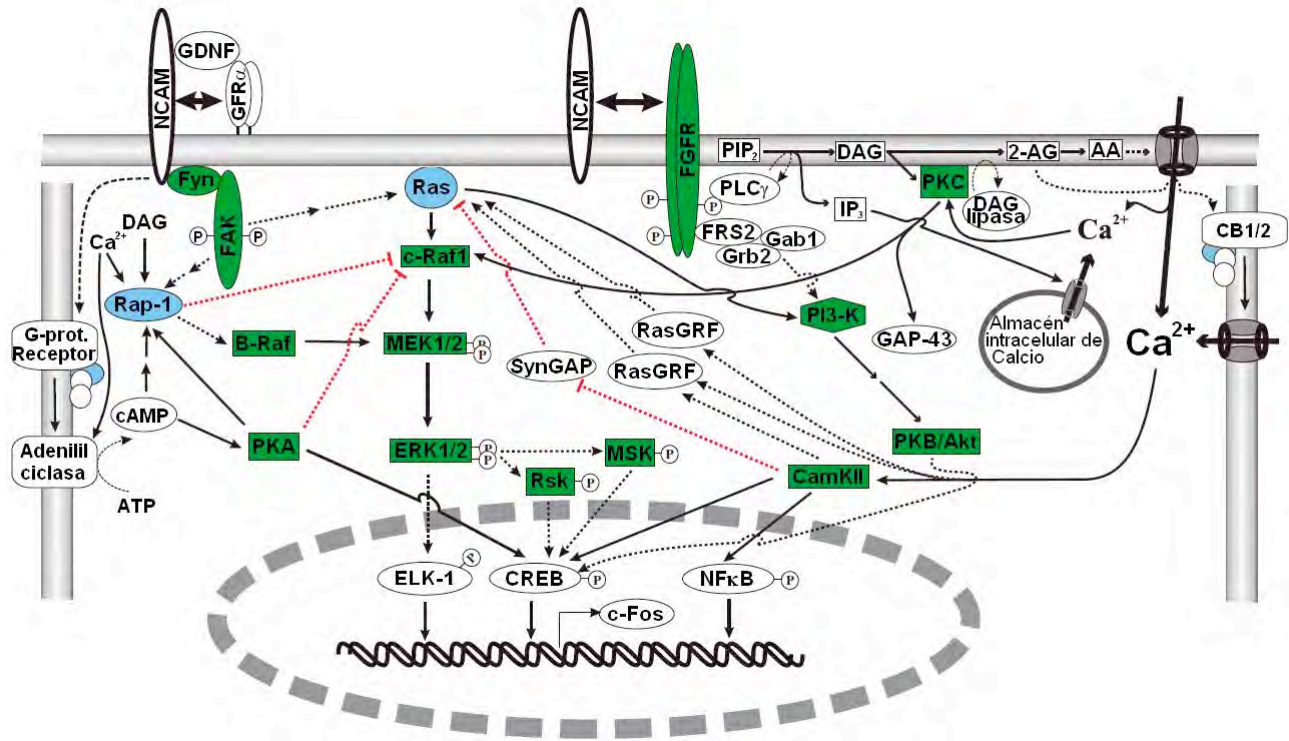


Figura 6. Esquema de la vía de señalización intracelular mediada por NCAM. En líneas cortadas, las vías de señalización, en las que el papel de la señalización mediada por NCAM no está esclarecida completamente. Las cinasas se muestran en color verde, las Ser/Thr-cinasas o cinasas duales están enmarcadas, las Tyr-cinasas en elipses. GTPasas se muestran en color azul. Las vías de inhibición se indican en color rojo. Tomado y modificado de Walmod 2004. Con autorización de la revista y del autor.

NCAM (Figura 7) está codificada por un solo gen que consiste de 27 exones, y existen al menos 27 NCAM productos de ARNm de corte y empalme alternativo, que llevan a una diversidad de isoformas de NCAM²⁸⁹. Las 3 principales isoformas de NCAM varían sólo en su dominio citoplasmático: NCAM-120 kDa (anclada a un glicosil-fosfatidil inositol, GPI); NCAM-140 kDa (con un dominio citoplasmático corto); y NCAM-180 kDa (con un dominio citoplasmático largo). El gen para NCAM se localiza en el humano²⁹⁰ en el cromosoma 11, en el ratón en el 9 y en la rata en el 8²⁹¹.

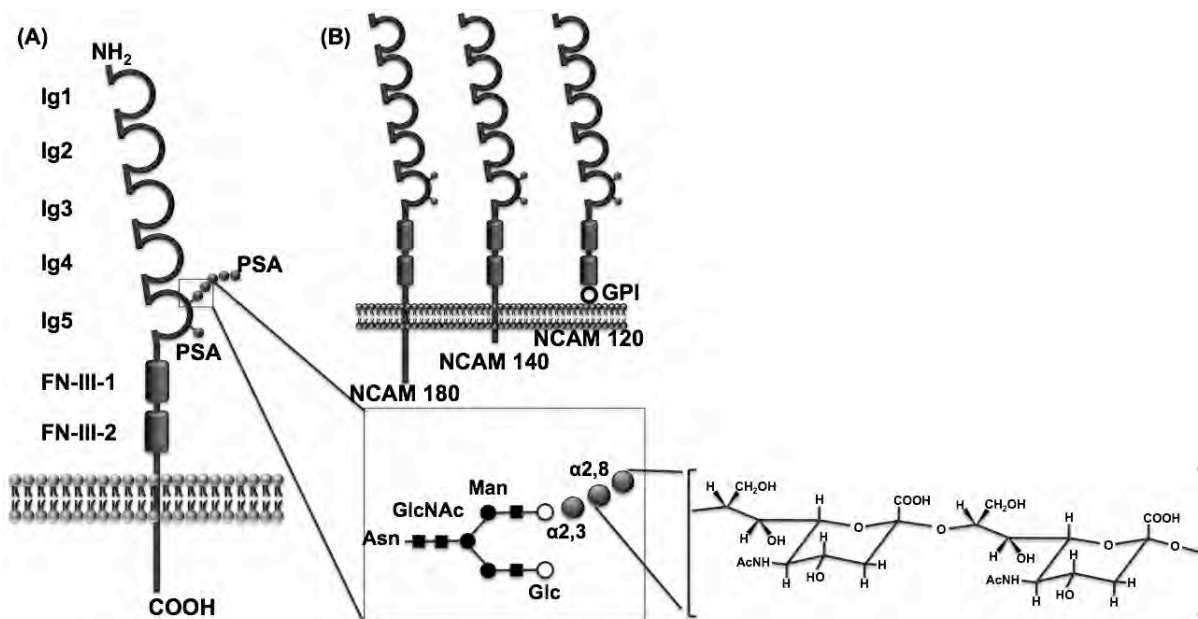


Figura 7. Representación esquemática de la estructura de PSA-NCAM. (A) Contiene una región *N*-terminal extracelular con cinco dominios de tipo inmunoglobulinas (Ig1-5) unidos, y dos de tipo fibronectina tipo III repetidas (FN-III-1-2); y un dominio transmembranal C-terminal intracelular. La cadena de PSA es sintetizada en un *core N*-glicosídico en un residuo de asparagina (Asn) localizada en el dominio Ig5. (B) Las tres principales isoformas de NCAM, 180, 140 y 120. Tomado y modificado de Bonfanti L. 2006. Con autorización de la revista (vease anexos).

El nombre que se les ha asignado representa su peso molecular aproximado. Adicionalmente, diversas formas de NCAM solubles se generan a través de truncaciones o proteólisis²⁹². El dominio extracelular consiste de 5 dominios tipo inmunoglobulina (Ig) seguido de 2 dominios tipo fibronectina III (FN-III). Los dominios de NCAM tienen diferentes funciones, mientras que los dominios tipo Ig están implicados en interacciones homofílicas con NCAM²⁹³, los dominios tipo FN-III se relacionan con la señalización que induce el crecimiento celular.

Las principales diferencias entre las cadenas polipeptídicas tienen lugar en los dominios citoplásmicos o en la región de unión a la membrana celular. El dominio polipeptídico mayor (ld) y el menor (sd) contienen diferentes sub-dominios citoplásmicos; la región polipeptídica del dominio de superficie menor (ssd) no es un segmento citoplásmico propiamente, pero se une a la superficie celular por un intermediario fosfatidilinositol. Existen formas menores de NCAM que se forman por cortes y empalmes alternativos durante la transcripción del ARN a partir del gene NCAM simple²⁹⁴.

NCAM contiene 6 potenciales sitios de *N*-glicosilación (Asp203, Asp297, Asp329, Asp415, Asp441, y Asp470), que pueden glicosilarse en patrones sumamente dinámicos y espaciales²⁹⁵. En el quinto dominio de tipo inmunoglobulina de la NCAM, se encuentran acoplados en por lo menos tres sitios diferentes, oligosacáridos en una forma poco usual en vertebrados, el ácido siálico en enlaces α -2,8- conformando una larga, pesada y negativamente cargada molécula llamada ácido polisialico (PSA), que fuera descrito en 1982 por Jukka Finne como un homopolímero lineal presente en el desarrollo del sistema nervioso central de mamíferos²⁹⁶ (Figura 8). La forma embrionaria de NCAM contiene alrededor de 30 gr de este carbohidrato por cada 100 gr de polipéptido, y en el adulto forma un tercio de este compuesto, a lo máximo. El efecto de la unión de PSA en NCAM, da como resultado de su carga negativa, su gran volumen y su localización cercana a sitios de flexión tipo bisagra, la alteración de diversos ángulos de flexión, lo cual es requisito para formar diversas adhesiones homofílicas entre células con membranas flexibles. De esta forma, la presencia de PSA-NCAM embrionaria predomina cuando la adhesión se está estableciendo (como en la formación de conexiones neurales) y la forma adulta predomina cuando se requiere de estabilización (como en el cerebro adulto)²⁹⁷.

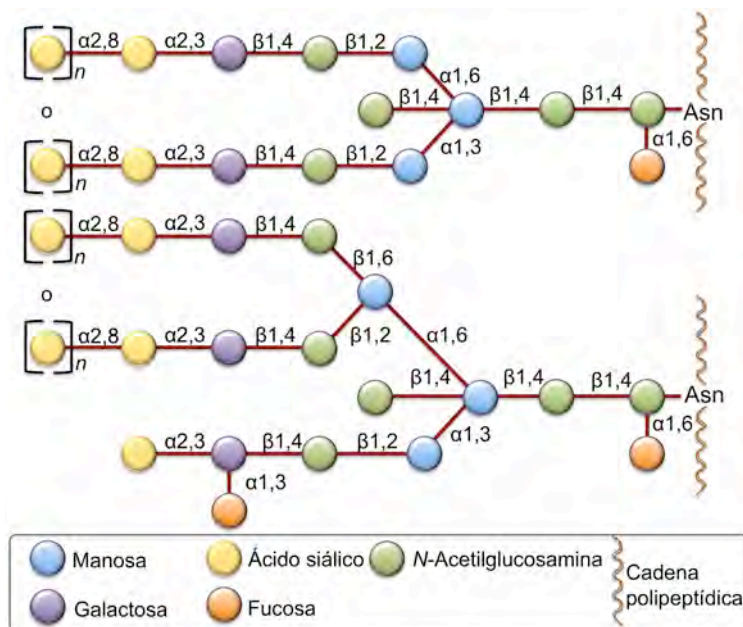


Fig. 8. Estructura y unión de ácido polisialico a la NCAM a través de sitios de *N*-glicosilación ubicados en el 5º dominio tipo Ig de las tres isoformas de NCAM²⁹⁸. Tomado y modificado de Kleene & Schachner 2004. Con autorización de la revista.

La biosíntesis de PSA está a cargo de dos polisialiltransferasas asociadas al aparato de Golgi, la ST8SialI y ST8SialIV que catalizan la transferencia de ácido siálico en uniones α -2,8- a partir de un azúcar nucleótido donador: el citidin-mono-fosfato de ácido siálico (CMP-Sia) a la NCAM. La expresión de las ST8SialI y ST8SialIV es regulada dependientemente del tiempo y es específica del tejido sobre el que tiene lugar. Las ST8SialIV tienen una preferencia hacia sitios *N*-glicosídicos de las NCAM, preferencia de la que carece la ST8SialI²⁹⁹. Durante la formación de PSA-NCAM, se adiciona inicialmente un residuo de ácido siálico en unión α -2,3- y posteriormente la molécula se alarga con la adición de unidades de ácido siálico en enlaces α -2,8-, pudiendo contener de 8 a 200 residuos de ácido siálico³⁰⁰.

La unión de células tumorales al endotelio induce un incremento en la expresión de NCAM en las células tumorales y una re-distribución de NCAM con el contacto heterofílico. La migración transendotelial se inhibe cuando la expresión de NCAM se reprime por un RNA anti-sentido, indicando un papel clave de NCAM³⁰¹. El PSA en uniones α -2,8- a las NCAM, modula las interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular y célula-espacio extracelular³⁰². Se expresa en la superficie celular y está implicada en el desarrollo cerebral^{303,304}. Su expresión decae durante la etapa adulta, manteniéndose en regiones en constante remodelación neuronal y plasticidad^{305,306} como el hipocampo³⁰⁷, el giro dentado³⁰⁸, el tálamo³⁰⁹, la corteza prefrontal³¹⁰, la amígdala y el bulbo olfatorio, los eritrocitos embrionarios, los linfocitos NK³¹¹, las células de la retina³¹², y las células cancerosas³¹³; participa en la migración neuronal, extensión neurítica así como la formación de sinapsis³¹⁴ y la señalización post-sináptica³¹⁵; se asocia a precursores neuronales y gliales; durante este periodo funcionan como antígeno regulador en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC)^{316,317}. Las NCAM son las principales acarreadoras de PSA, y su distribución celular puede variar dependiendo del estado de desarrollo y la región específica del cerebro. Otras moléculas que son blanco de la polisialilación son la asparaginasa de *Erwinia*

*carotovora*³¹⁸, la molécula de adhesión sináptica (SynCAM, por sus siglas en inglés)³¹⁹, entre otras.

La acumulación de PSA en la superficie celular depende de dos mecanismos de regulación:

1) El incremento en la transcripción y/o aumento de la actividad de las sialiltransferasas para la síntesis de PSA-NCAM, **2)** El incremento de la expresión de PSA-NCAM en la superficie celular en procesos de reparación celular ante una agresión o daño^{320,321}, o la recuperación de estados neurodegenerativos³²². PSA, al igual que otros carbohidratos con carga negativa como la heparina, se relaciona con diversas funciones biológicas como el desarrollo celular³²³, y metástasis³²⁴.

La biosíntesis de PSA-NCAM es regulada por la activación celular, tal es el caso de la actividad eléctrica de los axones, asimismo por la influencia de la expresión en la célula diana. La expresión de los niveles de PSA es regulada por vías no transcripcionales, como es el incremento intracelular de Ca^{2+} evocado por los receptores NMDA, induciendo excitotoxicidad o endocitosis de PSA-NCAM con incremento en la expresión o degradación respectivamente³²⁵.

Para la metástasis al cerebro, las masas tumorales necesitan atravesar la barrera hemato-encefálica. La barrera hemato-encefálica es considerada como un complejo casi impermeable y selectivo. Difiere en su estructura general de otras barreras vasculares³²⁶. Es atravesada por células tumorales mediante la participación de moléculas de adhesión. Algunas moléculas de adhesión implicadas son las integrinas, las selectinas^{327,328} y las cadherinas NCAM en la forma polisialilada (PSA-NCAM)³²⁹. Esta última, se ha sugerido que podría promover la génesis y progresión de células tumorales con fenotipo agresivo³³⁰.

CAPÍTULO 7

Lectinas, cáncer primario y metástasis

Existen diversos estudios respecto a los cambios en la glicosilación asociados con el cáncer^{6,7}. Incluso ha sido descrito el impacto en el cambio fenotípico de las células mediado por la expresión de estructuras glicosídica en particular²⁶³⁻²⁶⁵. También han sido caracterizadas algunas de las rutas metastásicas de diversos tipos de cánceres. Sin embargo, poco se sabe respecto de los cambios en los glicoconjugados presentes en las células transformadas a la malignidad y la metástasis al cerebro. Más aún, las vías celulares y moleculares implicadas en la migración metastásica tumoral al cerebro se desconocen a la fecha.

De las diversas vías a través de las cuales es posible identificar a los carbohidratos implicados en estos tipos de modificaciones, las lectinas son una herramienta útil, valiosa, de fácil manejo y relativamente de menor costo económico que el resto de los procedimientos. La diversidad de lectinas específicas para diversas estructuras sacarídicas ofrece la posibilidad de realizar este tipo de investigaciones de manera más sencilla, en menor tiempo y a menor costo.

La posibilidad de identificar los cambios de los glicoconjugados involucrados en la metástasis al cerebro, además de ampliar el conocimiento en torno a los mecanismos íntimos involucrados en el fenómeno tumoral y metastásico, ofrece la posibilidad de aplicaciones futuras en los campos del diagnóstico temprano, como marcadores tumorales tempranos; terapéuticos, como blancos específicos; o preventivos de metástasis o modificadores de la conducta biológica de estirpes agresivas y potencialmente metastásicas a fenotipos involutivos no proliferantes y con bajo o nulo potencial metastásico.

CAPÍTULO 8

Planteamiento del problema

¿Existen modificaciones diferenciales en el patrón de glicosilación de los ácidos siálicos entre tumores primarios y metastásicos al cerebro?

Hipótesis

Los tumores metastásicos en cerebro exhiben patrones de glicosilación del ácido siálico que difieren de los tumores primarios y de los estadios sanos, mismos que podrían favorecer la implantación a distancia.

Justificación

Una condición grave del cáncer es la metástasis al cerebro. No se han descrito las modificaciones en la glicosilación de tumores metastásicos cerebrales, ni las posibles interacciones que podrían tener con ligandos a carbohidratos.

Objetivos

General:

Identificar los patrones de glicosilación del ácido siálico en órganos sanos, carcinomas primarios y metastásicos a cerebro

Particulares:

1. Identificar los sialoglicoconjugados presentes en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro mediante el uso de lectinas
2. Identificar la inmunexpresión de los antígenos cerebrales GFAP y sinaptofisina asociados al órgano invadido (cerebro)
3. Asociar la co-expresión de antígenos relacionados con la transformación celular maligna (NCAM y PSA-NCAM) y la presencia de estructuras glicosídicas específicas

CAPÍTULO 9

Materiales

9.1. Muestras biológicas

Se emplearon 18 muestras de carcinomas metastásico a cerebro humano de diverso origen: mamario (adenocarcinoma canalicular, $n=4$), pulmonar (adenocarcinoma pulmonar, $n=6$), renal (adenocarcinoma renal de células claras, $n=4$), piel (melanoma cutáneo maligno, $n=2$), y tiroideo (adenocarcinoma folicular, $n=2$). 24 muestras de carcinomas primarios humano de diverso origen: mamario (adenocarcinoma canalicular, $n=7$), pulmonar (adenocarcinoma pulmonar, $n=4$), renal (adenocarcinoma de células claras, $n=3$), piel (melanoma cutáneo maligno, $n=5$), y tiroideo (adenocarcinoma folicular, $n=5$). 18 muestras de órganos sanos humanos como control de origen mamario ($n=5$), renal ($n=2$), piel ($n=5$), y tiroideo ($n=3$).

Las muestras fueron obtenidas del Departamento de Neuropatología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, S.S.A.; del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología, S.S.A.; del Servicio de Cirugía Plástica y Reconstructiva del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, S.S.A.; y de la opción técnica en histopatología de la Escuela Nacional Preparatoria plantel 1 “Gabino Barreda”, U.N.A.M. Se contó con el consentimiento informado de los pacientes, así como la evaluación, aprobación y vigilancia del Comité Científico y de Ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, bajo el proyecto de investigación registrado con número /25/04.

En todos los casos el diagnóstico histopatológico de los cortes histológicos fue confirmado de manera independiente por tres especialistas en anatomía patológica.

9.2. Lectinas.

Las lectinas utilizadas se especifican en la tabla 1. Las lectinas MeA, ALL y MRL fueron purificadas de semillas de cactus por cromatografía de afinidad en mucin-Sepharose 4B³³¹, marcadas con ésteres de *N*-hidroxisuccinimida de biotina (Pierce Chem Co., Rockford, IL,

USA)³³² en un rango de 2:1. El resto de las lectinas biotiniladas fueron obtenidas comercialmente (EY Labs, San Mateo, CA, USA).

Lectina	Abreviación*	Especificidad	Dilución
<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL	Gal-beta-1,3GalNAc-alfa-1,0-Ser/Thr	1:20 mil
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	Gal-beta-1,3GalNAc-alfa-1,0-ol, Gal/GalNAc/GlcNAc	1:100
<i>Machaerocereus eruca</i>	MeA	Fuc-alfa-1,2(GalNAc-alfa-1,3)Gal-beta-1,4	1:100
<i>Limulus polyphemus</i>	LPA	Neu5Ac	1:100
<i>Maackia amurensis</i>	MAA	Neu5Ac-alfa-2,3Gal-beta-1,4	1:100
<i>Sambucus nigra</i>	SNA	Neu5Ac-alfa-2,6Gal-beta-1,4	1:100
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	MRL	Neu5,7,9Ac2	1:100
<i>Lens culinaris</i>	LcH	alfa-Man/alfa-Glc	1:100
Concanavalina A	Con-A	alfa-Man	1:100
<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA	alfa-2,4Fuc	1:100

Tabla 1. Lectinas empleadas en el proyecto para identificar las estructuras glicosídicas presentes en las muestras de órganos de origen humano. *La abreviación está tomada de la página de abreviaciones de lectinas de la Universidad de Copenhagen³³³.

9.3. Anticuerpos.

Los anticuerpos primarios (tabla 2) utilizados fueron: anticuerpo policlonal de conejo anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (Dako, Carpinteria, CA, USA); monoclonal del ratón anti-sinaptofisina (Chemicon, Billerica, MA, USA) y monoclonal de conejo anti-galectina-3 (SpringBio, Pleasanton, CA, USA).

Anticuerpo	Origen	Reactividad (especies)	Dilución utilizada
Anti-GFAP	Policlonal de conejo	Humano, perro, gato, ratón	1:100
Anti-sinaptofisina	Monoclonal de ratón (IgG)	Humano y hámster	1:100
Anti-NCAM	Monoclonal de ratón (IgG)	Humano	1:100
Anti-PSA-NCAM	Monoclonal de ratón (IgM)	Todas las que expresen	1:100

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en el proyecto para identificar las estructuras antigénicas presentes en las muestras.

Los anticuerpos secundarios (tabla 3) bioespecíficos fueron: anti-IgG (H+L) de cerdo anti-ratón conjugado con rodamina-Red-X; anti-IgG (H+L) de cerdo anti-conejo conjugado con lissamina-rodamina (ambos de Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA USA); anti-IgM de cabra anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Vector, Burlingame, CA USA).

Anticuerpo	Reactividad	Fluorocromo	Dilución utilizada
Cerdo anti-ratón	Anti-IgG (H+L)	Rhodamina-Red-X	1:100
Cerdo anti-conejo	Anti-IgG (H+L)	Lissamina-rhodamina	1:100
Cabra anti-ratón	Anti-IgM	Isotiocianato de fluoresceína	1:100

Tabla 3. Anticuerpos secundarios empleados en el proyecto para identificar los anticuerpos primarios.

CAPÍTULO 10

Métodos

10.1. Fijado e inclusión de las muestras en parafina

Las muestras obtenidas de biopsias o necropsias fueron fijadas en una solución de paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.4, 0.1M. Las muestras se incluyeron en parafina³³⁴. Las laminillas sobre las cuáles se adhirieron los especímenes se prepararon con silano como adherente (Sigma, St. Louis, MO, USA). Los bloques conteniendo las muestras fueron cortados en micrótopo Histocut Reichter-Jung (Cambridge Instruments GmbH, Munich, Germany) siguiendo los procedimientos de rutina³³⁵. Los fragmentos cortados a 5 µm de espesor fueron montados en las laminillas previamente preparadas con silano, mediante baño de flotación (Tissue Float Bath, Lab Line, USA) a ~52°C con agua corriente reposada toda la noche anterior y agregando 3.0 gr de grenetina (Merk, México).

10.2. Técnica básica de Hematoxilina y eosina

A los cortes histológicos adheridos a portaobjetos se les sometió a desparafinado y rehidratado con pasos de concentraciones decrecientes de solventes orgánicos desde xilol hasta alcohol al 70%. Se sumergieron en solución de hematoxilina de Gill por cerca de 2 minutos y se lavaron con agua destilada. Luego se sumergieron por ~20 segundos en solución de eosina. Finalmente se aclararon las muestras y deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol hasta xilol y se montaron con resina hidrofóbica Poly-mount (PolySciences, Warrington, PA, USA).

10.3. Histoquímica con lectinas para microscopía de luz de campo claro

Los cortes histológicos adheridos a portaobjetos se sometieron a desparafinado y rehidratado con pasos de concentraciones decrecientes xilol hasta alcohol al 70%. Los lavados se hicieron con PBS 0.1M pH 7.4. Debido a que se realizaba un ensayo con peroxidasa de raíz

fuerte, se bloqueó la peroxidasa endógena sumergiendo las muestras en peróxido de hidrógeno (Drogas Tacuba, México) al 0.8% en agua desionizada por 15 minutos. Luego de un lavado con PBS, se secaron las laminillas y se delimitó la zona tisular con plumón hidrofóbico (ImmEdge Pen, Vector, Burlingame, CA, USA) alrededor de la muestra para incubar las muestras con albúmina bovina sérica libre de IgG al 2% (BSA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego se incubaron las muestras con Tritón X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 0.2% en PBS por 10 minutos. Se lavaron exhaustivamente con PBS adicionado con CaCl_2 1mM pH 7.4 y se incubaron las muestras con las lectinas biotiniladas a 37°C en cámara húmeda por dos horas. Luego se incubaron las muestras con extravidina marcada con peroxidasa de raíz fuerte (Sigma, St. Louis, MO, USA) (dilución 1:60) por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. El revelado se realizó con un sistema a base de diaminobenzidina (Sigma, St. Louis, MO, USA) y peróxido de hidrógeno, y se contratiñeron con hematoxilina de Gill. Finalmente se deshidrataron con pasos crecientes de solventes orgánicos desde alcohol al 70% hasta xilol y se montaron las preparaciones con resina hidrofóbica Poly-mount (PolySciences, Warrington, PA, USA).

10.4. Histoquímica con lectinas para microscopía de fluorescencia

Las histoquímicas con lectinas para microscopía de fluorescencia fueron similares a la descrita anteriormente. Los cortes histológicos adheridos a portaobjetos se sometieron a desparafinado y rehidratado con pasos de concentraciones decrecientes de solventes orgánicos desde xilol hasta alcohol al 70%. Los lavados se hicieron con PBS 0.1M pH 7.4. Se secaron las laminillas y se delimitó la zona tisular con plumón hidrofóbico (ImmEdge Pen, Vector, Burlingame, CA, USA) alrededor de la muestra para incubar las muestras con BSA al 2% (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego se incubaron las muestras con Tritón X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 0.2% en PBS por 10 minutos. Se lavaron exhaustivamente con PBS adicionado con CaCl_2 1mM pH 7.4 y se incubaron las

muestras con las lectinas biotiniladas a 37°C en cámara húmeda por dos horas. Luego se incubaron las muestras con extravidina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (dilución 1:60) protegiendo las muestras de la exposición a la luz, en cámara húmeda opaca a 37°C 1 hora. Las preparaciones se montaron con medio VectaShield conjugado con DAPI, un intercalador de ácidos nucleicos (4',6-diamidino-2-fenilindol) a oscuras y se sellaron los cubreobjetos con barniz de uñas.

10.5. Inmunohistoquímica de doble marca para microscopía de fluorescencia

Se desparafinaron y rehidrataron las muestras. Los lavados se realizaron con PBS 0.1M pH 7.4. Las muestras se sometieron a recuperación antigénica a base de calor con horno de microondas, sumergiendo las laminillas en amortiguador de citratos (citrato de sodio 0.1M y ácido cítrico 0.1M) por 3 minutos 30 segundos, vigilando la ebullición del amortiguador sin que se esponga la muestra. Luego de dejar que las laminillas alcancen la temperatura ambiente, se incubaron con BSA al 2% en PBS libre de IgG por 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda y después con Tritón X-100 al 0.2% en PBS por 10 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego se incubaron las muestras con las lectinas biotiniladas durante 2 horas a 37°C en cámara húmeda y después con extravidina-FITC (dilución 1:60) durante una hora a 37°C en cámara húmeda. Luego de un lavado con PBS, se incubaron las preparaciones con el anticuerpo primario dilución 1:100 toda la noche a 4°C en cámara húmeda y protegidas de la luz. A la mañana siguiente, se incubaron con el anticuerpo secundario bioespecífico dilución 1:100 marcado con el fluorocromo durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegidas de la luz. Las preparaciones se montaron con medio VectaShield conjugado con DAPI (Vector, Burlingame, CA, USA) a oscuras, y se sellaron los cubreobjetos con barniz de uñas.

10.6. Especificidad de la interacción lectínica

Para determinar la especificidad de la interacción de las lectinas con las muestras, realizamos ensayos de control histoquímico incubando las lectinas con 100 mM de GalNAc y lactosa para ALL y PNA; fenil- β -Gal u oligosacáridos de mucina de estómago porcino en PBS para MeA; 0.1 M de α -2,3-sialilactosa para MAA y α -2,6-sialilactosa para SNA, antes de añadirlas a las muestras.

10.7. Ensayos enzimáticos de digestión peptídica con tripsina, o hidrólisis de ácido siálico con neuraminidasa de *Clostridium perfringens*

La digestión peptídica se realizó sobre muestras que se desparafinaron y re-hidrataron de forma similar a la descrita anteriormente. Los lavados se realizaron con PBS 0.1M pH7.4. Las muestras se incubaron con tripsina al 2% (Gibco, Carlsbad, CA, USA) en solución de NaCl isotónica (0.9%) o con 0.1 U. I. de neuraminidasa tipo V de *Clostridium perfringens* (Sigma, St. Louis, MO, USA) a diferentes tiempos (30, 45, 60, 90 y 120 minutos) a 37°C en cámara húmeda. Luego se sometieron las muestras al protocolo descrito para histoquímicas con lectinas para microscopía de fluorescencia.

10.8. Microscopía de luz de campo claro

La microscopía de luz de campo claro se realizó con un microscopio Leica DM/LS (Wetzlar, GMBH) con objetivos de 10X, 20X, 40X, 63X y 100X. 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 (Leica, Heerburg, Switzerland).

10.9. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia se realizó con un microscopio Leica DM/LS (Wetzlar, GMBH) con objetivos de 10X, 20X, 40X, 63X y 100X; 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 (Leica, Heerburg, Switzerland).

CAPÍTULO 11

Resultados

11.1. Histoquímicas con lectinas

11.1.1. Histoquímica con lectinas en cerebro sano.

La medición de la intensidad de la interacción a través de la fluorescencia se cuantificó arbitrariamente asignando una cruz, o uno (+, 1) a la menor y se designó como *baja*; dos cruces o dos (++, 2) a la *mediana* y tres cruces o tres (+++, 3) a la máxima y se designó como *alta*. La ausencia de fluorescencia indicó que no hubo interacción de la lectina con su ligando y se expresó en forma de negativo o cero (-, 0). La intensidad intermedia se asignó como mas/menos o un medio (\pm , 0.5).

En las muestras cerebrales sanas (Figura 9) observamos reactividad tanto a la lectina de ALL como a PNA de manera similar. La reactividad con lectinas LPA, MRL, MAA y SNA que reconocen residuos de ácido siálico fue baja. Los residuos de α -D-manosa y α -D-glucosa que reconoce la lectina Con-A, al igual que los residuos de ácido siálico, fueron de baja intensidad en ambas muestras. No se encontró reactividad a las lectinas LcH, MeA ni LTA, por lo tanto, carecen de residuos manosídicos con *core* quitobiosil y β -1,6-fucosilados en terminales reducidas de GlcNAc, que interaccionan con LcH; Fuc- α -1,2(GalNAc- α -1,3)Gal- β -1,4 al que tiene afinidad MeA; ni α -L-Fuc que identifica LTA.

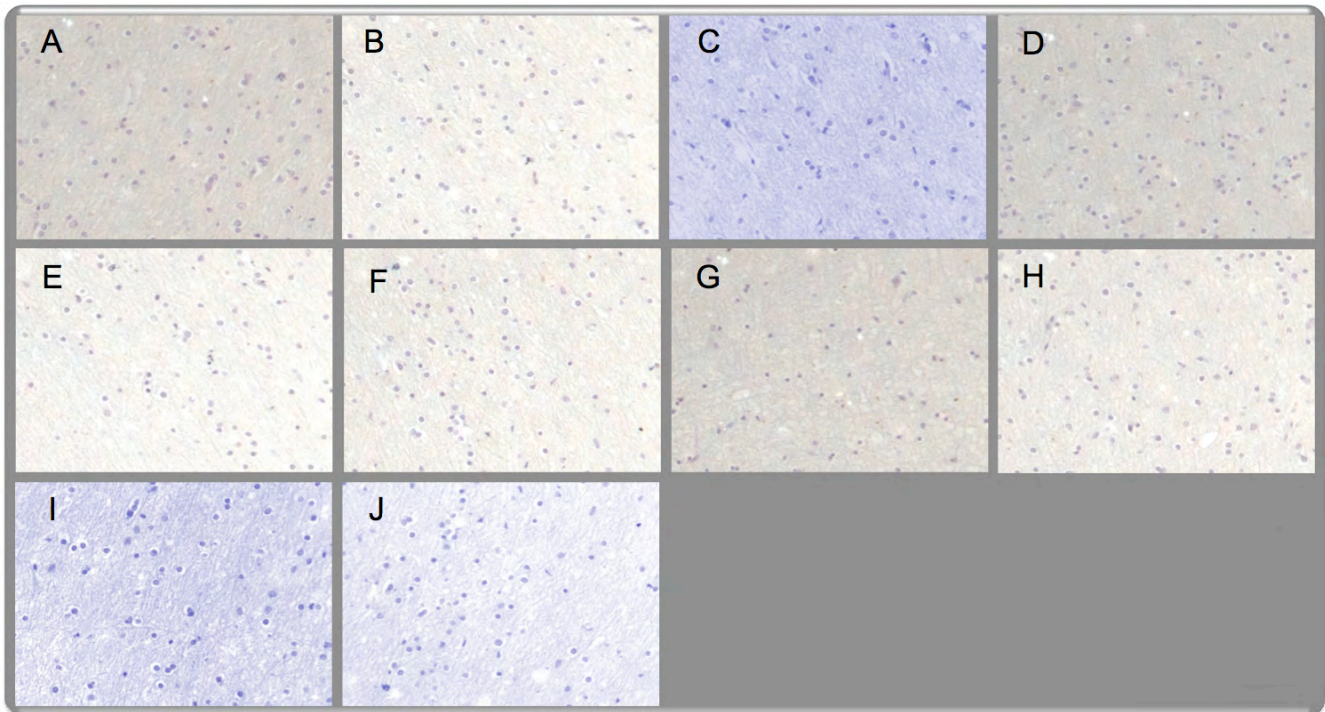


Figura 9. Histoquímica con lectinas para microscopía de luz de campo claro en cerebro sano humano. Técnica de contratinción con hematoxilina de Gill (núcleos). La interacción de las lectinas con su ligando se visualizó mediante la presencia del precipitado café-marrón de la reacción con la diaminobenzidina (positivo). La ausencia de interacción no muestra el precipitado café-marrón (negativo) y se observan sólo las preparaciones color violeta por la hematoxilina. Los núcleos se visualizan en color violeta intenso. Lectinas, A: ALL. B: PNA. C: MeA. D: LPA. E: MAA. F: SNA. G: MRL. H: Con-A. I: LcH. J: LTA. 400X.

11.1.2. Lectina *Amaranthus leucocarpus* (ALL) (Figura 10)

11.1.2.1. Órganos sanos

11.1.2.1.1. Mama

Las muestras de mama sana mostraron epitelio de tipo glandular con estructuras canaliculares normales, sin atipia ni alteraciones fenotípicas. El estroma se observó íntegro, con abundante tejido conectivo y escasos núcleos celulares. 3 de 5 muestras fueron intensamente positivas a ALL y 2 medianamente positivas. La interacción de ALL se observó una positividad intensa en forma homogénea en la región del estroma, diseminada en toda la muestra formando fibras densamente fluorescentes. Las muestras fueron pobremente positivas en las regiones glandulares. En éstas últimas estructuras, la interacción de ALL con su ligando O-glicopeptídico fue irregular, en forma de pequeñas zonas en parches pobremente positivos o no se observó

positividad. La positividad de mediana intensidad se observó principalmente en las zonas de células mioepiteliales periglandulares en forma homogéneamente distribuida.

11.1.2.1.2. Tiroides

En las muestras de tiroides sanas se observó la presencia de epitelio simple cuboidal de células foliculares formando tabiques con grandes espacios vacíos (folículos) y tejido conectivo denso y células parafoliculares. En ninguna de las muestras se observó reactividad a ALL.

11.1.2.1.3. Riñón

En las muestras de riñón sano se observaron estructuras glomerulares de características histológicas normales, simétricos y con vasos sanguíneos de calibre normal; se observaron zonas glandulares rodeadas de células mioepiteliales e inmersas en tejido conectivo denso con moderada cantidad de núcleos celulares. No se observó atipia ni polimorfismo celular. Se observó escasa presencia de hiper celularidad de tipo infiltrativa en el hilio de predominio linfocitario. No se observó microangiopatía, edema perivascular, ni tubulointersticial. Todas las muestras fueron fluorescentes en forma similar de intensidad. En la histoquímica con ALL se observó una positividad de mediana intensidad en forma homogénea en las zonas del estroma (tejido conectivo), y alta intensidad en las áreas glandulares. Las estructuras glomerulares fueron intensamente reactivas en las zonas periféricas, marcando el contorno de las mismas. La fluorescencia se observó en forma homogénea, con distribución diseminada. No se observó positividad a ALL en las zonas del hilio ni en las estructuras vasculares.

11.1.2.1.4. Piel

En las muestras de piel sana se observó la epidermis con tejido estratificado de espesor normal y la lámina basal delimitando la dermis con abundante tejido conectivo y moderada cantidad de estructuras celulares. Se observó ligera atipia celular con datos histológicos compatibles con edema e infiltrado celular de predominio linfocitario. Todas las muestras se observaron con una intensidad similar. En la histoquímica con ALL las muestras fueron positivas de mediana intensidad y homogénea en la zona de la dermis. La epidermis se observó de baja

intensidad en forma homogénea. No se observó positividad a ALL en las zonas perivasculares ni en la luz vascular.

11.1.2.2. Carcinomas primarios

11.1.2.2.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

Las muestras de adenocarcinoma canalicular de mama fueron clasificadas con grado histológico II y III. Todos los carcinomas primarios de mama presentaron alto grado de componente intraductal con necrosis de tipo comedo y pobremente diferenciado. En la histoquímica con ALL, cinco de siete muestras se observaron con alta intensidad de fluorescencia. Las muestras mostraron positividad de mediana a alta intensidad principalmente en las regiones glandulares comparado con lo observado en el tejido conectivo. Las estructuras acinares se observaron homogéneas fluorescentes delimitando el contorno celular. La zona de células mioepiteliales se observó tenue, de baja intensidad de fluorescencia, en forma homogénea. El tejido conectivo se observó de mediana a baja intensidad en forma homogénea difusa.

11.1.2.2.2. Adenocarcinoma de pulmón

Las muestras de adenocarcinomas pulmonares mostraron células bien diferenciadas, con componente glandular sólido y células vacuoladas. Se observaron zonas con edema perivascular de tipo vasculogénico; polimorfismo nuclear con nucléolos prominentes y estructuras papilares. Dos de cuatro muestras se observaron con alta intensidad de fluorescencia, una con mediana y una con baja intensidad de fluorescencia. Las muestras fueron de positividad baja, mediana y alta a ALL en forma homogénea tanto en el estroma como en las formas papilares y glandulares. La fluorescencia fue difusa, sin que se observaran patrones específicos.

11.1.2.2.3. Adenocarcinoma folicular de tiroides

Los adenocarcinomas tiroideos foliculares se observaron con total pérdida de la estructura folicular, formando papilas difusas con escaso espacio papilar. Se observó polimorfismo nuclear con atipia. Las células parafoliculares se fusionaron con los folículos formando una placa densa y

polimórfica. En las histoquímicas, 3 de 4 muestras se observaron con baja intensidad de fluorescencia y solo 1 fue de mediana intensidad. Las muestras mostraron una positividad de baja a mediana intensidad a ALL, siendo la baja intensidad la que prevaleció y con predominio en las zonas perifoliculares. La fluorescencia se observó homogénea difusa tanto en las zonas para-foliculares como foliculares.

11.1.2.2.4. Adenocarcinoma renal de células claras

En las muestras de adenocarcinoma renal, se observó pérdida de las estructuras glomerulares, las cuales se restringen a formas pseudoacinares tabicadas con tejido conectivo fibroso denso. Se observó abundante depósito glandular denso y de tipo papilar; polimorfismo nuclear y atipia con nucléolos prominentes. Dos de tres muestras se observaron con alta intensidad de fluorescencia. En las muestras la positividad a ALL se observó con alta intensidad en las zonas del estroma tisular y de mediana intensidad en las regiones glandulares en forma homogénea. En las zonas glomerulares se observaron patrones puntiformes vesiculares de intensa fluorescencia diseminados espaciadamente.

11.1.2.2.5. Melanoma cutáneo maligno

La muestra de melanoma cutáneo maligno mostró hiperplasia epitelial con pérdida de la basal e intenso infiltrado celular en la dermis de predominio linfocitario. Se observó atipia nuclear con polimorfismo y un incremento en las formas celulares en la dermis con estructuras papilomatosas con células gigantes multinucleadas. Cuatro de cinco muestras se observaron con mediana intensidad de fluorescencia. La positividad a ALL se observó con distribución homogénea en la dermis de predominio en estructuras papilomatosas y el estroma. La epidermis se observó homogénea de mediana intensidad de positividad.

11.1.2.3. Metástasis a cerebro

11.1.2.3.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

Las masas tumorales metastásicas de origen mamario se ubicaron en regiones corticales temporal y parietal. Estos tumores metastásicos presentaron polimorfismo y atipia nuclear, con

nucléolos prominentes y alto grado de mitosis. Las muestras mostraron una intensa reacción dermoepitelial, con pobre diferenciación y necrosis en más del 80%. 3 de 4 muestras fueron de mediana intensidad de fluorescencia y en una no se observó la interacción de ALL con su ligando. En contraste con los tumores primarios, las metástasis mostraron baja positividad a ALL en las zonas del estroma y células mioepiteliales; mientras que las estructuras pseudoglandulares fueron altamente positivas a ALL. El estroma se observó positivo de forma heterogénea, en parches difusos. Las estructuras acinares y pseudoglandulares se observaron homogéneamente positivas.

11.1.2.3.2. Adenocarcinoma pulmonar

En las metástasis se observó pérdida de las estructuras glandulares, las cuales forman estructuras papilomatosas con abundante tejido conectivo infiltrado con abundantes células que forman empalizadas alrededor de estructuras pseudoglandulares. Se observó la presencia de un componente glandular sólido y abundantes células vacuoladas. Zonas con edema perivascular de tipo vasculogénico, polimorfismo y atipia nuclear con células moderadamente diferenciadas. Cuatro de seis muestras fueron medianamente positivas a ALL y en dos no se observó positividad. Las metástasis que mostraron positividad a ALL de mediana intensidad, ésta se observó en forma homogénea difusa con predominio en las estructuras pseudoglandulares.

11.1.2.3.3. Adenocarcinoma renal de células claras

Las muestras renales mostraron patrones celulares de tipo células claras con tabiques fibrosos densos que contenían racimos celulares con atipia y polimorfismo nuclear. Se observó abundante depósito glandular denso y papilar con abundante necrosis y hemosiderina; células fantasmas y hemorragia; polimorfismo nuclear y atipia con nucléolos prominentes. La intensidad de interacción fue irregular, siendo una de cuatro muestras de mediana, una de baja intensidad y en dos no se observó fluorescencia. En las metástasis, el patrón de reactividad a ALL aunque irregular, se observó con predominio en los tabiques fibrosos de tejido conectivo en forma de parches difusos.

11.1.2.3.4. Adenocarcinoma folicular de tiroides

En las muestras de metástasis de origen tiroideo se observaron células moderadamente diferenciadas, infiltrado papilomatoso en las zonas del estroma, polimorfismo y atipia nuclear con células fantasma. Abundante necrosis y hemosiderina con nidos tumorales dispersos. Todas las muestras fueron positivas a ALL. La interacción de ALL fue intensa de forma homogénea, de predominio en el estroma tisular y las estructuras papilomatosas. Las zonas pseudofoliculares y parafoliculares se observaron en forma homogénea aunque con menor intensidad de fluorescencia. No se observaron estructuras vasculares.

11.1.2.3.5. Melanoma cutáneo maligno

La metástasis de melanoma cutáneo maligno se observó con abundante necrosis tipo comedo, con células gigantes multinucleadas, polimorfismo y atipia nuclear, nucléolos prominentes y mitosis. Se observaron células melánicas con depósitos vacuolados de regular cantidad. Ninguna de las muestras de metástasis al cerebro fue positiva a ALL. La fluorescencia observada sólo correspondió a los núcleos en el canal azul.

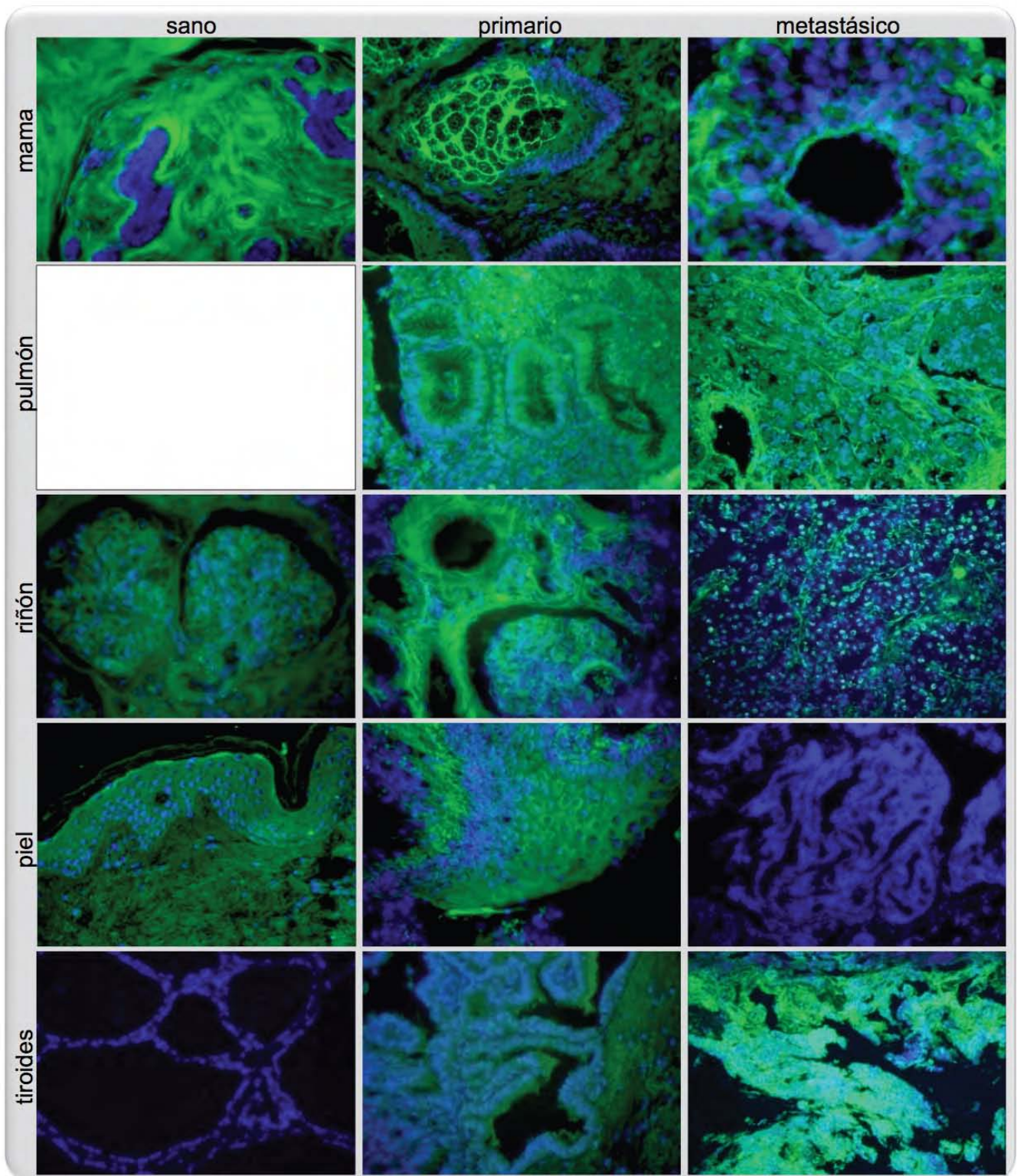


Figura 10. Histoquímicas con lectina ALL en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro. Lectina en canal verde (FITC), núcleos en canal azul (DAPI). 400X.

11.1.3. Lectina *Arachis hypogaea* (PNA) (Figura 11)

11.1.3.1. Órganos sanos

11.1.3.1.1. Mama

Todas las muestras de mama sana se observaron con positividad medianamente intensa. La interacción de PNA, se observó de predominio en la región del estroma. No se observó positividad en las estructuras acinares, ni en las zonas de células mioepiteliales, así como en los elementos vasculares.

11.1.3.1.2. Tiroides

2 de 3 muestras fueron intensamente positivas a PNA. La intensidad de positividad a PNA fue de mediana a alta, y se observó restringida a zonas de células foliculares y en menor proporción al estroma. La distribución fue homogénea y no se observó en las zonas glandulares. La mayor intensidad se observó en las regiones perifoliculares.

11.1.3.1.3. Riñón

Todas las muestras de riñón mostraron una interacción de baja intensidad a PNA en forma homogénea tanto en las zonas del estroma (tejido conectivo) como en las áreas glandulares. Las estructuras glomerulares fueron pobremente fluorescentes en las zonas periféricas. En el resto de las estructuras no se observó interacción con PNA.

11.1.3.1.4. Piel

4 de 5 muestras de piel fueron de intensidad media de fluorescencia. Las muestras fueron de mediana a alta intensidad de reactividad a PNA, predominando la mediana intensidad en forma homogénea tanto en la epidermis como en la dermis. No se observó positividad en zonas vasculares ni perivasculares.

11.1.3.2. Carcinomas primarios

11.1.3.2.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

En 6 de 7 muestras se observó una baja intensidad de positividad a PNA. La interacción de PNA se observó principalmente en las regiones acinares, periglandulares, en zonas de células

mioepiteliales e intraductales en forma homogénea. El resto del tejido conectivo se observó pobremente fluorescente con zonas heterogéneas en forma de parches.

11.1.3.2.2. Adenocarcinoma pulmonar

Se observaron 2 de 4 muestras con baja intensidad de positividad, 1 con mediana y 1 con alta. La interacción se observó en forma homogénea tanto en el estroma como en las formas papilares y glandulares. No se observó fluorescencia en estructuras vasculares.

11.1.3.2.3. Adenocarcinoma folicular de tiroides

En las muestras de tiroides, 3 de 4 muestras se observaron con mediana intensidad de positividad y una con alta intensidad de fluorescencia. La interacción de PNA se observó con predominio en las zonas perifoliculares en forma homogénea distribuida tanto en el estroma como en las estructuras papilares y foliculares.

11.1.3.2.4. Adenocarcinoma renal de células claras

Todas las muestras renales se observaron con baja intensidad de positividad a PNA. La positividad se observó en forma homogénea tanto en las regiones del estroma como en las zonas glomerulares y glandulares principalmente. Las regiones hiliares no se observaron fluorescentes.

11.1.3.2.5. Melanoma cutáneo maligno

3 de 5 muestras de melanoma cutáneo maligno se observaron con alta intensidad de positividad a PNA, y dos muestras con mediana intensidad. La positividad se observó con distribución homogénea en la dermis y de predominio en estructuras papilomasas y del estroma. En estas últimas, se distribuyó en forma de bandas densamente fluorescentes periacinares.

11.1.3.3. Metástasis a cerebro

11.1.3.3.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

El patrón de fluorescencia se observó irregular, siendo una de cuatro muestras medianamente intensa la positividad a PNA, una con intensidad baja y en el resto de las

muestras no se observó fluorescencia. La positividad se observó principalmente en las estructuras pseudoglandulares. Las regiones del estroma mostraron pobre y heterogénea intensidad o no fueron positivas a PNA.

11.1.3.3.2. Adenocarcinoma pulmonar

3 de 6 muestras se observaron con mediana intensidad y 3 con alta intensidad de fluorescencia. La positividad a PNA se observó en forma homogénea difusa con predominio en las estructuras pseudoglandulares (con alta intensidad de fluorescencia), y de mediana a alta intensidad en el estroma tisular.

11.1.3.3.3. Adenocarcinoma renal de células clara

La positividad a PNA se observó irregular. 2 de 4 muestras se observaron con mediana intensidad, 1 con alta intensidad y en 1 no se observó fluorescencia. La interacción con PNA se observó con predominio en los tabiques fibrosos de tejido conectivo. Las zonas de nidos tumorales fueron las que se observaron con la menor intensidad de fluorescencia y con mayor heterogeneidad.

11.1.3.3.4. Adenocarcinoma folicular de tiroides

En ambas muestras se observó un patrón de positividad a PNA homogéneo, intensamente fluorescente, de predominio en estructuras papilares y perifoliculares. Las zonas del estroma y parafolicular se observaron con menor intensidad de fluorescencia, siendo de mediana intensidad.

11.1.3.3.5. Melanoma cutáneo maligno

1 de las muestras de piel se observó de baja intensidad de fluorescencia, mientras que la otra se observó de mediana intensidad, con patrones de distribución homogénea. La mayor intensidad estuvo presente en estructuras papilomatosas inmersas en tejido conectivo. El estroma fue en el que se observó la menor intensidad de fluorescencia.

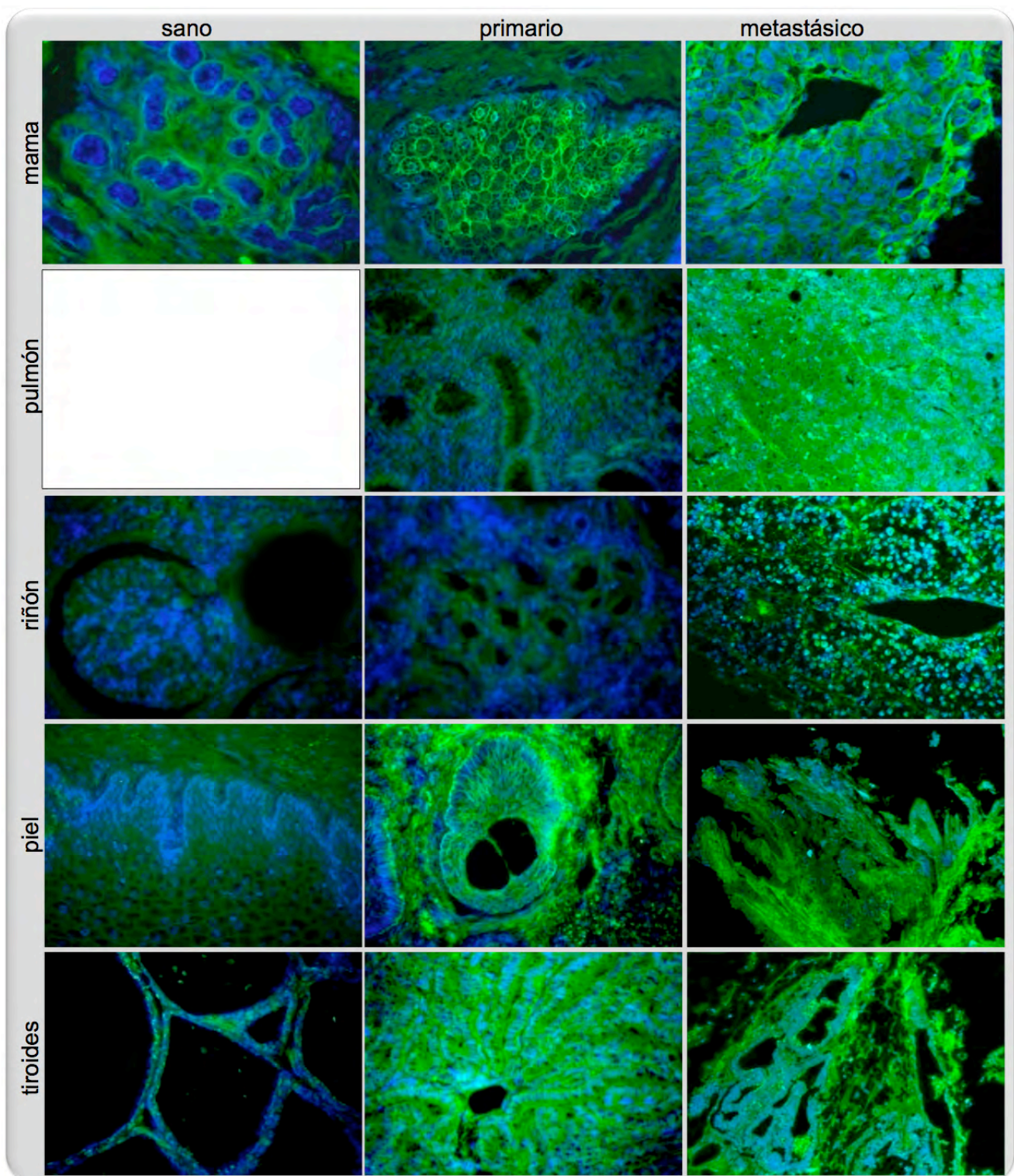


Figura 11. Histoquímicas con lectina PNA en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro. Lectina en canal verde (FITC), núcleos en canal azul (DAPI). 400X.

11.1.4. Lectina *Machaerocereus eruca* (MeA) (Figura 12)

11.1.4.1. Órganos sanos

11.1.4.1.1. Mama

En ninguna de las muestras de mama sana se observó positividad a MeA. Sólo se visualizaron los núcleos fluorescentes en canal azul (DAPI).

11.1.4.1.2. Tiroides

Todas las muestras de tiroides mostraron un patrón de interacción de MeA con su ligando similar. En todas las muestras se observó una escasa y débil intensidad de fluorescencia en forma heterogénea, diseminada en forma de parches amorfos, de predominio de zonas foliculares. En el resto de la muestra (el estroma, zonas parafoliculares y folículo) no se observó fluorescencia.

11.1.4.1.3. Riñón

En ninguna de las muestras se observó fluorescencia de la interacción de MeA con su ligando específico. Sólo se observaron núcleos fluorescentes en canal azul.

11.1.4.1.4. Piel

En ninguna de las muestras se observó fluorescencia positiva con MeA. Sólo se observaron núcleos fluorescentes en canal azul.

11.1.4.2. Carcinomas primarios

11.1.4.2.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

2 de 7 muestras se observaron con baja intensidad de fluorescencia. El resto, 5 muestras, se observaron con mediana intensidad. La interacción positiva de MeA con su ligando sacarídico se observó con mayor intensidad en las zonas glandulares y periglandulares. La zona de células mioepiteliales se observó con mediana intensidad. Tanto en las estructuras glandulares como en las periglandulares la positividad fue homogénea difusa. Tanto el estroma tisular como el resto de las estructuras se observaron con baja intensidad o no se observó positividad. En estas últimas, la positividad se observó en forma homogénea.

11.1.4.2.2. Adenocarcinoma pulmonar

Se observaron 3 de 4 muestras con baja intensidad de fluorescencia y 1 con mediana intensidad a MeA con predominio en el estroma. Las zonas peripapilares fueron las más intensamente fluorescentes comparado con el resto. La fluorescencia se observó de forma homogénea distribuida en la muestra. Las zonas interglandulares fueron pobremente fluorescentes.

11.1.4.2.3. Adenocarcinoma folicular de tiroides

3 de 4 muestras se observaron con baja intensidad de fluorescencia y una con mediana intensidad. La interacción de MeA se observó en patrones homogéneos difusos en toda la muestra. La zona perifolicular fue la que presentó la mayor intensidad, siendo el estroma y las zonas foliculares pobremente fluorescentes.

11.1.4.2.4. Adenocarcinoma renal de células claras

Las 3 muestras se observaron con baja intensidad de fluorescencia en patrones heterogéneos de predominio en las zonas glomerulares. Las zonas periglandulares, hiliares, mioepiteliales y el estroma se observaron pobremente positivas o no se observó fluorescencia. En todos los casos, los patrones fueron en forma de parches irregulares con MeA.

11.1.4.2.5. Melanoma cutáneo maligno

4 de 5 casos se observaron con intensidad de fluorescencia baja. La interacción de MeA con su ligando se observó en forma de parches irregulares diseminados fundamentalmente en el estroma celular. La mayor intensidad de fluorescencia estuvo presente en las zonas periacinares de la dermis. El resto de la muestra se observó pobremente fluorescente o no se observó fluorescencia.

11.1.4.3. Metástasis a cerebro

11.1.4.3.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

La reactividad a MeA en 4 de 5 muestras se observó con mediana intensidad de fluorescencia. La fluorescencia estuvo presente en forma homogénea principalmente en las

estructuras acinares y en las zonas de células mioepiteliales, siendo las primeras las de mayor intensidad. El estroma tisular se observó con baja intensidad de fluorescencia y en forma de parches irregulares. Las zonas ductales se observaron con intensidad y distribución similar a lo observado en las zonas mioepiteliales. En una de las muestras no se observó fluorescencia.

11.1.4.3.2. Adenocarcinoma pulmonar

Sólo 1 de los casos estudiados fue intensamente positivo a MeA. En el resto de las muestras, 5 casos, no se observó fluorescencia en el canal verde. La fluorescencia se observó restringida a estructuras pseudoglandulares, acinares y mioepiteliales. El patrón de El estroma fue pobremente positivo o no se observó fluorescencia. En las zonas del estroma que se observó la fluorescencia, ésta fue irregular en forma de parches tenues y en trazas.

11.1.4.3.3. Adenocarcinoma renal de células claras

3 de 4 muestras fueron intensamente fluorescentes. La positividad a MeA (Figura 12) se observó homogénea en forma diseminada principalmente en el tejido conectivo. Las fibras de tejido conectivo fueron las que presentaron la mayor intensidad de fluorescencia. En las zonas de células claras, la intensidad se observó con menor intensidad aunque se mantuvo en el patrón similar al tejido conectivo.

11.1.4.3.4. Adenocarcinoma folicular de tiroides

La reactividad a MeA en ambos casos se observó en patrones de fluorescencia similares. La intensidad se observó alta, en el estroma, con distribución homogénea. Las zonas papilomatosas y foliculares se observaron igualmente intensamente fluorescentes. En algunas zonas del estroma se observaron escasos puntos fluorescentes diseminados.

11.1.4.3.5. Melanoma cutáneo maligno

Ambos casos la reactividad a MeA se observó con mediana intensidad de fluorescencia, de distribución homogénea con predominio en las zonas de la dermis. La epidermis, aunque igualmente de mediana intensidad, se observó en patrones irregulares en forma de fibras medianamente densas.

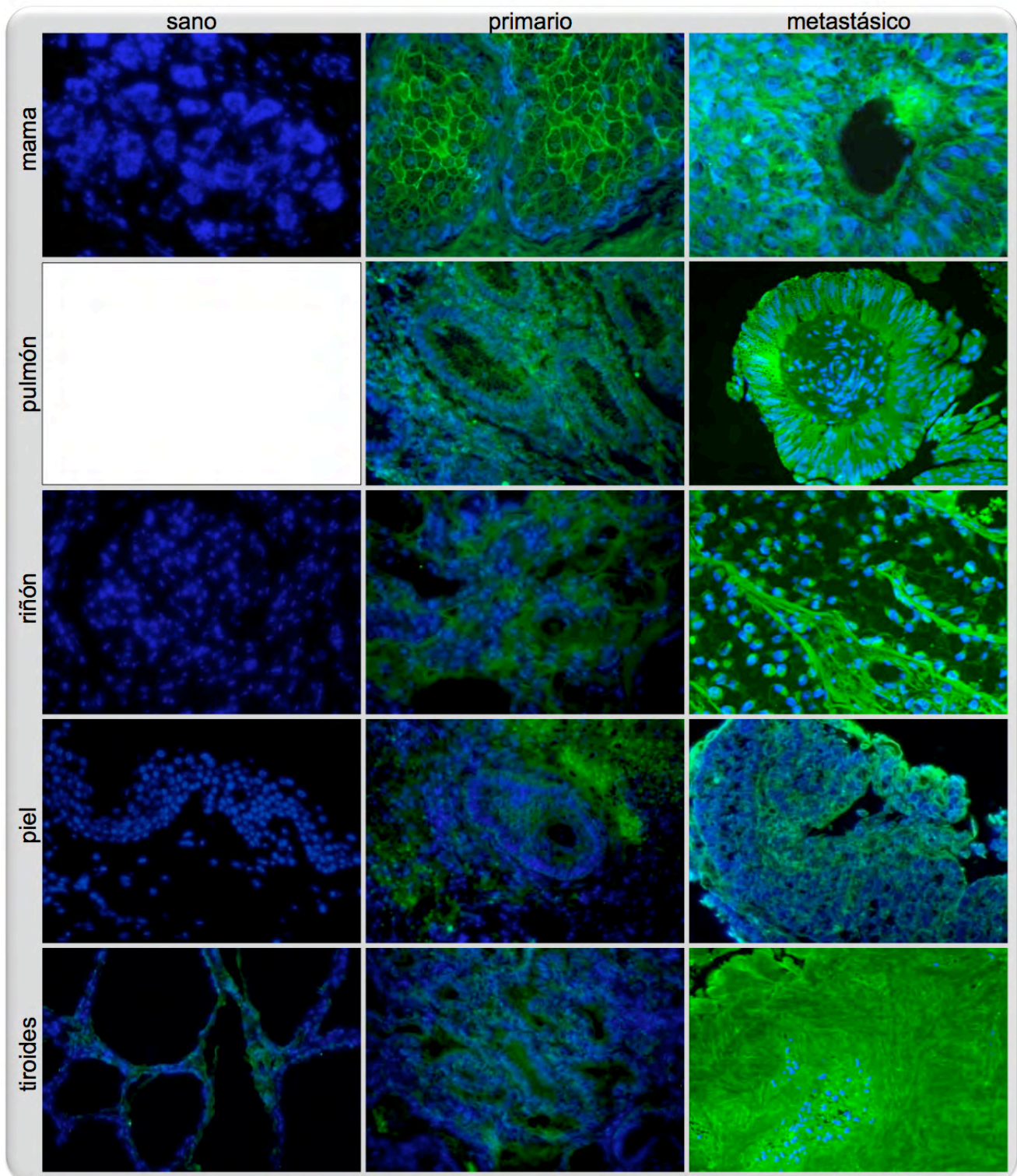


Figura 12. Histoquímicas con lectina MeA en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro. Lectina en canal verde (FITC), núcleos en canal azul (DAPI). 400X.

11.1.5. Lectina *Limulus polyphemus* (LPA) (Figura 13)

11.1.5.1. Órganos sanos

11.1.5.1.1. Mama

En todos los casos la reactividad a LPA se observó con baja intensidad de fluorescencia verde. La distribución de la fluorescencia se observó en forma irregular de predominio en el estroma. Las estructuras glandulares se observaron débilmente fluorescentes o no se observó fluorescencia. En cambio, en las zonas periglandulares y mioepiteliales, la intensidad fue similar a la observada en el estroma, con un patrón regular.

11.1.5.1.2. Tiroides

En ninguna de las muestras se observó reactividad a LPA careciendo de fluorescencia en el canal verde. La marca fluorescente se restringió a los núcleos que se visualizaron en canal azul, sin atipia nuclear ni polimorfismo. El resto de la muestra no mostró otro tipo de fluorescencia.

11.1.5.1.3. Riñón

Ambos casos la reactividad a LPA se observó baja intensidad de fluorescencia en forma homogénea de predominio en las zonas del estroma tisular, y en escasas regiones glandulares al igual que en los glomérulos. Estas últimas estructuras se observaron de morfología normal, sin alteraciones, con un patrón homogéneo pero débilmente fluorescentes. Las zonas del hilio e intersticio glandular no se observaron fluorescentes.

11.1.5.1.4. Piel

En ninguna de las muestras se observó fluorescencia en verde (FITC), de reactividad a LPA. Sólo estuvo presente la fluorescencia en canal azul de los núcleos, que se observaron de distribución normal, formando dos estratos, la epidermis con abundantes núcleos estratificados, con una distribución basal ordenada; y la dermis, con escasos núcleos de características normales.

11.1.5.2. Carcinomas primarios

11.1.5.2.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

En 4 de 7 casos se observó una mediana intensidad de fluorescencia de reactividad a LPA; en 2 se observó una baja intensidad y en 1 la intensidad fue alta. El patrón de fluorescencia observado en todas las muestras fue similar con predominio en las estructuras papilares y glandulares. Las zonas de células mioepiteliales y periglandulares fueron las de menor intensidad de fluorescencia. En todas las muestras, la interacción de LPA con su ligando sialilado se observó homogéneo, con distribución uniforme.

11.1.5.2.2. Adenocarcinoma pulmonar

En 3 de los 4 casos se observó una baja intensidad de fluorescencia en la positividad a LPA. Uno de los casos fue de mediana intensidad. La positividad se observó en forma homogénea, predominando en el estroma tisular en forma uniforme. Las estructuras glandulares se observaron con la más baja intensidad y en forma similarmente homogénea a lo observado en el estroma.

11.1.5.2.3. Adenocarcinoma folicular de tiroides

Se observaron 2 de los 4 casos con mediana intensidad de fluorescencia y 2 con alta intensidad. La positividad a LPA se observó en las estructuras foliculares con predominio en las paredes de las mismas en patrones homogéneos. Las zonas perifoliculares, el estroma, regiones periglandulares y folículos fueron en los que se observó la menor intensidad con distribución igualmente homogénea.

11.1.5.2.4. Adenocarcinoma renal de células claras

Los 3 casos mostraron una baja intensidad de fluorescencia con patrones similares, principalmente en las zonas del estroma tisular. Las regiones glandulares y acinares se observaron pobremente fluorescentes con patrones difusos irregulares. Las células mioepiteliales se observaron en patrones homogéneos tenues, en forma de fibras densas pobremente fluorescentes. El hilio no se observó fluorescente.

11.1.5.2.5. Melanoma cutáneo maligno

Los 5 casos de melanoma maligno se observaron con baja intensidad de fluorescencia. La positividad a LPA se observó de distribución homogénea tanto en la dermis como en la epidermis. No se observaron estructuras vasculares de mayor intensidad.

11.1.5.3. Metástasis a cerebro

11.1.5.3.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

En ninguno de los casos de metástasis de origen mamario se observó fluorescencia de reactividad a LPA. Sólo se observó la fluorescencia en canal azul de los núcleos.

11.1.5.3.2. Adenocarcinoma pulmonar

En 3 de 6 casos se observó una baja intensidad de fluorescencia. La interacción con la lectina se observó en forma homogénea con distribución uniforme de predominio en estructuras pseudoglandulares y acinares. El estroma tisular se observó pobremente intenso o no se observó fluorescencia, con distribución irregular. En las otras 3 muestras no se observó fluorescencia de reactividad a LPA.

11.1.5.3.3. Adenocarcinoma renal de células claras

Solo 1 de las muestras mostró positividad a la lectina LPA. En esta muestra la fluorescencia se observó de baja intensidad, con distribución heterogénea irregular, principalmente en las formaciones fibrosas de tejido conectivo. Las estructuras pseudoglandulares, acinares, periglandulares y el hilio no se observaron fluorescentes a la lectina.

11.1.5.3.4. Adenocarcinoma folicular de tiroides

Ambas muestras fueron positivas a LPA, se observaron de mediana intensidad de fluorescencia, con patrones de distribución homogénea, de predominio en las estructuras papilares, y pseudofoliculares. Las zonas parafoliculares y el estroma se observó en forma similar al resto, pero ligeramente con menor intensidad de fluorescencia.

11.1.5.3.5. Melanoma cutáneo maligno

Ambas muestras se observaron positivas a LPA con baja intensidad de fluorescencia verde, con distribución irregular, de predominio en estructuras pseudoglandulares y acinares. El estroma se observó pobremente (de muy baja intensidad) fluorescente y en forma de trazas irregulares con algunas zonas en las que no se observó fluorescencia. No se observaron estructuras vasculares ni se observó integridad estructural asociada al órgano de origen.

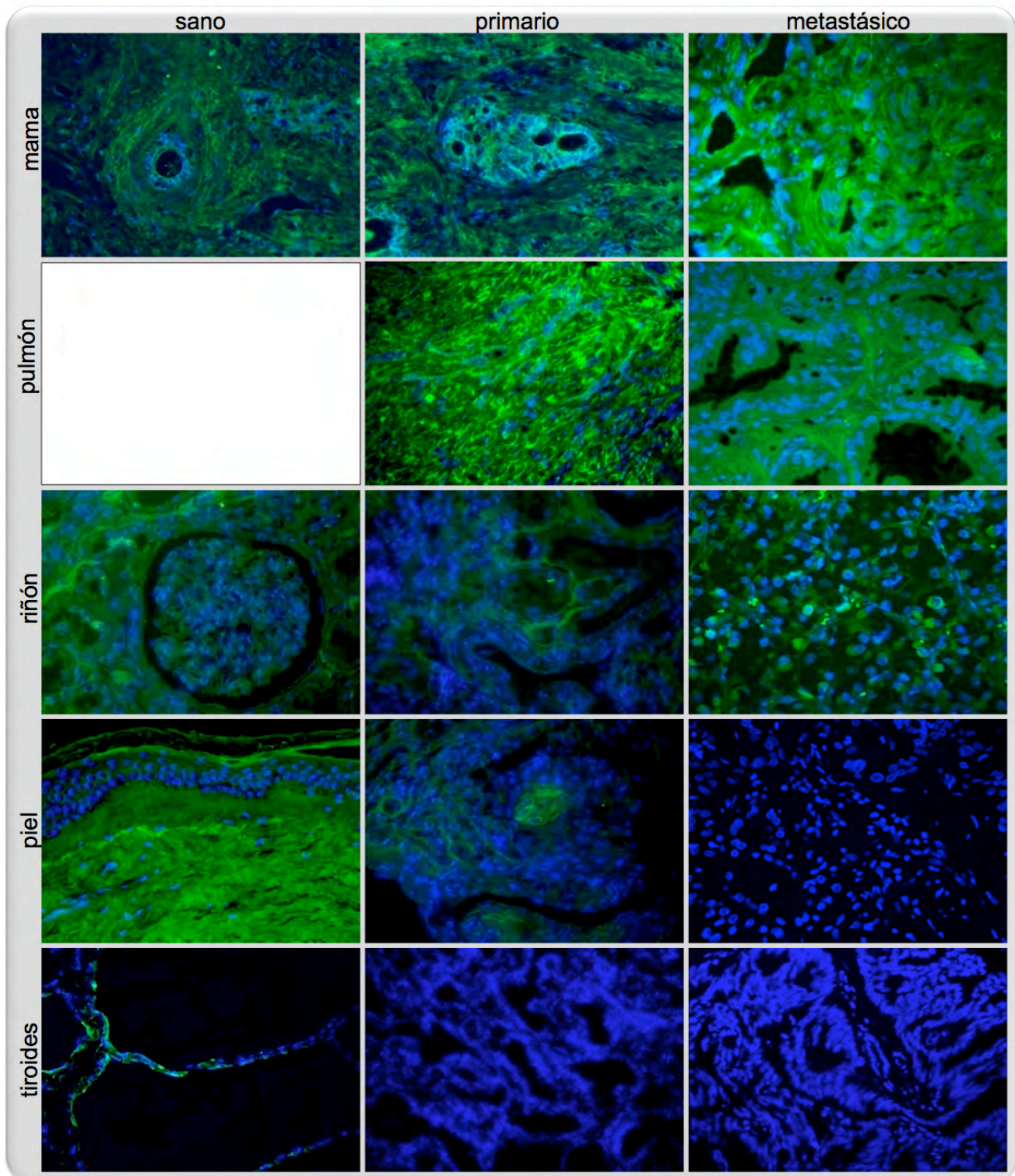


Figura 13. Histoquímicas con lectina LPA en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro. Lectina en canal verde (FITC), núcleos en canal azul (DAPI). 400X.

11.1.6. Lectina *Maackia amurensis* (MAA) (Figura 14)

11.1.6.1. Órganos sanos

11.1.6.1.1. Mama

Las 5 muestras de mama sana se observaron con baja intensidad de positividad a MAA. La fluorescencia fue con patrones homogéneos, de distribución regular con predominio en las zonas del estroma. Las estructuras acinares y glandulares se observaron con ligeramente menor intensidad de fluorescencia que lo observado en el estroma. Las estructuras vasculares y perivasculares se observaron con intensidad de fluorescencia similar a lo descrito en el estroma, regularmente homogéneas. La zona de células mioepiteliales mostró pobre y difusa intensidad de fluorescencia, en forma de trazas.

11.1.6.1.2. Tiroides

Las 3 muestras de tiroides se observaron con baja intensidad de fluorescencia a MAA. La fluorescencia estuvo presente en forma de trazas irregulares en las zonas de células foliculares. Las células parafoliculares y el estroma fueron de muy baja intensidad o no se observó fluorescencia con patrones irregulares difusos. El folículo se observó completamente negativo.

11.1.6.1.3. Riñón

Las muestras de riñón fueron positivas a MAA, 1 muestra se observó con baja intensidad de fluorescencia y 1 con mediana intensidad. Ambas muestras se observaron con patrones de fluorescencia irregulares, con la menor intensidad presente principalmente en las zonas del estroma tisular, en forma difusa aunque homogénea, y ligeramente con mayor intensidad en el estroma formando fibras de densidad variable. Las estructuras glandulares, vasculares y glomerulares se observaron pobremente fluorescentes de forma de parches irregulares, con zonas en las que no se observó fluorescencia.

11.1.6.1.4. Piel

3 de 5 muestras se observaron con mediana intensidad de fluorescencia positiva a MAA y dos muestras se observaron con alta intensidad. La positividad se observó en la zona de la

dermis, de forma homogénea, con algunas zonas que formaron fascículos de densidad variable medianamente fluorescentes inmersos en la dermis. La epidermis en todos los casos se observó de intensidad baja o muy baja, de forma homogénea.

11.1.6.2. Carcinomas primarios

11.1.6.2.1. Adenocarcinoma folicular de mama

3 de 7 muestras se observaron con baja intensidad, 3 con mediana intensidad, y 1 con alta intensidad de positividad a MAA. La fluorescencia se observó en forma homogénea en todos los casos, de predominio en las estructuras glandulares en donde se observó la mayor intensidad de fluorescencia. Las zonas del estroma se observó con menor intensidad y en forma homogénea. La zona de células mioepiteliales no se observó con positividad al igual que las estructuras vasculares o ductales.

11.1.6.2.2. Adenocarcinoma pulmonar

Las 4 muestras fueron positivas a MAA. 2 de 4 muestras se observaron con alta intensidad de fluorescencia; una con mediana y una con baja intensidad. En todos los casos, la fluorescencia se observó homogénea de predominio en las estructuras papilares y glandulares. El resto del estroma y estructuras glandulares se observaron con la menor intensidad de fluorescencia aunque con patrones similarmente homogéneos al resto de la muestra.

11.1.6.2.3. Adenocarcinoma folicular de tiroides

En ninguna de las muestras se observó positividad a MAA. La fluorescencia observada sólo correspondió a los núcleos en el canal azul.

11.1.6.2.4. Adenocarcinoma renal de células claras

Todas las muestras mostraron una baja intensidad de positividad a MAA. La fluorescencia se observó en forma homogénea principalmente en las zonas del estroma tisular. Las estructuras glomerulares y glandulares se observaron pobremente fluorescentes aunque similarmente homogéneas. Las zonas del hilio y estructuras vasculares no se observaron fluorescentes.

11.1.6.2.5. Melanoma cutáneo maligno

Todas las muestras se observaron con baja intensidad de positividad a MAA. El patrón de fluorescencia observado fue irregular, con zonas fluorescentes entre campos sin fluorescencia en forma de parches difusos. La fluorescencia estuvo presente en la zona de la dermis, el estroma. La epidermis no se observó positiva, ni estructuras vasculares.

11.1.6.3. Metástasis a cerebro

11.1.6.3.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

3 de 4 muestras fueron medianamente positivas a MAA. En 1 muestra no se observó fluorescencia. La interacción de la lectina con fluorescencia se observó en forma homogénea, en la zona del estroma. Las estructuras pseudoglandulares y acinares se observaron con muy baja intensidad de fluorescencia en forma irregular, en parches, con zonas sin fluorescencia. Las zonas ductales y vasculares no se observaron fluorescentes.

11.1.6.3.2. Adenocarcinoma pulmonar

2 de 5 muestras se observaron con positividad de mediana intensidad, 1 con alta intensidad y 2 no se observaron positivas a MAA. En todos los casos la positividad estuvo presente en forma homogénea en el estroma con predominio en estructuras pseudoglandulares y papilomatosas. En esta zona, se observó la formación de tramas de densidad variable, ligeramente con mayor fluorescencia, diseminadas entre el estroma.

11.1.6.3.3. Adenocarcinoma renal de células claras

2 de 4 muestras se observaron con positividad a MAA de mediana intensidad y 2 no se observaron fluorescentes. La fluorescencia se observó en forma irregular, heterogénea, con distribución en los racimos celulares y en los tabiques de tejido conectivo.

11.1.6.3.4. Adenocarcinoma folicular de tiroides

En ambas muestras no se observó positividad a MAA. La fluorescencia observada correspondió solamente a los núcleos en canal azul.

11.1.6.3.5. Melanoma cutáneo maligno

En ninguna de las muestras se observó positividad a MAA. La fluorescencia observada correspondió solamente a los núcleos en canal azul.

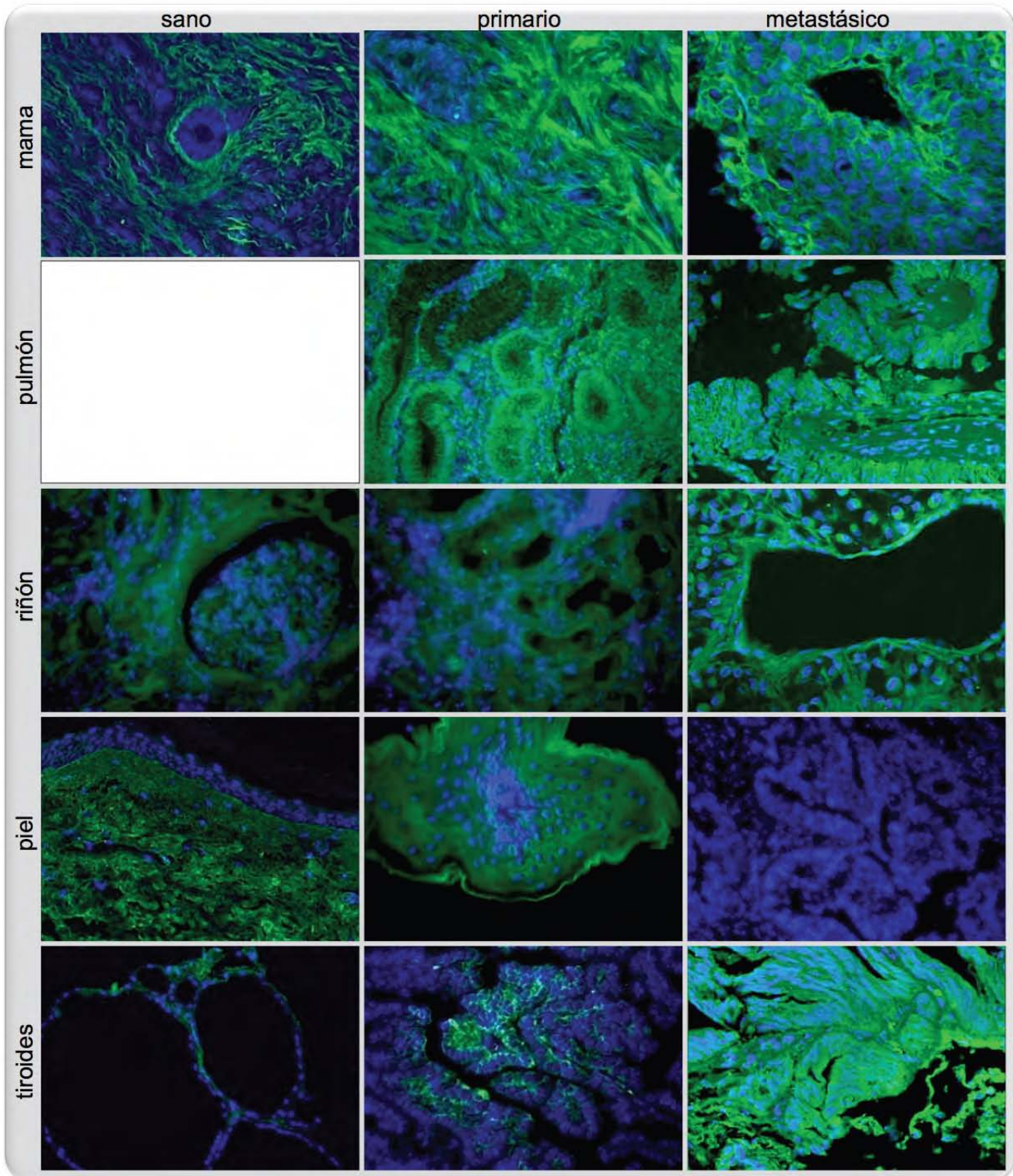


Figura 14. Histoquímicas con lectina MAA en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro. Lectina en canal verde (FITC), núcleos en canal azul (DAPI). 400X.

11.1.7. Lectina *Sambucus nigra* (SNA) (Figura 15)

11.1.7.1. Órganos sanos

11.1.7.1.1. Mama

En todas las muestras, la positividad a SNA se observó de baja intensidad e irregular, en el estroma, formando tramas de mediana densidad difusas. Las zonas perivasculares, glandulares, mioepiteliales y acinares se observaron con muy baja intensidad, pobremente fluorescentes y en patrones de distribución difuso e irregular. No se observó fluorescencia en las zonas ductales.

11.1.7.1.2. Tiroides

Todas las muestras se observaron positivas a SNA con baja intensidad de fluorescencia, en forma irregular y heterogénea. La fluorescencia estuvo presente en forma de parches aislados diseminados en las zonas de células foliculares. Las zonas parafoliculares y el folículo no se observaron fluorescentes, así como las estructuras vasculares.

11.1.7.1.3. Riñón

Ambas muestras se observaron positivas a SNA con baja intensidad de positividad, en forma irregular en las zonas del estroma y escasas regiones glandulares y glomerulares. En estas últimas estructuras, la fluorescencia se observó en forma de parches irregulares. No se observó fluorescencia en las zonas vasculares ni hiliares.

11.1.7.1.4. Piel

Todas las muestras se observaron positivas a SNA con baja intensidad de fluorescencia, de forma irregular, con predominio en la dermis (el estroma), en donde se formaron tramas de densidad moderada y ligeramente con mayor fluorescencia que el resto de la muestra. La epidermis no se observó fluorescente, ni las estructuras vasculares.

11.1.7.2. Carcinomas primarios

11.1.7.2.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

4 de 7 muestras se observaron positivas a SNA con intensidad alta de fluorescencia; 1 se observó con mediada intensidad; y 2 con baja intensidad. El patrón de fluorescencia observado fue homogéneo, de predominio en las zonas glandulares. En el estroma se formaron tramas densas de tejido conectivo con la mayor intensidad de fluorescencia y regulares. Las zonas ductales y acinares se observaron con la menor intensidad.

11.1.7.2.2. Adenocarcinoma pulmonar

3 de 4 muestras se observaron positivas a SNA con intensidad mediana y 1 con alta intensidad de fluorescencia. El patrón de fluorescencia se observó en forma homogénea tanto en el estroma como en las estructuras papilares. Las estructuras glandulares, acinares y vasculares se observaron pobremente fluorescentes con patrones difusos e irregulares en forma de parches.

11.1.7.2.3. Adenocarcinoma folicular de tiroides

3 de 4 muestras se observaron positivas a SNA con fluorescencia a la lectina de baja intensidad; en una de las muestras no se observó fluorescencia. La positividad se observó irregular y escasa, en forma de parches tanto en las estructuras foliculares como en el estroma. Se observaron grandes zonas sin fluorescencia. Las estructuras parafoliculares y el folículo no se observaron fluorescentes; así como el resto de la muestra.

11.1.7.2.4. Adenocarcinoma renal de células claras

Todas las muestras se observaron positivas a SNA con baja intensidad de positividad, con patrones homogéneos principalmente en las zonas del estroma. Las estructuras glandulares y glomerulares se observaron pobremente fluorescentes e irregulares, con grandes zonas sin fluorescencia.

11.1.7.2.5. Melanoma cutáneo maligno

Todas las muestras fueron positivas a SNA con mediana intensidad de fluorescencia, con patrones irregulares en forma de parches difusos, con predominio en la dermis. La epidermis mostró de forma similar a la dermis, patrones de fluorescencia irregulares, con tramas de densidad variable con mayor intensidad de fluorescencia y el resto con baja intensidad.

11.1.7.3. Metástasis a cerebro

11.1.7.3.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

2 de 3 muestras se observaron con positividad a SNA de mediana intensidad. Una de las muestras no mostró fluorescencia. La fluorescencia se observó en forma homogénea, fundamentalmente en las estructuras glandulares, en las que se observó la superficie glandular fluorescente en su totalidad. Las zonas de células mioepiteliales y ductal se observaron con una distribución similar a la glandular. El estroma se observó pobre e irregularmente fluorescente, en forma de parches aislados y diseminados.

11.1.7.3.2. Adenocarcinoma pulmonar

3 muestras se observaron con mediana intensidad de positividad a la SNA; 2 con baja intensidad y en 1 no se observó fluorescencia. La fluorescencia fue homogénea, principalmente en regiones pseudoglandulares y papilomatosas, en las que se remarcaron tramas densas con ligeramente mayor intensidad de fluorescencia. El estroma se observó homogéneamente fluorescente. Las zonas mioepiteliales y acinares se observaron con menor intensidad de fluorescencia.

11.1.7.3.3. Adenocarcinoma renal de células claras

3 de 4 fueron muestras fueron de mediana intensidad de positividad a SNA; y 1 con baja intensidad. El patrón de fluorescencia se observó en forma homogénea tanto en los racimos celulares como en los tabiques fibrosos de tejido conectivo, siendo los primeros los de mayor intensidad y regularidad. El resto de las estructuras de la muestra se observaron pobre e irregularmente fluorescentes o no se observó fluorescencia.

11.1.7.3.4. Adenocarcinoma folicular de tiroides

Ambas muestras se observaron con mediana intensidad de fluorescencia positiva a SNA. El patrón de fluorescencia fue regular y homogéneo de predominio en el estroma, en el que formó tramas densas con mayor intensidad de fluorescencia. Las estructuras papilomatosas se

observaron homogéneamente positivas de mediana intensidad. Las regiones foliculares no se distinguieron fluorescentes.

11.1.7.3.5. Melanoma cutáneo maligno

En ninguna de las muestras se observó positividad a SNA. La fluorescencia observada consistió únicamente de la marca azul de los núcleos.

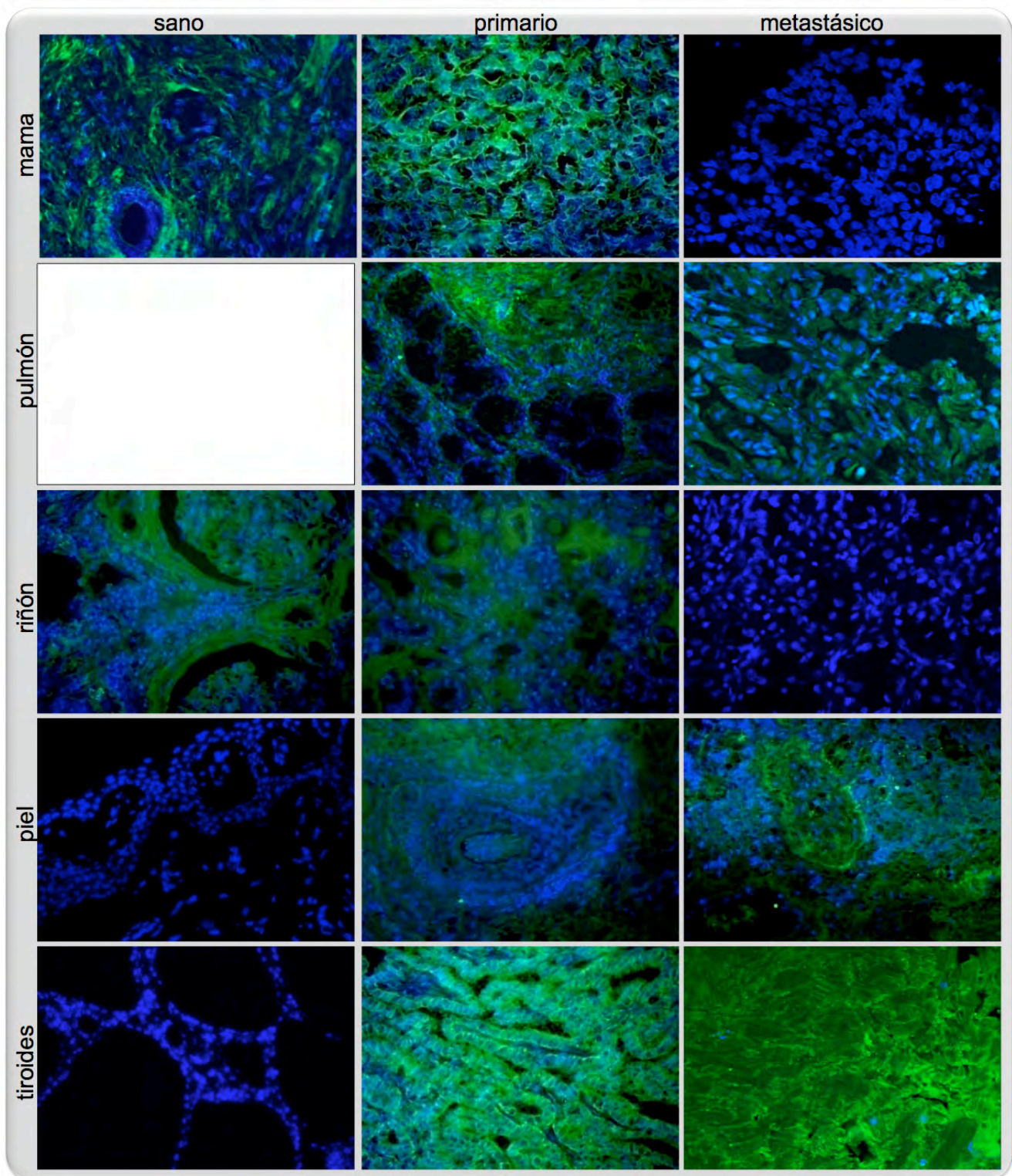


Figura 15. Histoquímicas con lectina SNA en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro. Lectina en canal verde (FITC), núcleos en canal azul (DAPI). 400X.

11.1.8. Lectina *Macrobrachium rosenbergii* (MRL) (Figura 16)

11.1.8.1. Órganos sanos

En ninguna de las muestras de origen mamario, tiroideo, renal, o piel sanas se observó positividad a MRL. La fluorescencia sólo estuvo presente en los núcleos.

11.1.8.2. Carcinomas primarios

11.1.8.2.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

6 de 7 muestras fueron positivas a MRL con baja intensidad de reactividad. 1 de las muestras se observó con mediana intensidad. En todas las muestras, la fluorescencia se observó homogénea, en estructuras glandulares y periglandulares, con menor intensidad en regiones de células mioepiteliales e intraductales. El estroma se observó irregularmente fluorescente, con patrones en parches difusos de baja o muy baja intensidad de fluorescencia.

11.1.8.2.2. Adenocarcinoma pulmonar

En 2 muestras se observó interacción a MRL de baja intensidad de fluorescencia. En estas 2 muestras, el patrón de fluorescencia fue homogéneo con predominio en estructuras papilares y glandulares. Las zonas periglandulares y el estroma se observaron prácticamente negativos. En 2 muestras se observó una fluorescencia de muy baja intensidad o no se observó la fluorescencia. En estas muestras el patrón de fluorescencia observado fue irregular en forma de parches y en las mismas zonas descritas para las otras dos muestras.

11.1.8.2.3. Adenocarcinoma folicular de tiroides

Todas las muestras fueron positivas a MRL con muy baja intensidad de fluorescencia. La positividad estuvo presente en forma irregular en parches escasos, pequeños, de predominio en zonas del estroma. Las estructuras foliculares, parafoliculares y el folículo no se observaron fluorescentes.

11.1.8.2.4. Adenocarcinoma renal de células claras

En todas las muestras se observó positividad a MRL con una intensa fluorescencia, con distribución homogénea tanto en las zonas del estroma como en las glomerulares. La zona del

hilio se observó con menor intensidad al igual que la zona de células mioepiteliales. En el estroma se observaron fuertes y densas tramas intensamente fluorescentes de tejido conectivo acelular.

11.1.8.2.5. Melanoma cutáneo maligno

En todas las muestras se observó positividad a MRL con una fluorescencia de baja intensidad en forma de parches difusos irregulares fundamentalmente en el estroma, la dermis. La epidermis se observó con muy baja intensidad de fluorescencia e irregular, en forma de trazas con amplias zonas sin fluorescencia.

11.1.8.3. Metástasis a cerebro

11.1.8.3.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

2 de las muestras de metástasis se observaron positivas a MRL. La fluorescencia observada fue en forma irregular de mediana intensidad en el estroma en forma de parches con zonas sin fluorescencia. En las estructuras pseudoglandulares y acinares, la fluorescencia a la lectina fue igualmente de mediana intensidad aunque con distribución homogénea en todas las estructuras descritas. Las zonas mioepiteliales se observaron en forma de tramas de baja densidad y mediana intensidad de fluorescencia. Las estructuras ductales no se observaron fluorescentes. No se observó fluorescencia verde en dos de las muestras.

11.1.8.3.2. Adenocarcinoma pulmonar

En tres de las muestras se observó una alta intensidad de fluorescencia con MRL. La distribución de la fluorescencia fue homogénea con predominio en zonas pseudoglandulares y papilomatosas. El estroma se observó en forma igualmente homogénea aunque con menor intensidad de fluorescencia. Las estructuras vasculares no se observaron fluorescentes. Las restantes 3 muestras no fueron positivas y no se observó fluorescencia con la lectina.

11.1.8.3.3. Adenocarcinoma renal de células claras

2 de las muestras fueron positivas a MRL con alta intensidad de fluorescencia. 1 de las muestras se observó con baja intensidad y en una no se observó fluorescencia. La distribución

de fluorescencia observada fue homogénea, de predominio en el estroma formando medianamente densas fibras de tejido conectivo con algunas pequeñas zonas de mayor intensidad de fluorescencia puntiformes. Los racimos celulares de células claras se observaron con baja intensidad de fluorescencia y regularmente homogéneas.

11.1.8.3.4. Adenocarcinoma folicular de tiroides

Las muestras se observaron con alta intensidad de fluorescencia con MRL. La distribución de la misma se observó en forma regular y homogénea en toda la muestra, tanto en el estroma como en las estructuras glandulares y papilares.

11.1.8.3.5. Melanoma cutáneo maligno

Todas las muestras fueron escasa y débilmente positivas a MRL. La distribución de la fluorescencia se observó en forma de parches escasos y espaciadamente diseminados principalmente en el estroma. Las estructuras glandulares, acinares y vasculares no se observaron fluorescentes.

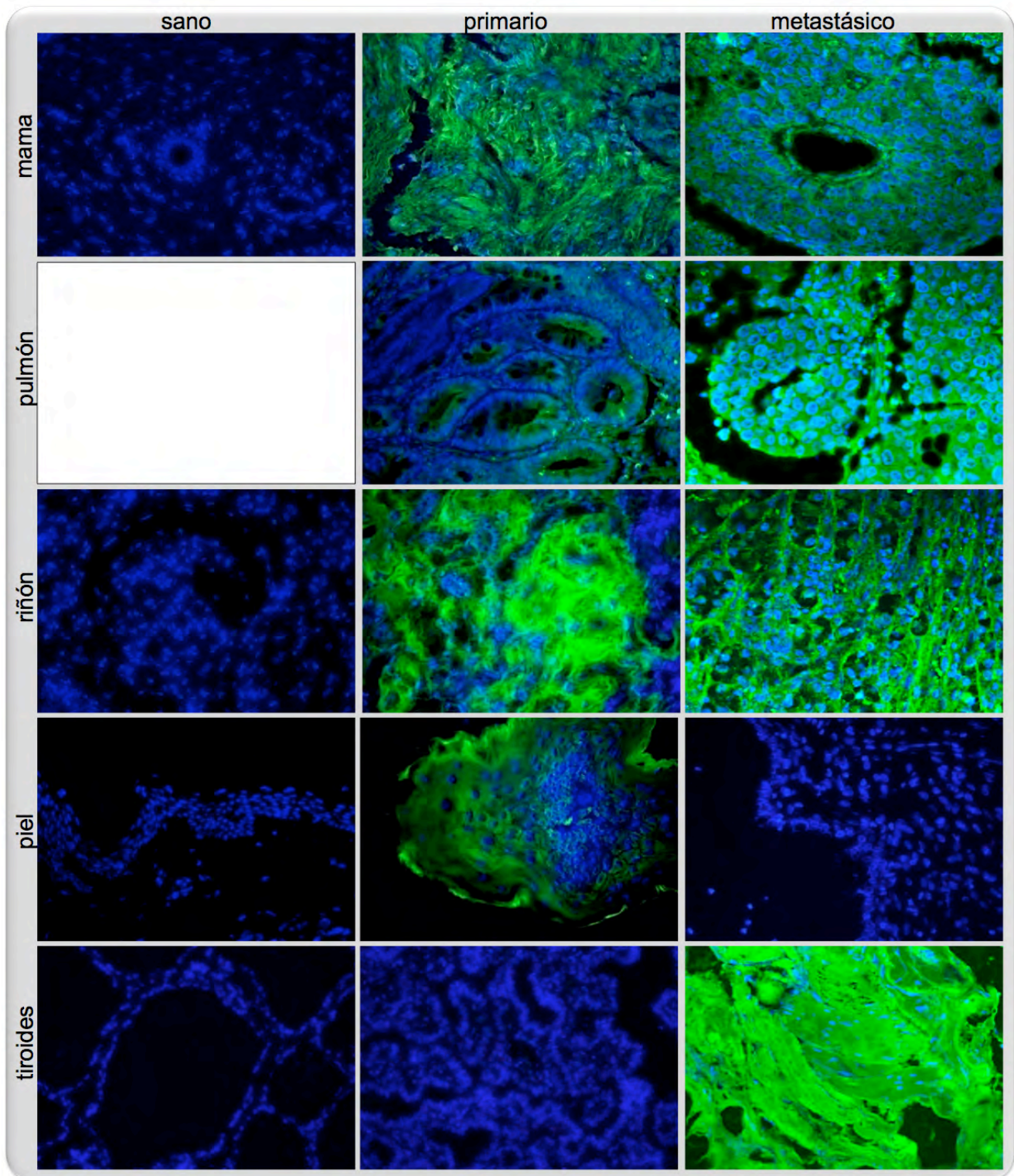


Figura 16. Histoquímicas con lectina MRL en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro. Lectina en canal verde (FITC), núcleos en canal azul (DAPI). 400X.

11.1.9. Lectina Concanavalina A (Con A) (Figura 17)

11.1.9.1. Órganos sanos

11.1.9.1.1. Mama

En 3 de 5 de las muestras la positividad a Con-A observada fue de alta intensidad y en dos muestras fue de mediana intensidad. Todo el estroma tisular se observó intensamente fluorescente, con tramas hiperdensas de tejido conectivo. Las estructuras glandulares y acinares se observaron con menor intensidad de fluorescencia con Con-A, de forma similarmente homogénea al estroma. Las zonas periglandulares y mioepiteliales se observaron con patrones de fluorescencia de baja intensidad al igual que las ductales.

11.1.9.1.2. Tiroides

Todas las muestras se observaron con mediana intensidad de fluorescencia positiva a Con-A. La distribución de la interacción lectínica se observó en las células foliculares formando tramas hipodensas bien definidas. Las células parafoliculares se observaron con baja intensidad de fluorescencia.

11.1.9.1.3. Riñón

En todas las muestras se observó una positividad a Con A de alta intensidad de fluorescencia con distribución homogénea en el estroma tisular, en donde se formaron tramas hiperdensas de tejido conectivo con la mayor intensidad de fluorescencia observada. Las zonas glomerulares se observaron de características histológicas normales, sin alteraciones, con mediana a alta intensidad de fluorescencia distribuida en forma homogénea. El hilio se observó pobremente fluorescente al igual que las estructuras vasculares.

11.1.9.1.4. Piel

En todas las muestras se observó una positividad a Con A de mediana intensidad de fluorescencia. La distribución homogénea dispersa estuvo presente tanto en el estroma como en la epidermis, siendo la primera la que mostró ligeramente mayor intensidad. Las estructuras vasculares y glandulares se observaron con baja intensidad de positividad, y en forma irregular.

11.1.9.2. Carcinomas primarios

11.1.9.2.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

6 de 7 muestras se observaron con positividad a Con-A de alta intensidad y solo una con mediana intensidad. En todas las muestras la distribución de la fluorescencia se observó uniformemente homogénea, en las zonas glandulares y acinares. El estroma se observó con baja intensidad positivo e irregular con zonas en las que no se observó fluorescencia. Las estructuras ductales y vasculares se observaron pobremente fluorescentes.

11.1.9.2.2. Adenocarcinoma pulmonar

3 de las muestras fueron positivas a Con A con alta intensidad de fluorescencia. 1 con mediana intensidad. La distribución de la fluorescencia fue regular y homogénea siendo la zona del estroma que la mostró la mayor intensidad de positividad, formando tramas hiperdensas de tejido conectivo altamente positivo. Las zonas glandulares se observaron con patrones de medianas a alta intensidad, homogéneas y delimitadas. Las células mioepiteliales se observaron pobremente fluorescentes y en forma de trazas hipodensas. No se observó fluorescencia en las estructuras ductales ni vasculares.

11.1.9.2.3. Adenocarcinoma folicular de tiroides

3 de las muestras se observaron con positividad a Con A de alta intensidad de fluorescencia; una de las muestras se observó con mediana a alta intensidad. En todos los casos, la distribución de la fluorescencia estuvo en las zonas del estroma y células foliculares. Las zonas parafoliculares y vasculares fueron pobremente positivas en forma de trazas puntiformes.

11.1.9.2.4. Adenocarcinoma renal de células claras

Todos los casos se observaron con positividad a Con A de mediana intensidad de fluorescencia y distribución homogénea tanto en las regiones del estroma como en las glomerulares y glandulares. Las zonas del hilio se observaron hipodensas y pobremente fluorescentes.

11.1.9.2.5. Melanoma cutáneo maligno

Todas las muestras se observaron con positividad a Con A de mediana intensidad de fluorescencia. El patrón de distribución fue homogéneo y regular con escasas zonas de tramas ligeramente más densas y fluorescentes en el estroma. La epidermis se observó igualmente de mediana intensidad y homogéneamente fluorescente.

11.1.9.3. Metástasis a cerebro

11.1.9.3.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

2 de las muestras analizadas fueron positivas a Con A con mediana intensidad de fluorescencia y distribución homogénea y regular. La positividad estuvo presente en las estructuras glandulares y periglandulares incluyendo las células mioepiteliales. Las zonas ductales se observaron ligeramente de mayor intensidad de fluorescencia. El estroma mostró menor intensidad de positividad aunque conservó la homogeneidad observada en el resto de la muestra. En una de las muestras no se observó fluorescencia positiva a la lectina.

11.1.9.3.2. Adenocarcinoma pulmonar

3 de 6 de las muestras estudiadas fueron positivas a Con A, con una mediana intensidad de fluorescencia y distribución homogénea y regular principalmente en las estructuras pseudoglandulares y acinares. El estroma se observó de muy baja intensidad de fluorescencia e irregular. Las zonas ductales y mioepiteliales no se observaron fluorescentes. En las restantes tres muestras no se observó fluorescencia positiva a la lectina.

11.1.9.3.3. Adenocarcinoma renal de células claras

1 de 4 de las muestras se observó positiva a Con A con alta intensidad de fluorescencia. 2 de las muestras se observaron con mediana intensidad; y en 1 no se observó fluorescencia. En los casos en los que hubo positividad a la lectina, la distribución de la fluorescencia observada fue irregular e forma de tramas dispersas discontinuas en las zonas fibrosas del estroma. Las zonas de racimos celulares de células claras se observaron con distribución más o menos regular de baja intensidad de fluorescencia.

11.1.9.3.4. Adenocarcinoma folicular de tiroides

Todas las muestras de origen tiroideo metastásico a cerebro se observaron con alta intensidad de positividad a Con A. El patrón de fluorescencia estuvo presente de forma homogénea en el estroma con zona hiperdensas en parches de mayor intensidad de fluorescencia. Las zonas pseudoglandulares y acinares se observaron homogéneas similares al estroma.

11.1.9.3.5. Melanoma cutáneo maligno

En ninguna de las muestras se observó positividad a Con A. La fluorescencia estuvo presente solamente en los núcleos con el intercalador de ácidos nucleicos en canal azul.

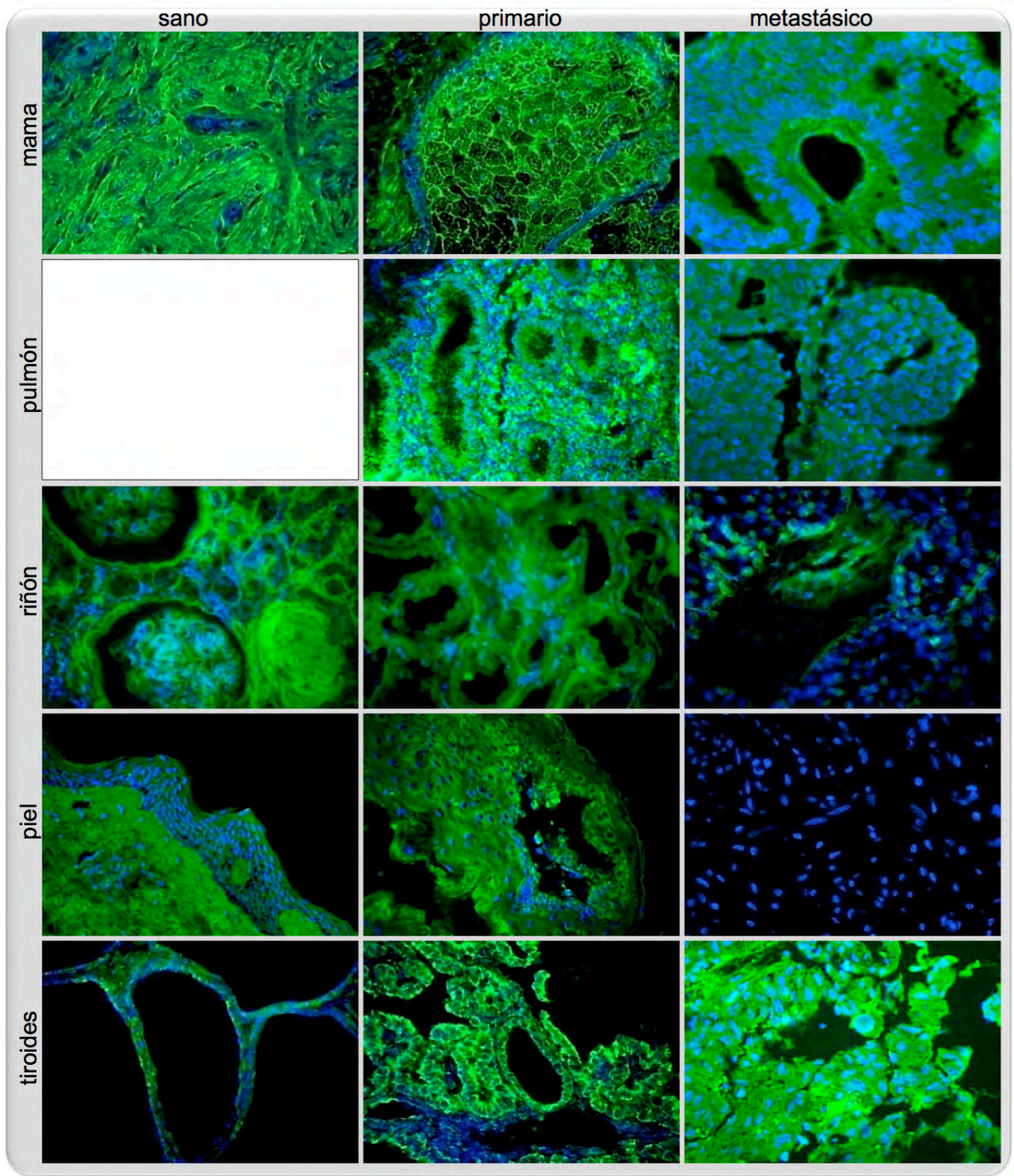


Figura 17. Histoquímicas con lectina Con-A en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro. Lectina en canal verde (FITC), núcleos en canal azul (DAPI). 400X.

11.1.10. Lectina *Lens culinaris* (LcH) (Figura 18)

11.1.10.1. Órganos sanos

11.1.10.1.1. Mama

3 de 5 muestras fueron positivas a LcH con mediana intensidad de fluorescencia. El resto de las muestras se observaron con alta intensidad. En todos los casos la distribución de la fluorescencia observada fue homogénea y regular, de predominio en el estroma. En esta zona, se observó la formación de tramas ligeramente más densas de tejido conectivo, pero con la mayor intensidad. Las estructuras perivasculares, periglandulares y mioepiteliales se observaron de forma similar a las tramas de tejido conectivo descrita en el estroma, con alta intensidad de fluorescencia y regularmente homogénea. Las zonas ductales se observaron pobremente positivas e irregulares en forma de parches escasamente diseminados.

11.1.10.1.2. Tiroides

En ninguna de las muestras se observó positividad a LcH. La fluorescencia observada se restringió a los núcleos en canal azul.

11.1.10.1.3. Riñón

Todas las muestras se observaron positivas a LcH con mediana intensidad de fluorescencia, regularmente homogénea de predominio en el estroma y con menor intensidad en las estructuras glomerulares. Las zonas glandulares e hiliares se observaron con muy baja intensidad con distribución puntiformes escasa.

11.1.10.1.4. Piel

En todas las muestras analizadas se observó positividad a la lectina LcH con mediana intensidad de fluorescencia. La distribución en todos los casos fue similar, homogénea y regular, tanto en la dermis como en la epidermis, predominando ligeramente en la última. Se observaron algunas zonas en el estroma con mayor intensidad de fluorescencia de tipo puntiformes aislados y escasos de tamaños variables, en general pequeños e inmersos en la dermis.

11.1.10.2. Carcinomas primarios

11.1.10.2.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

4 de 7 casos fueron positivos a LcH con mediana intensidad de fluorescencia. 2 de las muestras fueron positivas con alta intensidad; y en una de las muestras no se observó fluorescencia con la lectina. La distribución de la fluorescencia fue homogénea y regular, de predominio en el estroma, en donde se observó de mediana intensidad. En las zonas glandulares y acinares se observó de baja intensidad. Las zonas mioepiteliales, ductales y vasculares se observaron pobremente fluorescentes en forma irregular en trazas escasas.

11.1.10.2.2. Adenocarcinoma pulmonar

1 de 4 de las muestras se observó positiva a LcH con alta intensidad; 2 de las muestras se observaron con mediana; y 1 con baja intensidad. En todos los casos, la distribución de la fluorescencia observada fue regular y homogénea con predominio en el estroma y estructuras papilares. Las zonas glandulares y vasculares se observaron pobremente fluorescentes en forma irregular y en trazas.

11.1.10.2.3. Adenocarcinoma folicular de tiroides

En ninguno de los casos en estudio se observó positividad a LcH. La fluorescencia sólo se limitó a los núcleos en canal azul con el intercalador de ácidos nucleicos.

11.1.10.2.4. Adenocarcinoma renal de células claras

Todos los casos estudiados se observaron con positividad a LcH, con alta intensidad de fluorescencia. El patrón de fluorescencia observado en todos los casos fue similar, de predominio y mayor intensidad en el estroma, formando zonas hipertensas altamente fluorescentes periglomerulares y periglandulares. Las zonas glomerulares en cambio, se observaron con mediana intensidad de fluorescencia, con distribución regular y homogénea. Las zonas hiliares se observaron pobremente fluorescentes, con muy baja intensidad e irregular, en forma de trazas aisladas y escasas.

11.1.10.2.5. Melanoma cutáneo maligno

En todos los casos estudiados se observó positividad a LcH con mediana intensidad de fluorescencia, regularmente homogénea sólo en el estroma tisular. Las zonas glandulares y vasculares no se observaron fluorescentes. La epidermis se observó con muy baja intensidad de fluorescencia, en forma irregular en parches diseminados aisladamente.

11.1.10.3. Metástasis a cerebro

11.1.10.3.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

En todos los casos la positividad a LcH se observó con alta intensidad de fluorescencia. El patrón de distribución se observó en las estructuras pseudoglandulares y acinares con la mayor intensidad, en forma homogénea y regular. El estroma se observó con mediana a alta intensidad de fluorescencia y tramas hiperdensas de mayor intensidad de fluorescencia distribuidas entre las zonas del estroma. Las zonas ductales y vasculares se observaron pobre y escasamente fluorescentes.

11.1.10.3.2. Adenocarcinoma pulmonar

2 de 6 muestras fueron positivas a LcH con alta intensidad de fluorescencia; una con mediana y una con baja intensidad; en una más de las muestras no se observó positividad a la lectina. La distribución de la fluorescencia fue similar en todos los casos, siendo homogénea y regular, principalmente en el tejido conectivo, con presencia de zonas puntiformes hiperdensas pequeñas intensamente fluorescentes y diseminadas en el esta zona. Las estructuras pseudoglandulares y acinares se observaron con baja intensidad de fluorescencia e irregulares, escasamente distribuidas.

11.1.10.3.3. Adenocarcinoma renal de células claras

3 de las 4 muestras se observaron positivas a LcH con alta intensidad de fluorescencia. La restante se observó con mediana intensidad. En las muestras en las que se observó alta intensidad, la distribución de la fluorescencia se observó en forma homogénea y regular en el estroma fibroso formando bandas hiperdensas e intensamente fluorescentes longitudinales. Las zonas glomerulares, acinares y pseudoglandulares se observaron con mediana intensidad de

fluorescencia y regulares. El restante caso con mediana intensidad de fluorescencia, ésta estuvo presente en forma general en toda la muestra, sin que se observaran patrones específicos de distribución, tanto en el estroma y sus constituyentes, como en las estructuras pseudoglandulares, acinares y vasculares.

11.1.10.3.4. Adenocarcinoma folicular de tiroides

Todos los casos fueron positivos a LcH con mediana intensidad de fluorescencia y patrones de distribución de la misma similares. Ésta distribución se observó en zonas papilares principalmente, formando tramas hiperdensas e intensamente fluorescentes en el estroma. Las zonas parafoliculares y acinares se observaron homogéneas de menor intensidad de fluorescencia.

11.1.10.3.5. Melanoma cutáneo maligno

En ninguna de las muestras en estudio se observó positividad fluorescente a LcH. La fluorescencia observada correspondió solamente a los núcleos en azul.

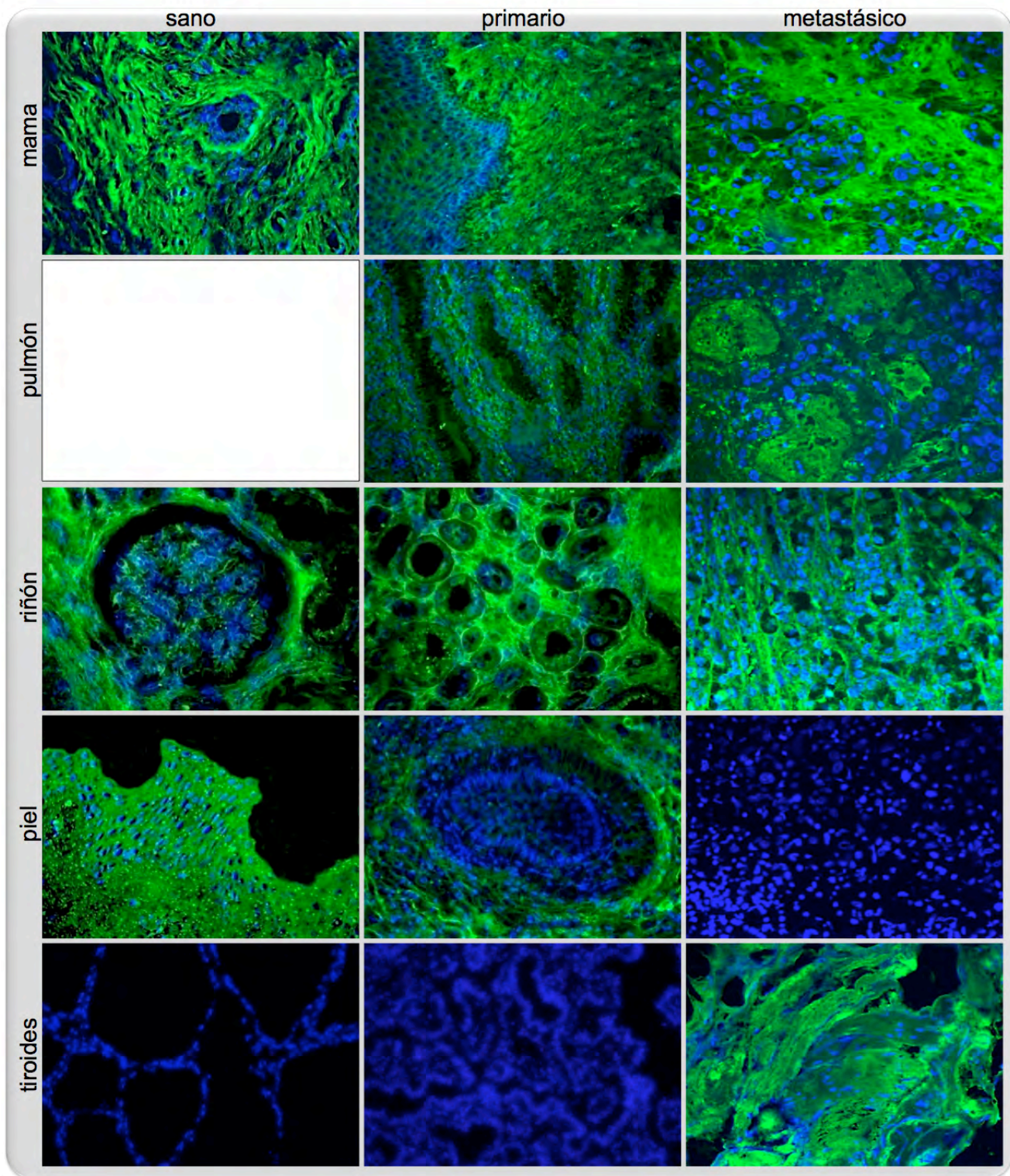


Figura 18. Histoquímicas con lectina LcH en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro. Lectina en canal verde (FITC), núcleos en canal azul (DAPI). 400X.

11.1.11. Lectina *Lotus tetragonolobus* (LTA) (Figura 19)

11.1.11.1. Órganos sanos

En ninguna de las muestras de mama, tiroides, riñón o piel sanas se observó fluorescencia positiva a LTA. La fluorescencia observada en todos los casos correspondió solamente a los núcleos en azul.

11.1.11.2. Carcinomas primarios

11.1.10.2.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

2 de los 7 casos se observaron positivos a LTA con alta intensidad de fluorescencia; dos con mediana y tres con baja intensidad.

11.1.11.2.2. Adenocarcinoma pulmonar

2 de los 4 casos se observaron positivos a LTA con mediana intensidad de fluorescencia y 2 con baja. En todos los casos, la distribución fue similar, homogénea y regular, de predominio en el estroma tisular, zonas periglandulares y papilares. Las estructuras glandulares se observaron con escasa y pobre intensidad de fluorescencia en forma irregular con grandes extensiones sin fluorescencia. No se observó fluorescencia en el resto de las estructuras.

11.1.11.2.3. Adenocarcinoma folicular de tiroides

En todas las muestras se observó positividad a LTA con baja intensidad de fluorescencia. Los patrones de distribución de la misma en todos los casos fueron similares, homogéneos, difusos, de predominio en las paredes de las zonas foliculares y parafoliculares. El estroma se observó con menor intensidad aunque similarmente homogéneo.

11.1.11.2.4. Adenocarcinoma renal de células claras

En todas las muestras analizadas se observó positividad a LTA de mediana intensidad de fluorescencia, con patrones homogéneos y regulares en el estroma, zona en la que se observó la formación de tramas ligeramente hiperdensas y con mayor intensidad de fluorescencia, difusas, mal delimitadas, de tejido conectivo. Las regiones glomerulares, acinares y perivasculares se

observaron con fluorescencia de muy baja intensidad, irregularmente distribuidas en forma de placas mal delimitadas, pequeñas y escasas.

11.1.11.2.5. Melanoma cutáneo maligno

En todos los casos estudiados se observó positividad a LTA con baja intensidad de fluorescencia, de características similares. La distribución de la fluorescencia se observó en la dermis, en forma de zonas de parches difusos, mal delineados, sin bordes limitantes definidos, escasos e hipodensos. La epidermis se observó con muy baja intensidad de fluorescencia, en forma de pequeñas placas aisladas, mal delimitadas y difusas.

11.1.11.3. Metástasis a cerebro

11.1.11.3.1. Adenocarcinoma canalicular de mama

3 de las 4 muestras estudiadas mostraron ser positivas a LTA con mediana intensidad de fluorescencia. En la muestra restante no se observó fluorescencia positiva a la lectina. En los casos positivos, el patrón de fluorescencia fue similar, con una distribución homogénea y regular en las estructuras pseudoglandulares y acinares, con un ligero incremento en la intensidad en las zonas ductales. El estroma se observó con patrones irregulares y de menor intensidad, en forma de placas difusas bien delimitadas con grandes extensiones de zonas sin fluorescencia.

11.1.11.3.2. Adenocarcinoma pulmonar

En 2 de las 6 muestras se observó positividad a LTA con alta intensidad de fluorescencia; en una con mediana intensidad; y en las 3 restantes no se observó fluorescencia positiva a la lectina y sólo se observaron los núcleos en azul. En los casos en los que se observó la positividad a la lectina, ésta fue en patrones similares de distribución, de tipo homogéneo y regular, de predominio en el estroma con zonas hiperdensas y de mayor intensidad de fluorescencia formando bandas bien delimitadas incluidas en la zona. Las estructuras papilares y pseudoglandulares se observaron con mediana intensidad de fluorescencia, de predominio en las zonas periacinares.

11.1.11.3.3. Adenocarcinoma renal de células claras

2 de los 4 casos fueron positivos a LTA, con alta intensidad de fluorescencia; uno con baja intensidad y el restante no fue positivo a la lectina. En los casos positivos, el patrón de distribución fue similar, regular y homogéneo, en el estroma tisular en donde se observó algunas zonas en parches pequeños ligeramente de mayor densidad e intensidad de fluorescencia. Las zonas acinares se observaron con menor intensidad de fluorescencia aunque de manera similar, con patrones relativamente homogéneos.

11.1.11.3.4. Adenocarcinoma folicular de tiroides

En todos los casos se observó positividad a LTA con alta intensidad fluorescente. La distribución fue homogénea, en el estroma, con zonas de parches hiperdensas y con mayor intensidad de fluorescencia. Se observaron además, depósitos puntiformes de mayor densidad y fluorescencia diseminados en el estroma. Las zonas papilares se observaron con mediana intensidad, homogéneas y regulares.

11.1.11.3.5. Melanoma cutáneo maligno

En ninguna de las muestras se observó positividad fluorescente a LTA. La fluorescencia observada correspondió a los núcleos.

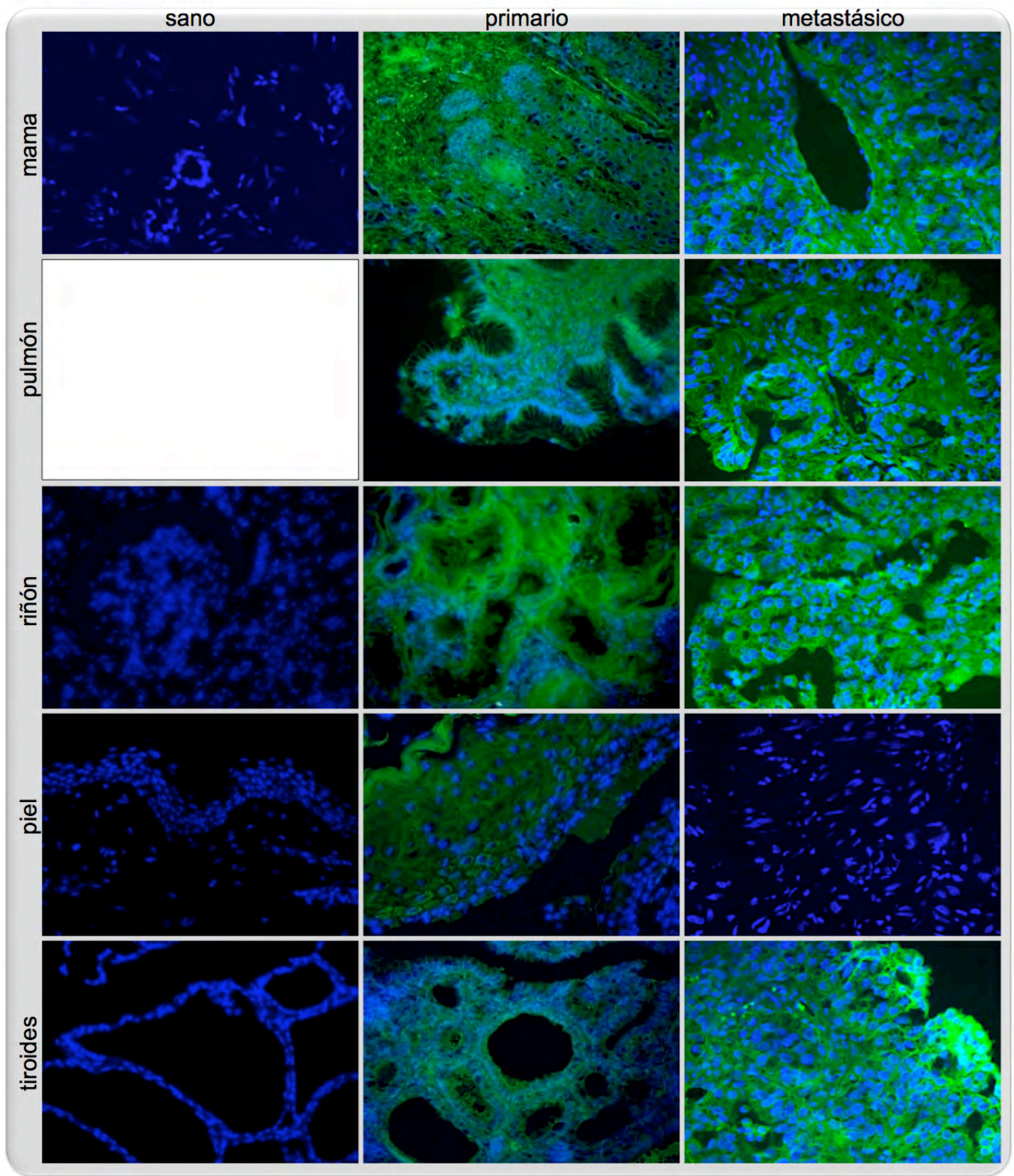


Figura 19. Histoquímicas con lectina LTA en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro. Lectina en canal verde (FITC), núcleos en canal azul (DAPI). 400X.

11.2. Tratamientos enzimáticos (sialidasa y tripsina)

En el tratamiento con sialidasa (Figura 20) las muestras de mamas sanas, de adenocarcinoma canalicular primario y metástasis a cerebro fueron sometidos a tratamiento con sialidasa de *Clostridium perfringes* a diferentes intervalos de tiempo antes de realizar determinaciones histoquímicas con lectinas. Después de 120 minutos (como tiempo óptimo), observamos incremento en la reactividad a lectinas PNA y MeA en las muestras tumorales; sin embargo, de forma similar que en las muestras tumorales no sometidas al tratamiento, la positividad de reactividad con las lectinas se observó en las zonas periglandulares, mioepiteliales e intraductales. El incremento en la reactividad a MeA se observó después del tratamiento con sialidasa sólo en los adenocarcinomas primarios y metastásicos; un leve incremento en la reactividad a ALL se observó en todas las muestras analizadas.

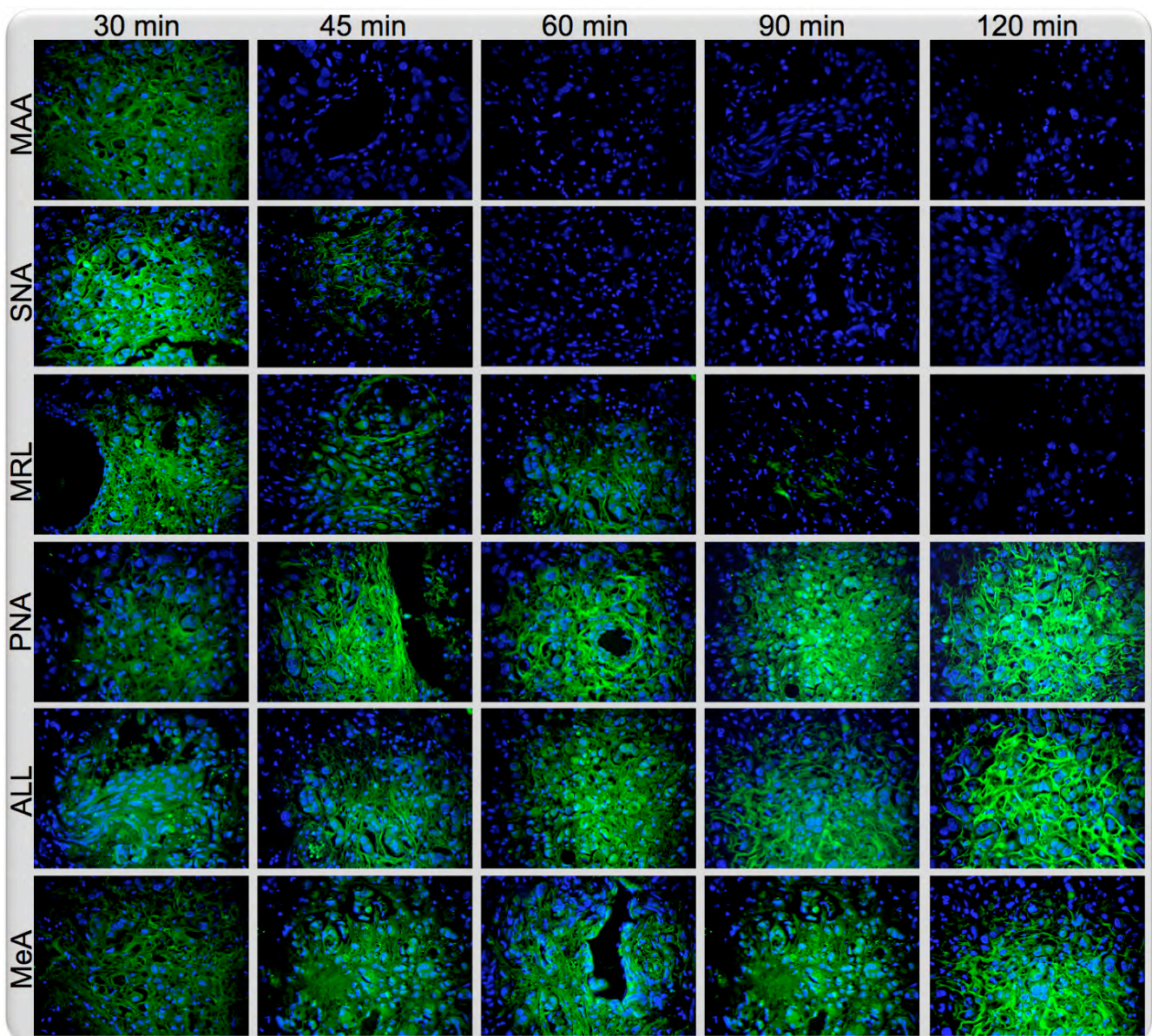


Figura 20. Tratamiento con sialidasa de *Clostridium perfringens* en las metástasis de origen mamario. Se observa la cinética de reactividad en función del tiempo (30 a 120 minutos) dependiendo de la lectina empleada. Las lectinas se visualizan en canal color verde (FITC), y los núcleos en canal color azul (DAPI). La reactividad a MAA ya no se observó a los 45 minutos. La reactividad a SNA ya no estuvo presente a partir de los 60 minutos. La reactividad a MRL se observó progresivamente decrecida hasta los 90 minutos en que persistieron trazas diseminadas escasa y débilmente y dejó de observarse a los 120 minutos. De manera inversa, la reactividad a PNA se modificó, siendo más intensa de forma proporcional al tiempo. MeA se comportó de forma similar a lo observado con PNA y ALL. 400X.

En el tratamiento con tripsina (Figura 21) bajo condiciones similares a las descritas para sialidasa, las muestras de mama sana, adenocarcinoma primario y metástasis a cerebro se sometieron a tratamiento a diferentes intervalos de tiempo con un tiempo óptimo de tratamiento de 120 minutos. El tratamiento con tripsina incrementó la reactividad a PNA en todas las muestras expuestas y, la reactividad a MeA fue similar tanto en los adenocarcinomas primarios

como en los metastásicos, aunque con mayor intensidad de reactividad en las metástasis. De forma similar a lo observado en el tratamiento con sialidasa, el tratamiento con tripsina no reveló posibles nuevos sitios de reactividad a las lectinas. La reactividad a ALL no mostró cambios sino hasta después de 90 minutos de tratamiento con la proteasa. Un detalle interesante fue que después de 120 minutos de tratamiento con tripsina, la reactividad a ALL en los órganos sanos, carcinomas primarios y metastásicos dejó de observarse.

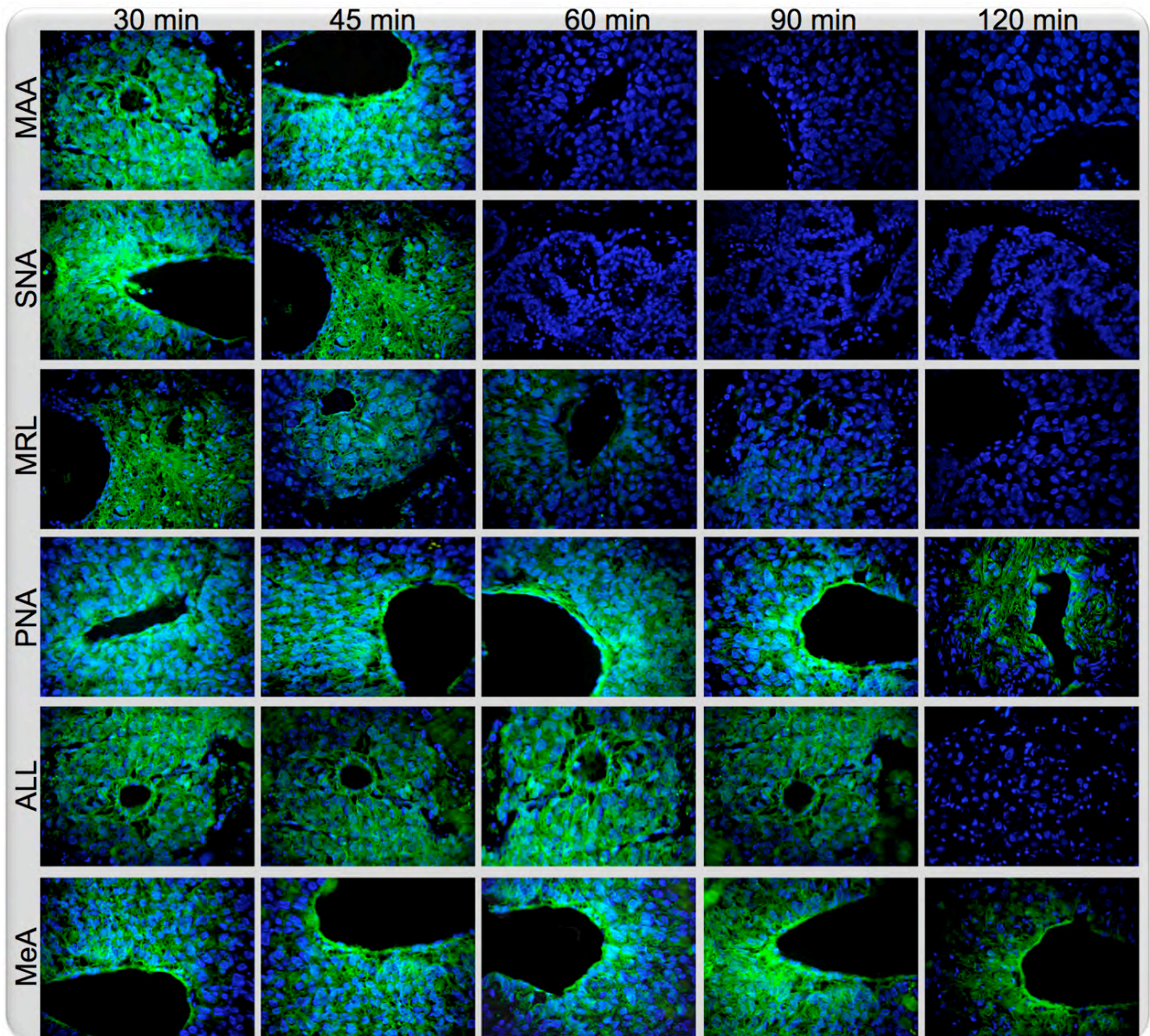


Figura 21. Tratamiento con tripsina en muestras de metástasis a cerebro de origen mamario. Se observa la cinética de reactividad en función del tiempo (30 a 120 minutos) dependiendo de la lectina empleada. Las lectinas se visualizan en canal color verde (FITC), los núcleos en canal color azul (DAPI).

11.3. Inmunohistoquímicas con anticuerpos

11.3.1. GFAP en metástasis a cerebro

En las inmunohistoquímicas con anticuerpo anti-GFAP (Figura 22) las muestras de origen pulmonar, mamario y renal mostraron baja inmunoreactividad a anticuerpos anti-GFAP. La inmunoreactividad fue escasa, encontrándose solo trazas principalmente en las zonas periglandulares (regiones de células mioepiteliales) incluidas en la masa tumoral. En el resto de la muestra no se observó inmunoreactividad. El resto de las muestras de origen ganglionar y tiroideo no mostraron inmunoreactividad a anti-GFAP.

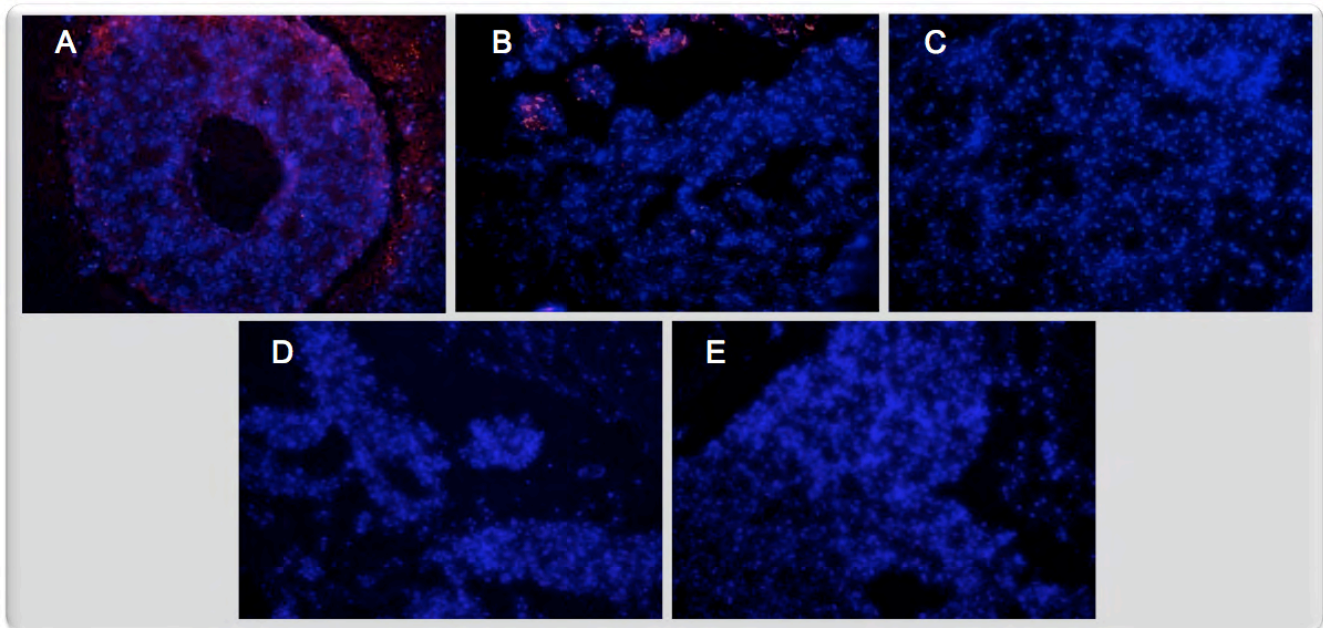


Figura 22. Inmunohistoquímicas con anticuerpo anti-GFAP en metástasis a cerebro. Anticuerpo en canal rojo (lissamina-rhodamina), núcleos en canal azul (DAPI). A: muestra de origen mamario. Se observa una estructura pseudo-glandular con inmunoreactividad del anticuerpo anti-GFAP en forma de trazas principalmente localizadas en la zona peri-glandular y mioepitelial (rojo). B: muestra de origen pulmonar en el que se observan estructuras acinares con inmunoreactividad en forma de depósitos en trazas diseminados entre estas estructuras. C: muestra de origen renal. D: muestra de origen cutáneo. E: muestra de origen tiroideo. No se observó inmunoreactividad a anti-GFAP en ninguna de las muestras en C, D, y E. 400X.

11.3.2. Sinaptofisina en metástasis a cerebro

En las inmunohistoquímicas con anticuerpo anti-sinaptofisina (Figura 23) las muestras de metástasis a cerebro de origen pulmonar, mamario, y tiroideo no mostraron inmunoreactividad a anti-sinaptofisina. Las muestras de origen renal mostraron baja inmunoreactividad a anticuerpos anti-sinaptofisina. En estas muestras, la inmunoreactividad fue escasa, encontrándose en forma

de trazas puntiformes principalmente en las zonas periglandulares (regiones de células mioepiteliales) incluidas en la masa tumoral. En otras zonas dentro de las masas tumorales se observaron escasas zonas puntiformes de inmunoreactividad.

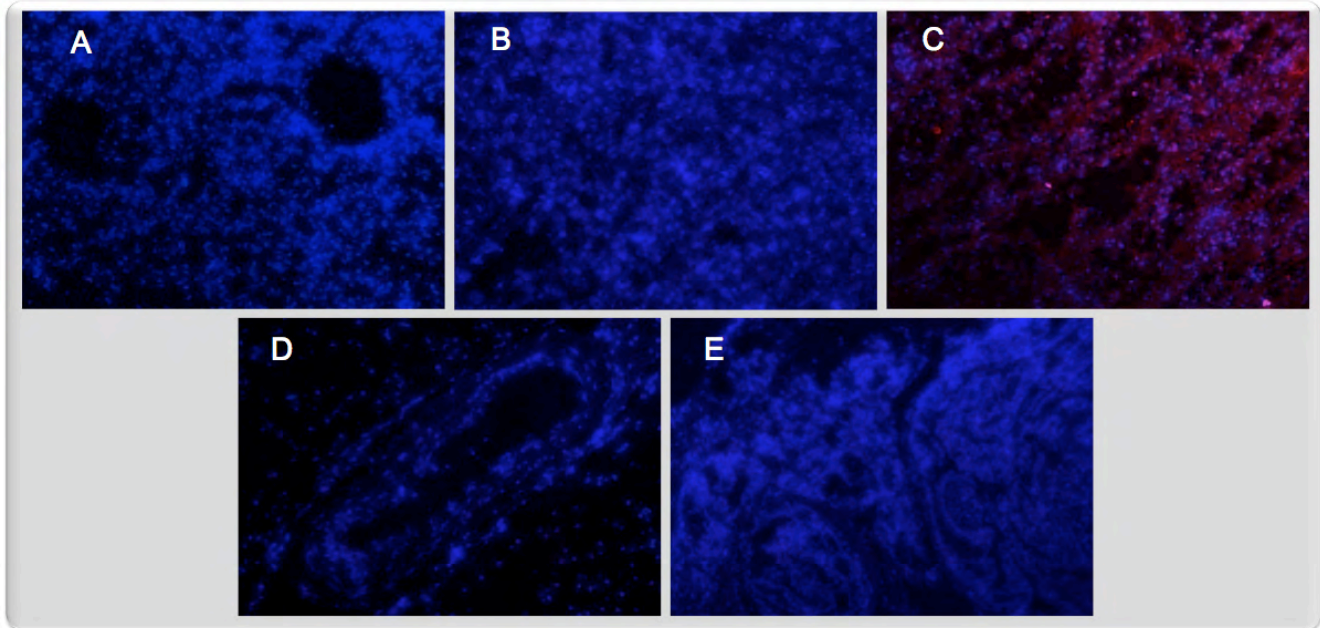


Figura 23. Inmunohistoquímicas con anticuerpo anti-sinaptofisina en metástasis a cerebro. Anticuerpo en canal rojo (rhodamina-Red X), núcleos en canal azul (DAPI). A: muestra de origen mamario. B: muestra de origen pulmonar. C: muestra de origen renal. D: muestra de origen cutáneo. E: muestra de origen tiroideo. Sólo en las muestras de origen renal (C) se observó inmunoreactividad a anti-sinaptofisina en forma de trazas diseminadas (rojo) en el estroma tisular. No se observó inmunoreactividad a anti-sinaptofisina en el resto de las muestras en A, B, D, y E. 400X.

11.3.3. NCAM en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro

Sólo tres casos de adenocarcinoma pulmonar, uno de los casos de adenocarcinoma renal y el caso de adenocarcinoma de tiroides fueron reactivos al anticuerpo anti-NCAM en forma de trazas, con baja intensidad de reactividad. En el resto de las muestras, no se observó reactividad al anticuerpo (Figura 24) y sólo se observa la fluorescencia azul de los núcleos con DAPI.

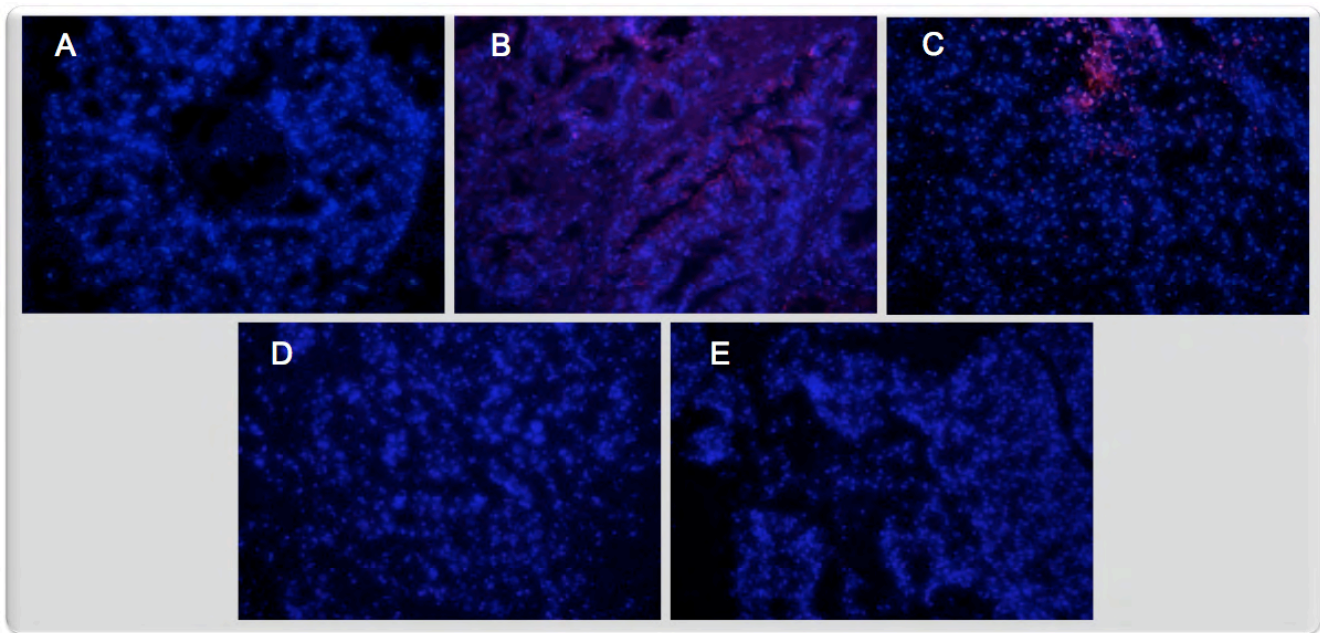


Figura 24. Inmunohistoquímicas con anticuerpo anti-NCAM en metástasis a cerebro. Anticuerpo en canal rojo (lissamina-rhodamina), núcleos en canal azul (DAPI). A: muestra de origen mamario. Se observa una estructura pseudo-glandular sin inmunoreactividad del anticuerpo anti-NCAM. B: muestra de origen pulmonar en el que se observan estructuras acinares con escasa inmunoreactividad en forma de depósitos puntiformes en trazas diseminados entre estas estructuras. C: muestra de origen renal, se observan estructuras acinares con inmunorreactividad escasa al anitcuerpo anti-NCAM puntiforme. D: muestra de origen cutáneo. E: muestra de origen tiroideo. No se observó inmunorreactividad en las últimas dos muestras. 400X.

11.3.4. PSA-NCAM en órganos sanos, carcinomas primarios y metástasis a cerebro

Todos los casos de metástasis a cerebro, excepto los casos de linfomas no Hodgkin de células peludas y el carcinoma papilar fueron reactivos al anticuerpo anti-PSA-NCAM. En este ensayo, la reactividad fue tal, que se pudo cuantificar de forma subjetiva, calificándola entre mediana y baja intensidad de reactividad. Uno de los casos de adenocarcinoma renal y uno de los casos de adenocarcinoma pulmonar, fueron los que mostraron mediana intensidad de reactividad. En el resto de los reactivos, fue baja (Figura 25).

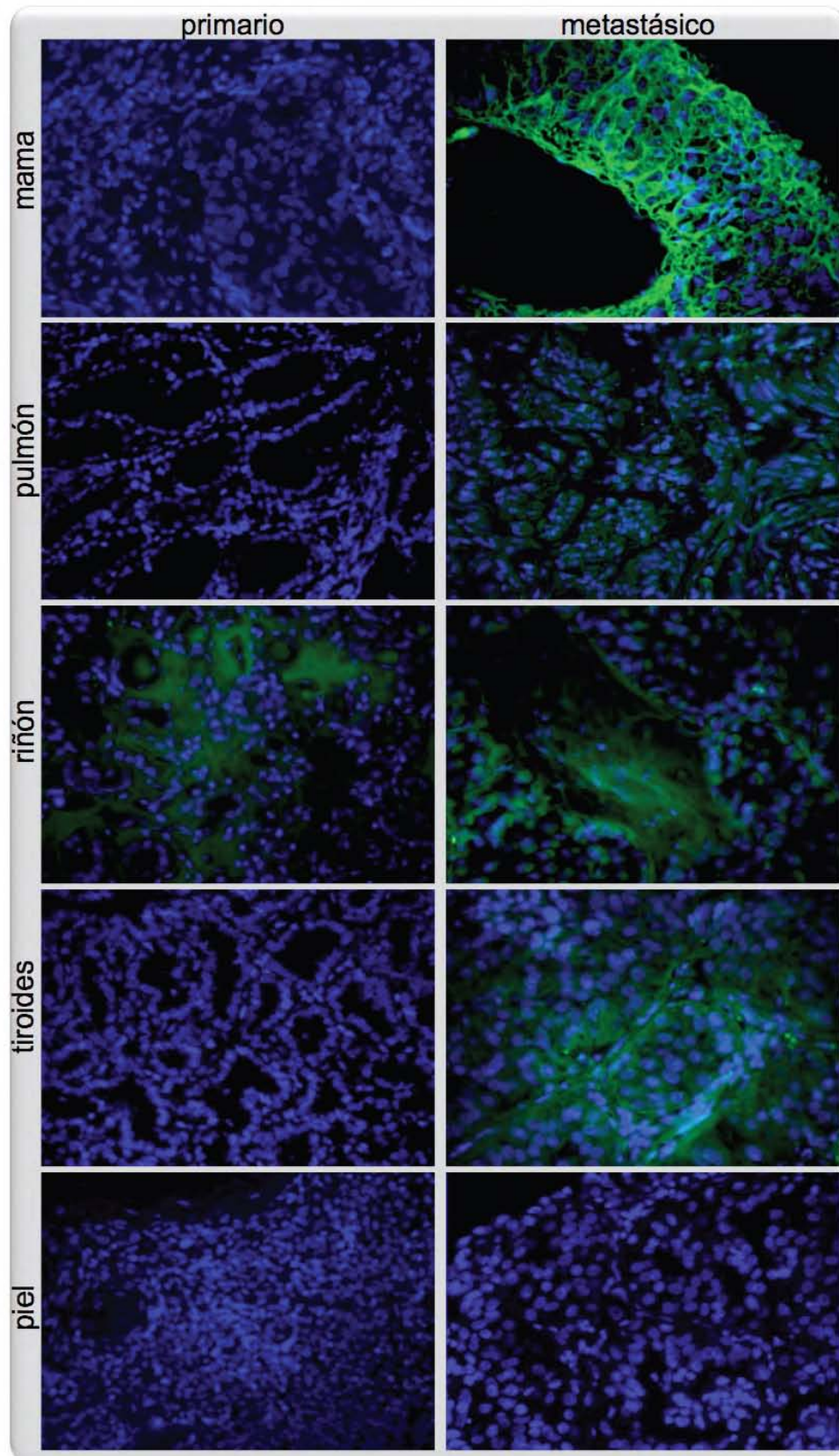


Figura 25. Inmunohistoquímicas con anticuerpo anti-PSA-NCAM en metástasis a cerebro. Anticuerpo en canal rojo (lissamina-rhodamina), núcleos en canal azul (DAPI). 400X.

Tabla 4. Reactividad de antígenos GFAP, sinaptofisina, NCAM y PSA-NCAM en muestras de metástasis a cerebro. Los casos en estudio se encuentran agrupados de acuerdo al tipo de estirpe celular de origen primario. Los símbolos de asterisco (*) significan trazas de anticuerpos identificados. Las marcas de una cruz (+) y dos cruces (++) implican baja y mediana intensidad de reactividad a los anticuerpos empleados, respectivamente.

Caso	Origen	GFAP	Sinaptofisina	NCAM	PSA-NCAM
B02-43	Mts de carcinoma epidermoide pulmonar	*		*	+
B02-251	Mts de carcinoma epidermoide pulmonar				+
B02-1098	Metástasis de adenocarcinoma pulmonar	*		*	+
B02-825	Metástasis de adenocarcinoma pulmonar			*	+
B02-285	Metástasis de adenocarcinoma pulmonar				++
B02-69	Metástasis de cáncer pulmonar				+
B02-820	Metástasis de adenocarcinoma renal		*		+
B02-247	Metástasis de cáncer de células claras				++
B02-250	Metástasis de cáncer de células claras		*	*	+
B02-763	Metástasis de cáncer de células claras		*		+
B02-99	Metástasis de carcinoma papilar	*			-
B02-167	Metástasis de linfoma no Hodgkin				-
B02-183	Metástasis de linfoma no Hodgkin				-
B02-100	Metástasis de cáncer de mama				+
B02-196	Metástasis de cáncer de mama				+
B02-1091	Metástasis de cáncer de mama	*			+
B02-963	Metástasis de cáncer de tiroides			*	+
B02-1048	Metástasis de melanoma maligno				+

CAPÍTULO 12

Discusión

Hemos identificado la reactividad de 10 estructuras glicosídicas relacionadas con la malignidad y potencial metastásico en tumorales de origen diverso. De igual forma, investigamos la presencia de antígenos de estirpe cerebral y algunos de los relacionados con el potencial maligno celular (NCAM y PSA-NCAM).

Las metástasis son la más grave complicación del cáncer, y los que con mayor frecuencia metastatizan al cerebro son el de origen pulmonar³³⁶ y el de mama²³. El cáncer mamario es uno de los cánceres más comunes no cutáneos diagnosticados y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. Las metástasis de mama se localizan en nódulos linfáticos cercanos a la mama que pueden diseminarse a través de vasos linfáticos o sanguíneos e implantarse en hueso, hígado, pulmón, vulva, ojo, o cerebro³³⁷. La detección oportuna de cáncer es crítica para la terapia exitosa, sin embargo, a la fecha sólo un pequeño grupo de antígenos asociados a tumores mamarios se emplean para el diagnóstico no invasivo en el cáncer de mama³³⁸. La transformación maligna está íntimamente asociada con alteraciones en antígenos glicosídicos en células tumorales. Los antígenos glicosilados han sido considerados potenciales biomarcadores de riesgo para cáncer mamario y detección de la enfermedad. Los cánceres epiteliales exhiben incrementos en la expresión de antígenos O-glicosídicos de tipo mucínico alterados³³⁹.

Un cambio fenotípico común en la malignidad celular es la transformación de la glicosilación celular. Los carcinomas primarios de origen mamario mostraron alta reactividad a ALL en las regiones glandulares, mientras que la reactividad a ALL en los órganos sanos se observó en zonas del estroma tisular (Figura 10). En los metastásicos, la reactividad a ALL estuvo presente y restringida a la periferia de las estructuras acinares pseudoglandulares e intraductales en forma homogénea, en comparación con el estroma que mostró pobre reactividad. En las muestras pulmonares, se observó la reactividad en los tumores primarios y metastásicos, aunque la mayor intensidad de reactividad y el patrón homogéneo predominaron

en los primarios. En las metástasis la reactividad estuvo más intensa en las estructuras glandulares con fibras de tejido conectivo intensamente positivo y el resto con menor intensidad. Resulta interesante que tratándose de tumores cuyo origen es a nivel glandular, sean éstas estructuras las que tienen la mayor presencia de reactividad a ALL, particularmente por que son las estructuras a partir de las cuales tiene lugar la expansión clonal tumoral y por consiguiente metastásica, por ser adenocarcinomas, como se ha descrito para otros modelos tumorales como el colorectal³⁴⁰, al parecer, la presencia de este tipo de estructuras glicosídicas podría favorecer la carcinomatosis mamaria tal como se ha observado en otros tipos de cánceres. En las muestras renales, la reactividad estuvo presente en los tres estadios celulares (sano, primario y metastásico) con predominio de intensidad en los primarios, de forma homogénea tanto en las zonas glandulares como en el estroma (figura 10). Contrariamente, en los sanos la reactividad aunque homogénea, fue significativamente de menor intensidad, y en los metastásicos, aunque con mayor intensidad, el patrón de presentación fue principalmente en el estroma. Al igual que en el caso anterior, la mayor reactividad a la lectina en los tumorales podría reflejar la participación de este tipo de glicoconjugados (el disacárido *T* o *Tn*) en la carcinogénesis¹¹². La presencia del disacárido *T* en la superficie de células cancerosas es resultado de síntesis tardía en vías de tránsito de sialomucinas. Este hecho por lo tanto, es resultado de alteraciones en la maquinaria de *O*-glicosilación en células tumorales³⁴¹. En individuos sanos, estos antígenos se asocian con células inmaduras, y más aún, se ha identificado que poblaciones celulares ALL+ poseen una alta resistencia a la apoptosis¹⁴². Se ha indicado que la expansión tumoral tiene lugar en primer lugar en regiones glandulares más que en regiones del estroma, sugiriendo que la *O*-glicosilación en las estructuras glandulares pudiera estar asociada con la protección celular contra el reconocimiento inmunológico, la adhesión y migración celular, e incrementa la resistencia celular a la muerte¹⁹⁷. En las muestras de piel, la reactividad se observó solamente en aquellas sanas y las de melanoma maligno primarios, siendo más intensa en los tumorales. En los sanos, la reactividad estuvo presente principalmente en la epidermis comparado con la dermis (estroma),

mientras que en los tumorales la reactividad se observó en patrón inverso a los sanos, con mayor intensidad en la dermis (el estroma) comparado con la epidermis. Los metastásicos no fueron positivos a la lectina. En este caso es interesante que se observe un patrón invertido de reactividad entre el estroma y la epidermis. Mientras la epidermis forma parte de las capas superficiales de la piel, el estroma contiene los vasos sanguíneos, linfáticos y circuitos nerviosos, además de las condiciones tróficas adecuadas para la generación y expansión celular. Es interesante observar que en el melanoma maligno la reactividad sea de mayor intensidad en el estroma, sobre todo por contener los factores nutricios propios para el desarrollo tumoral, aunque el origen sea en las capas basales de la epidermis (los melanocitos). La ausencia de reactividad en la metástasis sugiere la pobre o nula participación del disacárido *T* o *Tn* en la metástasis establecida, no así en el desarrollo tumoral primario. Las muestras de tiroides sanas no fueron positivas a ALL, mientras que los adenocarcinomas primarios y los metastásicos si mostraron reactividad, aunque con mayor intensidad en los últimos. En los primarios la reactividad fue de predominio en las zonas peri-foliculares, mientras que en las metástasis se observó homogéneamente distribuida. Trabajos experimentales como el de Bresalier y cols.³⁴² reportan que los carcinomas primarios expresan mayor cantidad de disacáridos *T* que las metástasis. Contrariamente a este reporte, nosotros encontramos mayor interacción de la lectina ALL en las metástasis. Nuestros resultados son acordes con los de Yu³⁴³, que reporta una asociación directa entre la expresión del disacárido *T* y la progresión tumoral. Los antígenos *T* y *Tn* han sido sugeridos como marcadores tempranos de detección para cáncer de mama^{344,345}, y para carcinoma hepatocelular³⁴⁶; y han sido considerados asociados con tumores con alto riesgo metastásico³⁴⁷. El disacárido *T* probablemente es más funcional, desde el punto de vista de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, en la metástasis establecida que en la carcinogénesis. ALL reconoce GalNAc en O-glicopéptidos con *core* 1 que contienen al disacárido Gal β 1,3GalNAc α 1,0-Ser/Thr (antígeno *T*) o GalNAc α 1,0-Ser/Thr (antígeno *Tn*) que pueden o no estar sialilados. ALL es específica para GalNAc en O-glicoproteínas³⁴⁸. Es importante la

presencia de este tipo de estructuras glicosídicas de manera preferencial en las metástasis, dado que son antígenos glicosilados presentes en muchos carcinomas humanos¹⁴⁰ que participan en la agregación y adhesión celular para potencialmente hacerse metastásicos¹⁴², sobre todo cuando se descubren por eliminación de residuos de carbohidrato que en condiciones normales los cubren¹⁴¹. Mas interesante aún resulta el hecho de la especificidad que tienen las GalNAcT para cada tejido¹⁴⁴ y por lo tanto, la ausencia de secuencias consenso en las estructuras O-glicosídicas, que confieren la alta complejidad y selectividad funcional a las mismas. La presencia de residuos Gal es frecuente en células transformadas, e induce la producción de anticuerpos anti-Gal, un anticuerpo natural que representa cerca del 1% de las inmunoglobulinas G (IgG) circulantes dentro del suero humano. Estos anticuerpos son una línea de defensa anti-tumoral, reducen considerablemente las facultades de las células malignas de fijarse a tejidos sustratos y limitar la expansión tumoral y la metástasis³⁴⁹.

En muestras de mama sanas, observamos intensa reactividad a PNA (Figura 11) en las zonas del estroma tisular, mientras que en las estructuras glandulares se observó pobre reactividad. En el adenocarcinoma mamario este reconocimiento se modificó, y en las regiones del estroma observamos baja reactividad a PNA, y en las regiones glandulares se incrementa la reactividad. En las metástasis la reactividad se observó con un patrón similar al observado con ALL, en zonas pseudo-glandulares de predominio periacinar e intraductal. PNA reconoce el grupo hidroxilo en el carbono 4 de galactosas terminales presentes en el antígeno T (Gal β -1,3-GalNAc) y en lactosaminas (Gal β -1,4-GlcNAc) en N-glicanos de glicoproteínas y glicolípidos³⁵⁰. Es importante hacer notar que la reactividad sufre un patrón invertido cuando observamos las muestras sanas y las comparamos con los tumorales primarios. Mientras que en los sanos la reactividad es menos intensa y se presenta principalmente en el estroma, en los primarios el estroma se torna menos intenso y las zonas glandulares intensamente reactivas. La reactividad predomina en intensidad en zonas acinares en las metástasis, lo cual nuevamente sugiere la importancia de las estructuras glicosídicas afines a PNA (principalmente lactosaminas) en la

expansión clonal tumoral y la metástasis exitosa, de forma similar a lo que observamos con ALL. En las muestras de origen pulmonar primario, observamos una pobre reactividad en los primarios comparado con los metastásicos. En los tumores primarios, la reactividad aunque homogénea, fue predominantemente glandular, y en los metastásicos fue homogénea. Al igual que lo observado en las muestras de mama, nuevamente se repite el patrón de expresión homogéneo en las metástasis, sugiriendo la participación de las estructuras PNA-reactivas en la implantación metastásica. Las muestras renales sanas y tumorales primarios mostraron un patrón de intensidad de reactividad similarmente bajo y homogéneo, mientras que en las metástasis la intensidad fue mayor y se observó principalmente en las fibras de tejido conectivo. Estas observaciones sugieren que las estructuras glicosídicas lactosamínicas reactivas a PNA podrían desempeñar funciones importantes en el estroma tumoral metastásico, dado que esta interacción ha sido empleada como selectivo marcador tumoral^{351,352}. Las muestras de piel fueron positivas en los tres estadios celulares. En los estadios sanos, la reactividad se observó homogénea tanto en la epidermis como en la dermis. Sin embargo, cuando observamos las muestras tumorales primarios la intensidad de reactividad se incrementa y predomina en zonas del estroma en estructuras papilomatosas, de forma interesante por que son las estructuras que suelen formar los nidos tumorales. En las metástasis la reactividad fue homogénea y de intensidad similar a lo observado en los primarios. Es posible que en el melanoma maligno este tipo de estructuras cumpla funciones que el disacárido específico para ALL no cumple, dada la similitud en las estructuras. Las muestras de tiroides fueron positivas en los tres estadios con intensidad similar. Sin embargo, en los tumorales primarios y los metastásicos, predomina la reactividad en el estroma, comparado con los sanos que se observó principalmente en las estructuras foliculares. Aunque se trata de carcinomas foliculares, la presencia de las lactosaminas reactivas a PNA en el estroma podrían desempeñar funciones importantes en la carcinogénesis y la metástasis, como se ha venido ilustrando en otros modelos.

En muestras de mamas sanas no observamos reactividad a MeA (Figura 12), pero la reactividad se observó alta en zonas glandulares de adenocarcinomas primarios y con mayor intensidad en las zonas pseudo-glandulares acinares de los metastásicos. En el cáncer primario, la reactividad a MeA fue mayor que a PNA en las zonas glandulares. Las muestras tumorales de origen pulmonar tanto primario como metastásico fueron positivos a MeA, con predominio de reactividad en zonas glandulares, aunque en las metástasis la intensidad de reactividad fue mayor en áreas peri-glandulares, comparado con los primarios. Las muestras renales sanos no fueron positivos a la lectina, mientras que los tumorales primarios y los metastásicos si mostraron reactividad, ésta fue mayor en los metastásicos principalmente en el estroma, mientras que en los primarios se observó homogéneo y de menor intensidad. La ausencia de reactividad en las muestras sanas coloca a este tipo de estructuras O-glicosídicas de tipo mucínico complejas como antígenos glicosilados tumorales, probablemente con mayor participación en estadios metastásicos que en primarios. De forma similar a lo observado en las muestras renales, en las de piel no se observó reactividad en los estadios sanos, y de forma similar, los melanomas malignos primarios fueron menos intensamente positivos que los metastásicos, apoyando la posibilidad de relacionar este tipo de estructuras glicosídicas con la transformación celular maligna. En las muestras de tiroides se observó reactividad en los tres estadios, aunque fue muy baja en los sanos y de predominio en zonas de células foliculares. Este patrón se conservó similar en los tumorales primarios, y resaltó la intensidad muy alta y homogénea en las metástasis. MeA reconoce el β -galactósidos en estructuras O-glicosídicas con terminales Gal β -1,4- presentes en mucinas complejas³⁵³. Aunque MeA aglutina por igual eritrocitos humanos A, B u O, muestra alta especificidad por mucínicos que contengan grupos sanguíneos A+H. Se considera que las estructuras relacionadas con el antígeno H confieren fenotipos celulares malignos con potencial metastásico^{354,399}. Los antígenos A, B y H no solamente son expresados por los eritrocitos, sino también por diversos tejidos que incluyen células epiteliales y endoteliales. Estos antígenos también existen como moléculas hidrosolubles cuya expresión está

determinada por el *locus* secretor. La expresión de los antígenos del grupo A por células tumorales de cáncer de células no pequeñas de pulmón está íntimamente correlacionada con la larga supervivencia de los pacientes cuando la muestra se examina en estadios tempranos de desarrollo (61% de los tumores positivos)³⁵⁵. Existe una correlación entre el potencial de metástasis de cáncer de células no pequeñas de pulmón y la pérdida de expresión de antígeno A (46%)³⁵⁶. También se ha observado una tendencia a mejor pronóstico en cáncer escamocelular y mucho mejor pronóstico en adenocarcinoma pulmonar³⁵⁷ cuando expresan antígenos A que cuando está presente otro tipo. Los epítopes de carbohidratos juegan una importante función en la progresión tumoral y la metástasis, en parte por su habilidad para modular interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, así como su influencia sobre la inmunidad del huésped y pasar inadvertidas. Dentro de estos antígenos de carbohidratos alterados asociados a cáncer, se encuentran los del grupo sanguíneo Lewis, con aumento en la expresión de cadenas tipo 1 [Gal β -1,3-GlcNAc- β -R] y tipo 2 [Gal β -1,4-GlcNAc- β -R], expresión que se estructura como poli-*N*-Acetil-lactosamina; alteraciones en oligosacáridos de tipo O-glicosídico e incremento en el ramificado de oligosacáridos de tipo *N*-glicosídico, en particular en antenas β -1,6-. De especial relevancia en el carcinoma colorectal es la expresión alterada de determinantes ABH, que pueden llevar a la pérdida de la expresión de estos determinantes en tumores del colon proximal, re-expresión de patrones antigénicos fetales de determinantes ABH en tumores del colon distal. Estudios recientes³⁵⁸ demostraron que la transfección de cADN que codifica glicosiltransferasas del grupo A dentro de células de carcinoma de colon que expresan antígenos del grupo H, disminuyen su motilidad celular; el grupo A mantiene la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular de tipo benigno en tumores colo-rectales. Se han identificado a las integrinas α -3 y β -1 como las principalesceptoras de glicoproteínas del grupo A en células de cáncer colorectal³⁵⁹. La expresión alterada de determinantes ABH en receptores de moléculas de adhesión que incluyen a integrinas, puede de esta manera, contribuir a la progresión tumoral por modulaciones de la interacción célula tumoral-matriz extracelular. En el caso del cáncer de

páncreas, cuando expresa antígenos del grupo A y se torna ramificado β -1,6- se asocia a procesos malignos y aumenta la agresividad tumoral. La expresión de estos antígenos ABH ocurre en todo el tracto gastrointestinal en estadios fetales, pero se limita al antígeno determinante después del nacimiento. En los tumores, estos antígenos fetales se tornan nuevamente expresados o sobre expresados³⁶⁰.

En las metástasis la reactividad a ALL se observó en patrones en forma de parches de predominio en estructuras glandulares y ductales, y con menor intensidad en el estroma. Mientras, la reactividad a PNA se observó heterogénea con mayor intensidad de fluorescencia en las estructuras glandulares, presente en más del 61% de los casos estudiados. El patrón de reactividad a MeA en las metástasis demostró ser diferencial, y la posible participación del receptor a MeA en la carcinogénesis no puede ser investigada debido a que no estuvo presente en los tejidos sanos.

Las muestras de mamas sanas y tumorales primarios fueron positivas a LPA (Figura 13), no así los metastásicos. La intensidad de reactividad fue mayor en los tumorales primarios que en los sanos, aunque en los sanos se observó principalmente en las zonas glandulares, mientras que en los tumorales primarios predominó en el estroma. La sobre-expresión de ácido siálico ha sido asociada con la transformación celular maligna³⁶¹. En las muestras de mama se refuerza este hecho, pero no está claro en las metástasis. Esto sugiere que al menos las estructuras sialiladas afines a LPA cumplen con la descripción de transformación tumoral, pero no en la metástasis, en las que observamos un predominio de otras formas de sialilación o glicosilación no predominantemente de siálico. En los carcinomas pulmonares tanto primario como metastásico, la reactividad se observó en intensidad y patrón semejante, con un leve incremento en la intensidad en los primarios predominando en el estroma, mientras que en los metastásicos se observó homogéneo tanto en el estroma como en las zonas pseudo-glandulares. Las muestras de riñones sanos y tumorales primarios fueron positivos a LPA, en un patrón e intensidad similar. Nuevamente, no queda clara la relación entre el incremento en la sialilación descrita durante la

transformación celular maligna, sobre todo cuando no se modifica sustancialmente la reactividad al pasar a la carcinogénesis y las metástasis no fueron reactivas. En las muestras de piel sanas, la ausencia de reactividad en parte apoya la idea de la hipersialilación, pero en los tumorales primarios y metastásicos el patrón de reactividad y presentación fue similarmente bajo y homogéneo, con un leve incremento en las metástasis principalmente en zonas peri-glandulares. En las muestras de tiroides sanos no se observó reactividad, mientras que en los tumorales primarios y en los metastásicos la reactividad estuvo presente, fue en los primarios que se observó ligeramente con mayor intensidad la reactividad.

Las muestras mamarias mostraron ser positivas a MAA en los tres estadios (Figura 14). En los sanos la reactividad se observó de baja a mediana intensidad, comparado con los tumorales en que se incrementó la intensidad. Sin embargo, en los metastásicos se observó la mayor intensidad de reactividad. Contrariamente, en los pulmonares primarios se observó mayor intensidad que en los metastásicos, en los que además el patrón de reactividad fue principalmente en las zonas del tejido conectivo. En las muestras renales, la intensidad y patrón de reactividad en los sanos y tumorales primarios fue similar, principalmente en el estroma aunque los sanos mostraron ser ligeramente más positivos en estas zonas. Las estructuras glandulares se mantuvieron con intensidad leve en ambos estadios. En los metastásicos observamos la mayor intensidad de reactividad, prevaleciendo ésta en el estroma. Las muestras de piel sanas mostraron una alta reactividad en el estroma (dermis) y con menor intensidad en la epidermis, mientras que en los tumorales primarios la intensidad de reactividad fue menor, aislada en forma de parches en el estroma y no se observó en las metástasis. Algo similar observamos en las muestras tiroideas. Las sanas mostraron ser medianamente positivos a MAA en las zonas de células foliculares, mientras que los tumorales primarios y los metastásicos no fueron positivos a MAA.

En cuanto a la reactividad a SNA, las muestras de mamas sanas mostraron menor intensidad de reactividad comparado con los tumorales, tanto primario como metastásico (Figura

15). Mientras que en los sanos y tumorales primarios la reactividad se observó en el estroma tisular, siendo más intensa en los tumorales, en las metástasis la mayor reactividad estuvo presente en la periferia de estructuras acinares pseudo-glandulares e intraductales. Las muestras tumorales pulmonares, tanto primarios como metastásicos, tuvieron una intensidad de reactividad similar, estando presente principalmente en zonas glandulares. Las muestras renales fueron positivas en los tres estadios. La reactividad fue similarmente de baja intensidad en los sanos y tumorales primarios, prevaleciendo en el estroma, mientras que en los metastásicos se observó en zonas acinares y el estroma, aunque la mayor intensidad estuvo presente en zonas peri-acinares. Las muestras de piel mostraron reactividad solamente en estadios sanos y tumorales primarios. La reactividad fue similarmente baja y de predominio en el estroma, ligeramente mayor en los tumorales. Los metastásicos no fueron positivos. Contrariamente, en las muestras de tiroides observamos reactividad en los tres estadios, pero la intensidad fue muy baja en los sanos, en zonas foliculares. Se incrementó la intensidad al observar los tumorales primarios y prevaleció en el estroma. Pero en los metastásicos la intensidad fue superior y homogénea. La reactividad de Neu5Ac- α -2,6-Gal/GalNAc en las muestras estudiadas, en general muestra este patrón antes descrito, con incrementos en la reactividad en las muestras tumorales primarias y un decremento en las metastásicas. Es significativo el que en algunas muestras estudiadas como las de mama, la reactividad de este tipo de antígenos es menor en comparación con Neu5Ac- α -2,3-Gal/GalNAc tanto en las muestras sanas como en los tumorales primarios. En otros órganos como el tiroides, se torna ausente la reactividad de Neu5Ac- α -2,3-Gal/GalNAc y presente Neu5Ac- α -2,6-Gal/GalNAc, con mayor intensidad en la metástasis al cerebro. Tal como se ha reportado, la presencia de Neu5Ac- α -2,6-Gal/GalNAc en algunos tipos de cánceres es factor de mal pronóstico³². Aunque también las estructuras Neu5Ac- α -2,3-Gal/GalNAc se asocian con la metástasis mediada por moléculas de adhesión³⁵. En general, la presencia de estructuras glicosídicas como las afines a MAA (Neu5Ac- α -2,3-) se han empleado como marcadores de recuperación frente a algunas formas de cáncer como el gástrico³⁶². Es importante hacer notar

que la expresión de sialiltransferasa6GalNAc I (ST6GalNAc I) en células de cáncer mamario modifica de manera importante el patrón de glicosilación e incrementa la tumorigenicidad³⁶³ siendo considerado incluso un marcador inmunohistoquímico para cáncer de mama³⁶⁴. En nuestras muestras, evidenciamos un incremento en la reactividad a SNA afín al producto de este tipo de transferasa, comparado con MAA. La presencia de este tipo de estructuras glicosídicas en las muestras estudiadas, refleja la participación preferente de siálicos en posición α -2,6-, portadores de mal pronóstico en células cancerosas, aportando fenotipos celulares con potencial invasivo y metastásico.

En las muestras sanas de mama no se observó reactividad a MRL (Figura 16); en cambio en las tumorales primarias y metastásicas la reactividad se observó tanto en el estroma como en zonas glandulares y papilomatosas en patrones similares de intensidad y presentación homogénea, predominando la reactividad en zonas peri-acinares y ductales en los metastásicos. Las muestras tumorales pulmonares fueron positivas a MRL, ambos estadios en zonas glandulares, con patrones similares de intensidad aunque ligeramente mayor en las metástasis. Las muestras renales tumorales tanto primarios como metastásicos fueron positivos a la lectina fundamentalmente en el estroma tisular, siendo más intensa la reactividad en los primarios. Las muestras sanas no fueron positivas a la lectina. En las muestras de piel la reactividad estuvo presente sólo en los de estadio tumoral primario; los sanos y los metastásicos no fueron positivos. En los primarios la reactividad fue homogénea tanto en la epidermis como en la dermis. Las muestras de tiroides a diferencia de los cutáneos, mostraron reactividad solamente en los estadios metastásicos, los sanos y tumorales primarios no fueron positivos. En los metastásicos la reactividad fue de muy alta intensidad y homogénea. Las O-acetilaciones del ácido siálico en los carbonos 5,7,9 que reconoce MRL, estuvo ausente en todos las muestras sanas, excepto el cerebro, que mostró una baja intensidad de reactividad a estas terminaciones sialiladas. En el resto de las muestras, la intensidad fue siempre mayor en las metástasis, que en los tumorales primarios. La notable excepción fueron las metástasis de origen cutáneo, que no mostraron

reactividad. Y los tiroideos primarios que al igual que el caso antes descrito, no mostraron ser positivos. Es muy probable que la participación de este tipo de antígenos sea crucial para el desarrollo metastásico, dada la variedad de interacciones, fundamentalmente a nivel del sistema inmunológico⁴⁴ que favorecen la migración celular tumoral a distancia hasta su implantación en sitios secundarios, particularmente por ser inductoras de fenotipos celulares primitivos y dediferenciados con potencial de transformación celular. Además, las conveniencias de O-acetilarse el siálico son notables para el desarrollo tumoral y la metástasis exitosa. Su presencia ha sido asociada con estadios celulares primitivos³⁶⁵, sumado a la protección que ejerce este tipo de siálicos frente a la evasión y la activación del reconocimiento inmunológico a través de la vía alterna del complemento²⁸⁶. Es interesante hacer notar que, aunque este tipo de acetilaciones está presente en tejidos de origen neuroectodérmico²⁸², no todas las muestras que fueron positivas provienen de este origen (v.g. endodermo: tejido pulmonar). El hecho que las muestras sanas en general (salvo el cerebro) no hayan sido positivas a MRL, revela los estadios de diferenciación a los que se someten las células tumorales, que no importando el origen embrionario, pueden llegar a ser fenotípicamente tan des-diferenciadas como otras láminas embrionarias, y por tanto, la asociación de este tipo de residuos glicosídicos con la transformación celular maligna es evidente. En el caso del cerebro sano, es de comprender que su origen embrionario (ectodermo) y las capacidades de plasticidad que le caracterizan y diferencian de otros tejidos, podría llevar a sugerir la presencia de este tipo de glicanos como un patrón normal de presentación glicosídica.

Aunque todas las muestras estudiadas fueron positivas a Con-A, en algunos como el de mama o el dérmico, fue mayor la reactividad en órganos sanos y tumorales primario y menor en la metástasis, de hecho, en el cutáneo metastásico no se observó reactividad. En general, en las muestras de mama la reactividad fue similarmente homogénea y se observó tanto en estructuras papilomatosas y glandulares, como en el estroma. En otros como en renal o el tiroideo, se mantiene más alta en la metástasis que en el tumoral primario y en el sano. En las muestras

pulmonares la reactividad estuvo presente con mayor intensidad en los estadios tumorales primarios, aunque en ambos estadios tumorales la reactividad fue homogénea. Estos datos sugieren que para que migren las células metastásicas es necesario un decremento en la presencia de estos residuos. La presencia de reactividad a Con-A en algunos tipos de cánceres, es marcador de re-incidencia tumoral. La sobre-expresión de residuos de manosa que le confieren a la lectina Con-A la propiedad de generar agregación celular de células tumorales, no así en células sanas³⁶⁶ ha hecho que Con-A se haya empleado como marcador de carcinogénesis de células epiteliales de vejiga urinaria³⁶⁷. Las O-glicosilaciones ocupan la mayor proporción de eventos implicados en la malignidad celular, en parte debido a su amplia gama de expresión, complejidad y especificidad. De esta forma, la manosilación no sería importante para la metástasis, pero sí para la re-incidencia tumoral.

La reactividad a residuos de Fuc se ha asociado con la malignidad y agresividad celular. Los antígenos de los grupos sanguíneos son los mejores representantes de glicoconjugados fucosilados no malignos. Los residuos de Fuc funcionan como componentes para ligandos de carbohidratos para los receptores de selectinas. Los ligandos fucosilados a selectinas están relacionados con el antígeno Sialil Lewis^x (SL^x). El epítipo L^x es un α -1,3-Fuc que se expresa durante la vida embrionaria principalmente, y promueve la adhesión célula-célula en embriones. La interacción hemofílica carbohidrato-carbohidrato favorece la integración embrionaria mediada por L^x. La expresión del antígeno sialil Lewis^a (SL^a) se correlaciona con un pronóstico pobre en el caso de colangiocarcinoma y participa en la invasión vascular tumoral³⁶⁸. Las selectinas también han sido implicadas en la metástasis tumoral³⁶⁹ al igual que una serie de moléculas de adhesión, e incluso se ha demostrado que existe una expresión tisular-específica que favorece la metástasis³⁷⁰. La sobre regulación de antígenos L^x y SL^x en el cáncer se asocia con alto grado de malignidad y un pobre pronóstico³⁷¹. La expresión de SL^x favorece la metástasis hematógica en un mecanismo similar al observado en la inflamación³⁷². Además, este antígeno bloquea la infiltración leucocitaria dentro de la masa tumoral debido a la secreción de un inhibidor de

adhesión leucocito/endotelio que contiene SL^{x/a}. E-Cadherina se fucosila en células altamente metastásicas pulmonares, en contraparte con las células con bajo potencial metastásico que no expresan Fuc, cambio que sirve como marcador indicativo pronóstico para tumores pulmonares que pueden dar metástasis³⁷³. El incremento de residuos de Fuc se ha evidenciado en diversos cánceres agresivos como el carcinoma de páncreas³⁷⁴, y marcadamente en adenocarcinoma de colon³⁷⁵ y de próstata³⁷⁶. De igual forma, el incremento en la tumorigenicidad mediada por la expresión de residuos fucosilados, particularmente α -1,2-fucosilación, se asocia con aumento en la resistencia a la apoptosis y escape del control inmunológico de las células tumorales y el éxito en la supervivencia³⁷⁷. Con la finalidad de evidenciar la presencia de Fuc en las muestras estudiadas, se evaluó la interacción con LcH (Figura 18) y LTA (Figura 19). Antígenos glicosilados que interactúan con LcH se encuentran en el 80% de las muestras tumorales primarios estudiados y más del 72% de los metastásicos. LcH es afin a D-Man y D-Glc. Es muy similar en muchos aspectos a Con-A, sobre todo en su reactividad con linfocitos, polisacáridos y glicoproteínas, pero LcH muestra mayor reconocimiento por residuos manosídicos con centro de iniciación (*core*) quitobiosil y α -1,6-fucosilados en terminales reducidas de GlcNAc, en comparación con Con-A que es más a fin a estructuras de *N*-glicanos de tipo alta manosa. Pese a esta selectividad mayor por manosilados con Fuc, este residuo de carbohidrato no es un inhibidor efectivo de la actividad de LcH³⁷⁸. LcH ha sido una herramienta predictiva de malignidad en carcinoma hepatocelular³⁷⁹; en este caso, la cantidad de fucosilación de las cadenas de carbohidrato de α -proteínas se sitúa como un marcador temprano de diagnóstico de carcinoma hepatocelular y directamente proporcional al grado de agresión tumoral y valor pronóstico³⁸⁰. En las muestras estudiadas, la presencia de residuos de Fuc se correlaciona con la transformación celular maligna, siendo ausente en todas las muestras sanas, y presente e incrementada en las muestras tumorales tanto primarias como metastásicas. Con excepción del melanoma maligno y el linfoma, todos los tumores metastásicos expresaron Fuc en mediano y alto grado. En general, las muestras de mama fueron positivas a LcH en los tres estadios, con una alta intensidad de

reactividad, aunque la mayor reactividad se observó en zonas del estroma tisular. En las muestras tumorales pulmonares, la reactividad fue mayor en las metástasis que en los tumores primarios. En las muestras de origen renal se observó una intensa reactividad en los tres estadios, aunque fue ligeramente mayor en los tumorales primarios, prevaleciendo en los tres estadios la reactividad en zonas del estroma. De manera excepcional, las muestras de origen cutáneo fueron intensamente positivos en estadios sanos, fundamentalmente en la dermis (estroma), prevaleciendo este patrón de reactividad en los tumorales primarios aunque con menor intensidad de reactividad, y en contraparte los metastásicos no fueron positivos a LcH. En cambio en los tiroideos, la reactividad fue muy baja en estadios sanos, estuvo ausente en tumorales primarios y significativamente incrementada en los metastásicos. En estos últimos en las zonas del estroma. Con relación a la reactividad a LTA, más del 55% de los casos estudiados fueron positivos a esta lectina. Las muestras de mama sanas no fueron positivas y sólo los tumorales tanto primarios como metastásicos mostraron reactividad, siendo los últimos los de mayor intensidad principalmente en estructuras acinares. Los tumorales primarios y metastásicos de origen pulmonar fueron positivos en semejante intensidad y patrón de presentación. En cambio los de origen renal sano no fueron positivos, y los tumorales primarios mostraron menor intensidad de reactividad comparado con los metastásicos. En los últimos a diferencia de los primarios, la reactividad se observó en las estructuras glandulares. La piel sana y la metástasis no mostraron ser positivo a LTA, y los tumorales primarios tuvieron una baja intensidad de reactividad en el estroma. Estos hallazgos confirman en parte la asociación entre la fucosilación con la transformación celular maligna, pero no apoyan la transformación a estadios más desdiferenciados que podrían llevar a la metástasis. Finalmente, las muestras de tiroides sanas no fueron positivas, y aunque los primarios como los metastásicos sí mostraron reactividad, fue en los últimos que se observó la mayor intensidad de reactividad y en forma homogénea.

La O-glicosilación es una modificación co- y pos-traducciona de proteínas que tiene lugar en distintos compartimientos del aparato de Golgi cuando es pos-traduccion³⁸¹. Las GalNAc

transferasas se encuentran en un amplio rango de distribución en tejidos de mamíferos, mientras que otras están más restringidas en su expresión, puede reflejar la compleja arquitectura y función de las estructuras mucínicas³⁸². Nuestros resultados sugieren que las diferencias en los patrones de O-glicosilación relacionados con los carcinomas primarios y las metástasis pueden resultar de una sobre-regulación de GalNAc transferasas específicas, sugiriendo que la evaluación de estas transferasas representa una alternativa al diagnóstico de las metástasis de mama al cerebro. Este tipo de O-glicanos puede ser parte de diversas rutas de expresión de glicanos, cuya expresión podría ser con la finalidad de interactuar con moléculas afines al reconocimiento de carbohidratos, una de las cuales podría ser galectina-3, debido a sus efectos favorables para la expansión tumoral clonal. Por otro lado, la abolición del bloqueo estérico que ejercen otras estructuras glicosídicas como la representada por el ácido siálico podría favorecer las interacciones con otras moléculas solubles o ancladas a otras células o tejidos y de esa forma promover la invasión tumoral y la metástasis (Figura 26).

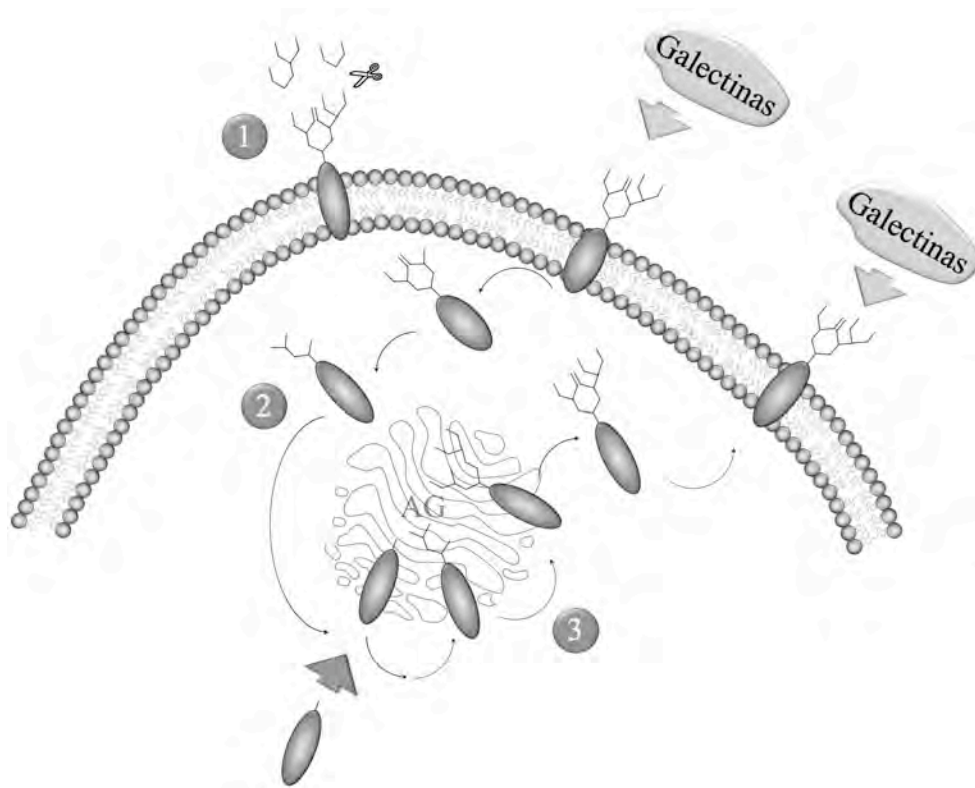


Figura 26. Posibles vías a través de las cuales, observamos la presencia de estructuras O-glicosídicas de tipo mucínico. La hipótesis que proponemos plantea la posibilidad de tres eventos: 1) la activación de sialidasas extracelulares (tijeras) y la hidrólisis de residuos de ácido siálico que exponen galactosas o lactosaminas; 2)

reciclamiento glicopeptídico y modificaciones glicosídicas; 3) activación de una neoglicosíntesis. Uno o más de estos eventos puede estar implicado en la exposición de residuos Gal o Lac que observamos en nuestras muestras en estudio. Esta exposición pudiera ser un intermediario para exponer estos residuos glicosídicos a ligandos específicos como galectina-3. El proceso (paso 2 y 3) tendría lugar en el aparato de Golgi (AG). En el caso de las sialidasas (paso 1), podría tener lugar luego de la activación extracelular de sialidasas (tijeras). Por otro lado, la disminución en la cantidad de residuos de siálico en la superficie celular, evitaría el bloqueo estérico que este tipo de carbohidratos ejerce sobre otros ligandos glicosídicos (paso 4).

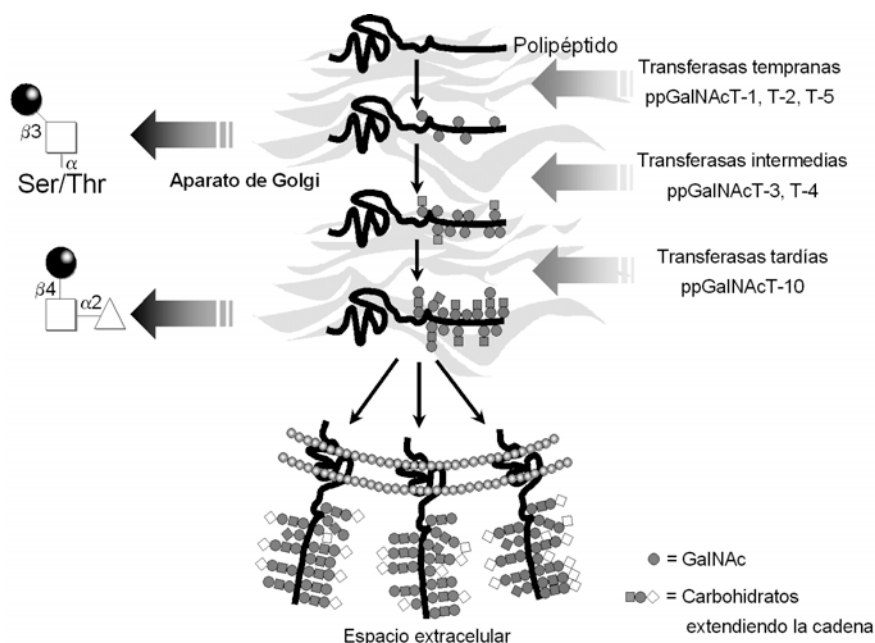
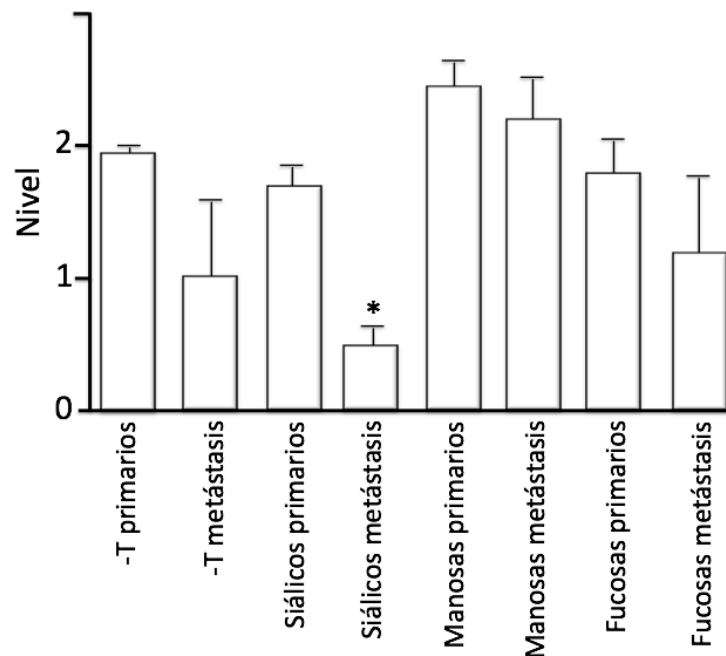


Figura 27. Biosíntesis de estructuras O-glicosídicas de tipo mucínico tempranas y tardías. La sobre-regulación de transferasas tempranas (T1, T2 y T5) lleva a la formación de estructuras simples (v.g. discárido T o el monosacárido Tn) reactivas a las lectinas ALL o PNA. Mientras la formación de estructuras O-glicosídicas complejas requiere de transferasas tardías (T10) que forma estructuras como las que son reactivas a la lectina MeA.

Realizando un análisis estadístico de nuestros resultados, pudimos establecer que en general existe un decremento en los niveles de sialilación en las metástasis comparado con los carcinomas primarios de origen mamario, con una semejanza en el resto de los órganos (Gráfica 1). Este análisis estadístico con la prueba de Mann-Whitney nos permitió establecer que estadísticamente hablando, las metástasis a cerebro tienen menor cantidad de residuos de ácido siálico en general, comparado con otros glicoconjugados, de los que en cuyo caso, predominan las estructuras O-glicosídicas de tipo mucínico simple y complejo con afinidad a lectinas como ALL, PNA, y MeA. Lo interesante es que desde hace mucho tiempo, la hipersialilación y la hiperfucosilación han sido dos eventos íntimamente relacionados con la progresión tumoral maligna, y en nuestro caso, observamos que una vez establecida la metástasis en el cerebro,

esta relación de incremento en la presencia de siálicos no parece cumplir con los intereses para la carcinomatosis, dejando paso a otros tipos de glicosilaciones. Aunque no desaparece la sialilación, estadísticamente observamos un decremento en su frecuencia ($U = 0.0167$) en los carcinomas mamarios con valores semejantes en el resto de los órganos de origen primario (gráficas no mostradas).



Gráfica 1. Prueba estadística de Mann Whitney aplicada a carcinomas canaliculares de mama primarios contra metastásicos en cerebro. Se observa un decremento en la expresión de residuos de ácido siálico estadísticamente significativo en el estadio celular metastásico ($U= 0.0167$).

La presencia de residuos O-glicosídicos de tipo mucínico se reveló más evidente al realizar los tratamientos enzimáticos. La hidrólisis de ácido siálico con sialidasa de *Clostridium perfringes* incrementó la interacción de las lectinas ALL, PNA, y MeA. Este hallazgo sugiere la posible participación de eventos de neoglicosíntesis o incremento en el reciclamiento glicopeptídico que expondría estructuras mucínicas en la superficie celular. Estos resultados sugieren que en las metástasis en cerebro las estructuras O-glicosídicas de tipo mucínico no solamente están presentes y expuestas en la superficie celular tumoral, sino que existe un enriquecimiento adornando a superficie con estas estructuras evidenciado por el incremento en la reactividad a las tres lectinas luego de eliminar el siálico. Los O-glicanos de tipo mucínico en regiones terminales de glicoconjugados han sido pobremente estudiados en estadios

metastásicos. En este trabajo presentamos evidencia de una preferencia hacia la reactividad de este tipo de glicanos en metástasis a cerebro. En cuanto a la reactividad a lectinas afines a siálicos, el tratamiento enzimático reveló un patrón diferencial de reactividad. El ensayo permitió identificar tres tipos de estructuras glicosídicas sialiladas al detener la reacción. A los 45, 60 y 120 minutos obtuvimos el rango de reactividad de residuos de Neu- α -2,3-, Neu- α -2,6-, y Neu-5,7,9-Ac2 respectivamente. La especificidad de la sialidasa fue Neu- α -2,3- > Neu- α -2,6- > Neu-5,7,9-Ac2. Estudios más complejos que impliquen la determinación de la *K_m* y análisis cinéticos revelarán más claros al respecto. Los resultados ofrecen la posibilidad de ampliar las investigaciones en torno al ambiente metastásico con futuras perspectivas en el campo de la terapia anti-cancerosa o de detección temprana.

Los tratamientos de digestión con tripsina permitieron establecer la naturaleza proteica, peptídica o lipídica de los glicoconjugados implicados en el proceso de metástasis y que estaban siendo motivo de estudio. El tratamiento se enfocó en discriminar entre la presencia de estructuras glicopeptídicas *versus* glicolipídicas. Las histoquímicas con lectinas después de los intervalos de tiempo de tratamiento enzimático mostraron que a los 45 minutos la reactividad de residuos Neu- α -2,3- y Neu- α -2,6- fueron el sustrato inicial, por tanto la naturaleza proteica de glicoconjugados portadores de estas estructuras glicosídicas fueron las primeras en sufrir los efectos de la digestión por tripsina. Los glicoconjugados de naturaleza proteica portadores de residuos glicosídicos Neu-5,7,9-Ac2 MRL positivos se digirieron a los 120 minutos. En cuanto a los O-glicanos de tipo mucínico específicos a PNA y MeA, encontramos un tiempo de digestión similar de 120 minutos. ALL que se conoce específica a O-glicopéptidos no mostró reactividad a los 120 minutos, siendo ésta lectina el control de la ausencia de péptidos por digerir. Estos hallazgos son importantes debido a que en el campo de la glicobiología del cáncer y la metástasis, la mayor cantidad de glicoconjugados implicados han sido de tipo glicolipídico. Existe poca información disponible que relacione estructuras glicopeptídicas/ glicoproteicas en el cáncer y la metástasis²¹¹. Una vez concluido el tratamiento enzimático, las estructuras que

permanecieron reactivas luego de 120 minutos (tiempo óptimo en que desapareció la reactividad a ALL) son las glicolípídicas. Estas estructuras reactivas correspondieron a aquellas afines a PNA y MeA, siendo glicolípidos ricos en O-glicanos de tipo mucínico simples o lactosamínicos, y complejos respectivamente. En forma similar, la reactividad a MAA y SNA fueron las primeras en desaparecer luego de 45 minutos de tratamiento. La reactividad a MRL disminuyó después de 90 minutos de tratamiento que luego de 120 fue negativo. En el caso de las lectinas reactivas a O-glicanos de tipo mucínico (PNA, ALL y MeA), observamos una ligera variación de reactividad en función del tiempo a partir de los 60 minutos que permaneció estable hasta los 120 minutos, excepto para ALL que desapareció. De esta forma, evidenciamos la participación principalmente de estructuras glicopeptídicas en las metástasis a cerebro.

Debido a que el órgano estudiado (cerebro) fue el invadido por células tumorales (metástasis), buscamos la expresión de marcadores específicos de este órgano. La búsqueda de la expresión de GFAP se empleó para co-localizar la estructura glial y simultáneamente observar si se activó la glía frente a la invasión tumoral. La activación de astrocitos (gliosis reactiva) se observa en el trauma cerebral, isquemia, enfermedades neurodegenerativas y tumores primarios y secundarios del sistema nervioso central³⁸³. No todos los casos fueron inmunoreactivos a GFAP, y en los que se observó la inmunoreactividad, ésta fue con débil intensidad y en forma de trazas, suponiendo que en algunos casos no se activó la glía frente a la invasión, probablemente debido a la inmunosupresión que ejerce el cáncer o por la velocidad de propagación tumoral, o ambos eventos. En los casos en los que se observan las trazas, y aún en los que no se observan, la respuesta de activación pudo haber sido leve o quedaron residuos de la glía que fue digerida por las células tumorales que ocupan ahora su espacio celular.

La sinaptofisina es una glicoproteína integral de membrana expresada en una variedad de células neuroendocrinas neoplásicas, y sanas, que se emplea como marcador inmunohistoquímico de diferenciación celular neuroendocrino³⁸⁴. La inmunoexpresión de

sinaptofisina fue similar a lo observado con GFAP en forma de trazas, asumiendo que no existe tejido neuronal debido a que fue sustituido por las células tumorales metastásicas.

La NCAM partivpa en interacciones tanto hetero- como homotípicas célula-célula. Se ha visto expresada en condiciones fisiológicas de crecimiento y desarrollo que incluyen direccionalidad y migración de células de crestas neurales, de axones, fijación sináptica, formación de uniones neuromusculares y adhesiones al mioblasto³⁸⁵. En tumores diversos, entre los que destacan: el neuroblastoma, el carcinoma de colon³⁸⁶ y el melanoma modula el crecimiento neurítico y la adhesión de células tumorales a la matriz mediante diversas rutas como la participación por acoplamiento del receptor-4 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR-4, por sus siglas en inglés)³⁸⁷. Algunas proteínas tipo receptor tirosin-fosfatasa como la tirosin-fosfatasa-u (PTP-u, por sus siglas en inglés) median la agregación celular y promueven el crecimiento neurítico al regular la adhesión dependiente de NCAM a través de la modulación de señales que favorecen a las neuronas a responder ante un estímulo³⁸⁸, tal como se ha observado en el cáncer. De las muestras empleadas en este proyecto, mostraron trazas de reactividad a NCAM. Al igual que con los anteriores anticuerpos, no quedan rastros evidentes de esta interacción posiblemente debido a la destrucción tan amplia que tiene el cerebro. Por otro lado, se ha reportado que la pérdida de la expresión de NCAM induce la metástasis al sobre-regular la linfangiogénesis³⁸⁹. Es probable que la poca inmunoreactividad que observamos en nuestras muestras, obedezca a este tipo de eventos facilitadores de la metástasis.

Finalmente, la inmunoreactividad a PSA-NCAM fue observada en la mayoría de las metástasis a cerebro. PSA-NCAM ha sido asociada con diversos tipos de tumores, en los que desempeña funciones de desadhesión celular³⁹⁰. Además, la cantidad de inmunoexpresión de PSA se correlaciona de manera directa con el grado de malignidad en astrocitomas, confiriéndoles un potencial más agresivo³⁹¹. En otros tipos de cánceres como el glioblastoma, la presencia de PSA se convierte en un factor de pronóstico adverso³⁹², facilitando la invasión tumoral, característica de este tipo de tumores cerebrales³⁹³; algo similar se ha observado en

tumores de la pituitaria, en los que la presencia de PSA les confiere mayor grado de malignidad y rango de crecimiento tumoral³⁹⁴. En este sentido, la inducción de la expresión de PSA-NCAM por el oncogén K-Ras reduce la adhesión mediada por E-cadherina y facilita la diseminación metastásica en cáncer pancreático³⁹⁵. Es probable que la expresión que observamos en nuestras muestras se hubieran visto favorecidas para la metástasis exitosa a través de un mecanismo semejante al descrito en páncreas. Más aún, se ha descrito que la expresión de PSA se correlaciona con la progresión tumoral tanto en cáncer de células no pequeñas de pulmón³⁹⁶ como en los de células pequeñas³⁹⁷. En nuestras muestras, encontramos la presencia de PSA-NCAM en los adenocarcinomas pulmonares, y podría ser un marcador de progresión tumoral, al igual que lo antes descrito. Incluso, en modelos experimentales más avanzados podría explorarse la posibilidad de emplear este marcador de pronóstico, de manera similar a lo que se ha descrito en el cáncer de pulmón³⁹⁸, pudiendo incluso distinguir entre formas carcinoides de los carcinomas a través de la cuantificación de PSA³⁹⁹. NCAM es el principal acarreador de ácido polisialílico⁴⁰⁰, y es capaz de acoplarse al ácido siálico en uniones repetitivas alfa-2,8 formando una larga cadena de estos residuos que conforman el ácido polisialílico^{401,402}. La carga negativa de esta larga cadena de PSA unida a NCAM, además de conferir las propiedades anti-adhesivas, incrementa la repulsión intermembranal⁴⁰³ y promueve diversos eventos del desarrollo celular como el crecimiento axonal⁴⁰⁴, la fasciculación⁴⁰⁵ y migración celular^{406,407}. La presencia de esta inusual estructura de ácido siálico es tan importante en el neurodesarrollo, que la ablación genética lleva a la formación de severos defectos⁴⁰⁸. Otra importante función de PSA-NCAM se efectúa en los tumores y la malignidad celular. Los tumores malignos de origen neuroectodérmico expresan la forma polisialilada de NCAM en altas concentraciones, confiriéndole además del fenotipo metastásico, el maligno e invasivo, y dirigiendo el crecimiento tumoral al controlar las interacciones heterotípicas⁴⁰⁹. La inmunoreactividad a PSA-NCAM es particularmente alta en estadios embrionarios de desarrollo cerebral⁴¹⁰. En enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, adicionalmente a la muerte celular, han sido descritos

cambios en los niveles de presentación de proteínas relacionadas con la plasticidad o regeneración neuronal como la PSA-NCAM⁴¹¹. La participación de la PSA-NCAM en la remodelación estructural y plasticidad inducida por lesiones del sistema nervioso central^{412,413}, siendo capaz de reducir el daño neuropático⁴¹⁴. Su función en los procesos de plasticidad es tan importante, que ha sido propuesto emplear la inducción de PSA para promover efectos de reparación del sistema nervioso⁴¹⁵. En esta ocasión y a diferencia de los anteriores marcadores, se encontró reactividad del anticuerpo anti-PSA-NCAM en la mayoría de las muestras. Sólo la metástasis de carcinoma papilar y los linfomas no Hodgkin fueron negativos al anticuerpo. Es muy probable que esta forma de cadherina medie las funciones de proliferación celular como en la neurita, favoreciendo a las células cancerosas para invadir el cerebro. Por otro lado, las propiedades inductoras de la plasticidad que ejerce el PSA, podría favorecer a la masa tumoral en expansión para invadir, proliferar y finalmente metastatizar. Por otro lado, resulta interesante que observamos un patrón diferencial de inmunoreactividad al anticuerpo anti-PSA-NCAM en las estructuras metastásicas cerebrales. Este hallazgo ofrece el potencial de desarrollar herramientas que sean capaces de identificar aquellas masas tumorales con potencial metastásico.

Es necesario ampliar las investigaciones para definir las estructuras glicosídicas reportadas en esta tesis. Como receptores que son, es importante definir a qué ligandos se están exponiendo para interactuar y favorecer la evasión del reconocimiento inmunológico, la resistencia a la apoptosis, la migración e implantación exitosa a distancia. Ya que sugerimos la sobre-expresión de enzimas de la maquinaria de glicosilación, es importante profundizar esta hipótesis buscando la expresión de genes específicos que codifiquen a este grupo de enzimas, tanto glicosiltransferasas como sialidasas que podrían exponer tipos específicos de glicanos. Simultáneamente, la probable sobre-regulación en la transcripción de genes para proteínas anti-apoptóticas y de supervivencia celular podrían ser la respuesta de una parte del complejo

mecanismo a través del cuál las células metastásicas logran la colonización e implantación a distancia.

CAPÍTULO 13

Conclusiones

Existen cambios en los glicoconjugados presentes en células transformadas a la malignidad y su posible implicación en la metástasis tomando como modelo la metástasis al cerebro. Durante mucho tiempo se ha asociado al incremento en la expresión de residuos de ácido siálico y fucosa como determinantes de malignidad celular. En este trabajo, encontramos que en la metástasis tiene lugar la participación de otras estructuras además del ácido siálico, como los antígenos glicosídicos de tipo O- principalmente unidos a proteínas, con residuos Gal o Lac en posición terminal. La pérdida de residuos de ácido siálico podría favorecer interacciones proteína-carbohidrato al eliminar el bloqueo estérico que ejerce este carbohidrato. Hay un incremento en residuos O-glicosídicos de tipo mucínico simple (estructuras relacionadas con antígenos *Tn* y *T*) o complejo. Estas estructuras podrían tener interacción con moléculas que reconocen carbohidratos, como galectina-3, y favorecer la invasión tumoral y la metástasis. En torno al ácido siálico, una de las formas importantes presentes en la metástasis fue el inusual ácido polisiálico. De manera interesante, el PSA podría estar desempeñando funciones clave en la transformación celular maligna, que podría proveer de potenciales invasivos y metastásicos. La inmunoreactividad a PSA-NCAM, sugiere que las células cancerosas podrían aprovechar las propiedades tróficas de esta forma de cadherina, que en circunstancias fisiológicas actúa en la neurogénesis y la plasticidad enlongando neuritas, favoreciendo la proliferación e invasión celular tumoral en el cerebro. Además, dado el patrón diferencial de inmunoreactividad al PSA-NCAM en las metástasis, esto podría emplearse como un potencial marcador de identificación de masas tumorales con potencial metastásico. Existe poca información respecto a la expresión de ácido polisiálico en cáncer de mama y O-acetilaciones del ácido siálico. Nuestro trabajo representa el inicio de una serie de significativos y potenciales estudios en este campo.

Los datos presentados hasta este momento, sugieren que la presencia de carbohidratos en las células tumorales, podrían desempeñar una serie de funciones que garantizan la

expansión tumoral, tales como la pérdida del reconocimiento inmunológico, la estimulación de la expresión de factores tróficos, la pérdida de la adhesión celular y el escape de la muerte celular.

Cuando ha metastatizado la masa tumoral, esta presencia tendería a disminuir probablemente debido a que ya no es necesario tener tan amplio rango de interacciones, y sólo es necesario expresar aquellos carbohidratos que aseguren la implantación secundaria y expansión celular. Será necesario estudiar este hecho a fin de esclarecer el rol de esta expresión preferente de estructuras glicosídicas que observamos.

Una gran cantidad de información ha demostrado la participación de glicolípidos o gangliósidos en la carcinogénesis y la metástasis al cerebro. Nuestros ensayos enzimáticos mostraron que la mayor cantidad de estructuras glicosídicas que participan en los eventos metastásicos, podrían corresponder a glicoproteínas. Será necesario realizar estudios mas precisos que esclarezcan qué tipo de proteínas son las que contienen las estructuras glicosídicas que observamos.

CAPÍTULO 14

Perspectivas

A la luz de los resultados encontrados, es necesario profundizar los ensayos experimentales con la finalidad de caracterizar el receptor específico para la galectina-3 que encontramos interaccionando con los O-glicanos de tipo mucínico.

Por otro lado, una vez que hemos demostrado la preferente presencia de estructuras O-glicosídico de tipo mucínico simple, reactivas a ALL y PNA; o complejas, reactivas a MeA, es importante identificar las transferasas específicas implicadas en esta expresión, dado que este grupo de enzimas son específicas para el tejido, la célula y el estímulo que las induce. Simultáneamente, es importante establecer las funciones de los carbohidratos presentes en las masas tumorales, a fin de esclarecer las interacciones y por consiguiente, los eventos a nivel celular que desempeñan o sobre los que tienen influencia. Identificamos los receptores glicosídicos implicados en los procesos de malignidad celular, ahora es importante establecer los ligandos con los que interaccionan estos receptores, a fin de ofrecer estrategias de prevención, diagnóstico oportuno o terapéutica frente a la neoplasia.

Finalmente, queda la posibilidad de ampliar las investigaciones en torno a los eventos moleculares y celulares implicados en el complejo mecanismo de expresión de carbohidratos, tales como las interacciones carbohidrato-carbohidrato, carbohidrato-proteína, entre célula-célula y célula-matriz extracelular para la migración celular, escape del reconocimiento inmunológico, supervivencia e implantación a distancia en sitios secundarios (metástasis). Demostrar la vía por la que los carbohidratos que encontramos en estas muestras son biosintetizados será una tarea extensa que llevará a buscar rutas de neoglicosíntesis, secreción habitual o alterna, o reciclamiento glicosídico.

Bibliografía

- ¹ Cancer facts and figures 2012. American Cancer Society. Atlanta, 2012
- ² Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29
- ³ Principales causas de mortalidad en mujeres. 2005 Nacional. INEGI/Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. CONAPO, Proyecciones de la Población 2000-2050.
<http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>
- ⁴ Serie de Estadísticas Vitales 2006, Edición 2007. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI).
- ⁵ Torres S, Gutiérrez J, Morales JA. Cáncer en México: correlación entre los factores socioeconómicos y la alimentación. *Med Int Mex* 2006; 22:36-43
- ⁶ Chang HJ, Kim SW, Lee BL, Hong EK, Kim WH. Phenotypic alterations of mucins and cytokeratins during gallbladder carcinogenesis. *Pathol Int* 2004; 54: 576-584.
- ⁷ Brunotto M, Malberti A, Zárate AM, Barra JL, Calderón O, Piñas E, Plavnik L, Crosa M. Early phenotypic and genotypic alterations in submandibular gland oncogenesis in rats. *Acta Odont Lat* 2006; 19: 13-21.
- ⁸ Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Transac* 2003; 31: 1441-1444.
- ⁹ Ushijima T, Watanabe N, Shimizu K, Miyamoto K, Sugimura T, Kaneda A. Decreased fidelity in replicating CpG methylation patterns in cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 11-17.
- ¹⁰ Rizzino A. Understanding the roles of growth factors in carcinogenesis: modulations of autocrine growth control by differentiation. *Int J Dev Biol* 1993; 37: 61-65.
- ¹¹ Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumor progression. *Nature Rev Cancer* 2009; 9: 108-122.
- ¹² Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Rev Cancer* 2001; 1: 222-231.
- ¹³ Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 227-288.
- ¹⁴ Oliveira-Filho RS, Bevilacqua RG, Chammas R. Hyperthermia increases the metastatic potential of murine melanoma. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 941-945.
- ¹⁵ Dall'Olio F. Protein glycosylation in cancer biology: an overview. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1996; 49: M126-M135.
- ¹⁶ Ruddon RH. Biochemistry of Cancer. *J Mol Biol* 1994; 7: 108-120.
- ¹⁷ Loberg RD, Bradley DA, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Pienta KJ. The lethal phenotype of cancer: The molecular basis of death due to malignancy. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 225-241.
- ¹⁸ Gershenwald JE, Fidler IJ. Targeting lymphatic metastasis. *Science* 2002; 296: 1811-1812.
- ¹⁹ Weiss L. Patterns of metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 281-301.
- ²⁰ Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diverse and escape mechanisms. *Nature Rev Cancer* 2003; 3: 362-374.
- ²¹ Hoshida T, Isaka N, Hagendoorn J, di Tomaso E, Chen Y-L, Pytowski B, Fukurama D, Padera TP, Jain RK. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis

-
- by increases delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications. *Cancer Res* 2006; 66: 8065-8075.
- ²² Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ, Nadkarni KV, MacDonald IC, Groom AC. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am* 2001; 10: 243-255.
- ²³ Weiss L, Orr FW, Honn KV. Interactions between cancer cells and the microvasculature: a rate-regulator for metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1989; 7: 127-167.
- ²⁴ Friedl P, Hegerfeldt Y, Tusch M. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 441-449.
- ²⁵ Djalilian HR, Muhammet T, Hall WA, Adams GL. Metastatic head and neck squamous cell carcinoma to the brain. *Auris Nasus Larynx* 2002; 29: 47-54.
- ²⁶ Vardaxis NJ. General Pathology. En: WB Saunders, editors. *Pathology of the health sciences*. Harcourt Publishers Ltd, 2000: 12-22.
- ²⁷ Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Rev Cancer* 2003, 3: 1-5.
- ²⁸ Muramatsu T. Carbohydrate signals in metastasis and prognosis of human carcinomas. *Glycobiology* 1993; 3: 291-296.
- ²⁹ Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J, Dong Y, Kao G, Al-Mehdi AB, Bernhard EJ, Muschel RJ. Apoptosis: An early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2001; 61: 333-338.
- ³⁰ Chen Z, Fadiel A, Naftolin F, Eichenbaum KD, Xia Y. Circulation DNA: Biological implications for metastasis and immunology. *Med Hypotheses* 2005; 65: 956-961.
- ³¹ Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889; 133 (3421): 571-573.
- ³² Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination. *Clin Exp Med* 2006; 6: 145-149.
- ³³ Sugarbaker EV. Patterns of metastasis in human malignancies. *Cancer Biol Rev* 1981; 2: 235-278.
- ³⁴ Ewing J. Metastasis. En: *Neoplastic Diseases: A treatise on tumors*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1928: 1160
- ³⁵ Coman DR. Mechanism responsible for the origin and distribution of blood-bone tumor metastases: a review. *Cancer Res* 1953; 13: 397-404.
- ³⁶ Weiss L. Mechanisms of metastatic patterns. En: *Principles of Metastasis*. Orlando: Academic Press, 1985: 382
- ³⁷ Khosla A. Brain metastases. eMedicine. <http://emedicine.medscape.com/article/338239-overview>, última actualización: 2008.
- ³⁸ Bart J, Groen HJM, Hendrikse NH, van der Graaf WTA, Waalburg W, Vries EGE. The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treat Rev* 2000; 26: 449-462.
- ³⁹ Vries HE, Kuiper J, De Boer AG, Van Berkel TJC, Breimer DD. The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammatory Diseases. *Pharmac Rev* 1997; 49: 143-155.
- ⁴⁰ Gold R, Archelos JL, Hartung HP. Mechanisms of Immune Regulation in the Peripheral Nervous System. *Brain Pathol* 1999; 9: 343-360.

-
- ⁴¹ Acheson A, Sunshine J, Rutishauser U. NCAM Polysialic Acid Can Regulate both Cell-Cell and Cell-Substrate Interactions. *J Cell Biol*, 1991; 114: 143-153.
- ⁴² Gorelik E, Galili U, Raz A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2001; 20: 245-277
- ⁴³ Hakomori S. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol* 2001; 491: 369-402.
- ⁴⁴ Dwek RA. Glycobiology: More functions for oligosaccharides. *Science* 1995; 269: 1234-1235.
- ⁴⁵ Dove A. The bittersweet promise of glycobiology. *Nature Biotech* 2001; 19: 913-917.
- ⁴⁶ Wormald MR, Dwek RA. Glycoproteins: glycan presentation and protein-folding stability. *Structure* 1999; 7: R155-R160.
- ⁴⁷ Drickamer K, Taylor ME. Evolving views of protein glycosylation. *TIBS* 1998; 23: 321-324.
- ⁴⁸ Coutinho PM, Henrissat B. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En HJ Gilbert, G Davies, B Henrissat and B Svensson, editores. "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1999: 3-12.
- ⁴⁹ Dwek RA, Butters TD. Introduction: Glycobiology—Understanding the language and meaning of carbohydrates. *Chem Rev* 2002; 102: 283-284.
- ⁵⁰ Dwek RA. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem Rev* 1996; 96: 683-720.
- ⁵¹ Schmidt MA, Riley LW, Benz I. Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 2003; 11: 554-561.
- ⁵² Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA. Glycobiology. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 785-838.
- ⁵³ Rini J, Drickamer K. Carbohydrates and glycoconjugates. *Current Opin Struct Biol* 1997; 7: 615-616.
- ⁵⁴ Imberty A, Drickamer K. Carbohydrates and glycoconjugates. *Current Opin Struct Biol* 1999; 9: 547-548.
- ⁵⁵ Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Protein glycosylation in development and disease. *BioEssays* 1999; 21: 412-421.
- ⁵⁶ Moss GP. Nomenclature of carbohydrates. International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/2carb>. Última actualización: 2007.
- ⁵⁷ Hughes RC. So what do your sugars do?. *Glycoconjugate J* 2000; 17: 567-575.
- ⁵⁸ Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993; 3: 97-130.
- ⁵⁹ Zopf D, Vergis G. Glycosylation: a critical issue in protein development and manufacturing. *Pharmaceutical Visions* 2005; 1: 10-14
- ⁶⁰ Takasaki S, Yamashita K, Kobata A. The sugar Chain structures of ABO blood group active glycoproteins obtained from human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1978; 253: 6086-6091.
- ⁶¹ Sharon N, Lis H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am* 1993; 268: 82-89.
- ⁶² Hakomori S. Carbohydrate-carbohydrate interactions as an initial step in cell recognition. *Pure Appl Chem* 1991; 63: 473-482.
- ⁶³ Varki A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J* 1997; 11: 248-255.

-
- ⁶⁴ Bleil JD, Wassarman PM. Galactose at the nonreducing of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6778-6782.
- ⁶⁵ Bayna EM, Runyan RB, Scully NF, Reichner J, Lopez LC, Schur BD. Cell surface galactosyltransferase as a recognition molecule during development. *Mol Cell Biochem* 1986; 72: 141-151.
- ⁶⁶ Keilhauer G, Faissner A, Schachner M. Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and NCAM antibodies. *Nature* 1985; 316: 728-730.
- ⁶⁷ Ratner N, Elbein A, Bung MB, Porter S, Bunge RP, Glaser L. Specific asparagine-linked oligosaccharides are not required for certain neuron-neuron and neuron-Schwan cell interactions. *J Cell Biol* 1986; 103: 159-170.
- ⁶⁸ Sabesan S, Duus J, Neira S, Domaille P, Kelm S, Paulson JC, Bock K. Cluster sialoside inhibitors for influenza virus: synthesis, NMR, and biological studies. *J Am Chem Soc* 1992; 114: 8363-8375.
- ⁶⁹ Sauter NK, Hanson JE, Glick GD, Brown JH, Crowther RL, Park S, Skehel JJ, Wiley DC. Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography. *Biochemistry* 1992; 31: 9609-9621.
- ⁷⁰ Aristoteli LP, Wiollcox MDP. The adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to high molecular weight tear film species correspond to glycoproteins reactive with *Sambucus nigra* lectin. *Exper Eye Res* 2006; 86: 1146-1153.
- ⁷¹ Hooper LV, Gordon JI. Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology* 2001; 11: 1R-10R.
- ⁷² Vimr E, Lichtensteiger C. To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends Microbiol* 2002; 10: 254-257.
- ⁷³ Medvedova L, Farkas R. Hormonal control of protein glycosylation: role of steroids and related lipophilic ligands. *Endocrine Regul* 2004; 39: 65-79.
- ⁷⁴ Potter BA, Hughey RP, Weisz OA. Role of N- and O-glycans in polarized biosynthetic sorting. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C1-C10.
- ⁷⁵ Fukuda M. Cell surface glycoconjugates as onco-differentiation markers in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Acta* 1985; 780: 119-150.
- ⁷⁶ Kobata A. Structural changes induced in the sugar chains of glycoproteins by malignant transformation of producing cells and their clinical application. *Biochimie* 1988; 70: 1575-1585.
- ⁷⁷ Hébert E, Monsigny M. Oncogenes and expression of endogenous lectins and glycoconjugates. *Biol Cell* 1993; 79: 97-109.
- ⁷⁸ Seyrek K. The third alphabet of life: carbohydrate-protein interactions. *Turk J Vet Anim Sci* 2004; 28: 787-792.
- ⁷⁹ Axford J. Glycobiology and medicine: an introduction. *J R Soc Med* 1997; 90: 260-264.
- ⁸⁰ Moody AM, Chui D, Reche PA, Priatel JJ, Marth JD, Reinherz EL. Developmentally regulated glycosylation of the CD8 α coreceptor stalk modulates ligand binding. *Cell* 2001; 107: 501-512.
- ⁸¹ Ohtsubo K, Takamatsu S, Minowa MT, Yoshida A, Takeuchi M, Marth JD. Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell* 2005; 123: 1307-1321.

-
- ⁸² Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, Nabi IR, Wrana JL, Dennis JW. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 2004; 306: 120-124.
- ⁸³ Weber PC, Ohlendorf DH, Wendoloski JJ, Salemme FR. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* 1989; 243: 85-88.
- ⁸⁴ Rudd PM, Elliot T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA. Roles for glycosylation in the immune system. *Science* 2001; 291: 2370-2376.
- ⁸⁵ Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 526-542.
- ⁸⁶ Power PM and Jennings MP. The genetics of glycosylation in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Let* 2003; 218: 211-222.
- ⁸⁷ Szymanski CM and Wren BW. Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 225-236.
- ⁸⁸ Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 2002; 12: 43R-56R.
- ⁸⁹ Butters TD. Control in the N-linked glycoprotein biosynthesis pathway. *Chem Biol* 2002; 9: 1266-1268.
- ⁹⁰ Petrescu AJ, Milac AL, Petrescu SM, Dwek RA, Wormald MR. Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology* 2004; 14: 103-114.
- ⁹¹ Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Bioch Mol Biol*, 1998; 33: 151-208.
- ⁹² Hart GW, Haltiwanger RS, Holt GD, Kelly WG. Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Ann Rev Biochem* 1989; 58: 841-874.
- ⁹³ Haynes PA. Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation?. *Glycobiology* 1998; 8: 1-5.
- ⁹⁴ Hart GW. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 315-335.
- ⁹⁵ Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. Exploring the O-GlcNAc proteome: Direct identification of O-GlcNAc-modified proteins from the brain. *PNAS* 2004; 101: 13132-13137.
- ⁹⁶ Michaelsson E, Malmstrom V, Reis S, Engstrom A, Buskhardt H, Holmdahl R. T cell recognition of carbohydrates on type II collagen. *J Exp Med* 1994; 180: 745-749.
- ⁹⁷ Iwanaga S, Nishimura H, Kawabata S, Kisiel W, Hase S, Ikenaka T. A new trisaccharide sugar chain linked to a serine residue in the first EGF-like domain of clotting factors VII and IX and protein Z. *Adv Exp Med Biol* 1990; 281: 121-131.
- ⁹⁸ Herscovics A, Orlean P. Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J* 1993; 7: 540-550.
- ⁹⁹ Krusius T, Finne J, Margolis RK, Margolis RU. Identification of an O-glycosidic mannose-linked sialylated tetrasaccharide and keratan sulfate oligosaccharides in the chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J Biol Chem* 1986; 261: 8237-8242.
- ¹⁰⁰ Margolis RK, Margolis RU. Nervous tissue proteoglycans. *Experientia* 1993; 49: 429-446.

-
- ¹⁰¹ Chiba A, Matsumura K, Yamada H, Inazu T, Shimizu T, Kusunoki S, Kanazawa I, Kobata A, Endo T. Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin. *J Biol Chem* 1997; 272: 2156-2162.
- ¹⁰² Moloney DJ, Lin AI, Haltiwanger RS. The O-linked Fucose glycosylation pathway. *J Biol Chem* 1997; 272: 19046-19050.
- ¹⁰³ Harris RJ, Spellman MW. O-linked fucose and other posttranslational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology* 1993; 3: 219-224.
- ¹⁰⁴ Mamoru M. Recent Trends in glycopeptide synthesis. *Trends Glycosci Glycotech* 2001; 13: 11-30.
- ¹⁰⁵ Klieliszewski MJ, O'Neill M, Leykam J, Orlando R. Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from hydroxyproline-rich plant cell wall glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline O-Arabinosylation. *J Biol Chem* 1995; 270: 2541-2549.
- ¹⁰⁶ Hofsteenge J, Mueller DR, de Beer T, Loeffler A, Richter WJ, Vliegthart JFG. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochem* 1994; 33: 13524-13530.
- ¹⁰⁷ Furmanek A, Hofsteenge J. Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Bioch Pol*, 2000. 47: 781-789.
- ¹⁰⁸ Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351.
- ¹⁰⁹ Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
- ¹¹⁰ Varki A, Marth J. Oligosaccharides in vertebrate development. *Semin Dev Biol* 1995; 6: 127-138.
- ¹¹¹ Elbein AD. Glycosidase inhibitors as antiviral and/or antitumor agents. *Semin Cell Biol* 1991; 2: 309-317.
- ¹¹² Sinnott ML. Catalytic mechanism of enzymatic glycosyl transfer. *Chem Rev* 1990; 90: 1171-1202.
- ¹¹³ Schachter H. Glycoproteins: their structure, biosynthesis and possible clinical applications. *Clin Biochem* 1984; 17: 3-14.
- ¹¹⁴ Schachter H. Branching of N- and O-glycans: biosynthetic controls and functions. *Trends Glycosci Glycotech* 1992; 4: 241-250.
- ¹¹⁵ Lowe JB. Molecular cloning, expression and uses of mammalian glycosyltransferases. *Semin Cell Biol* 1991; 2: 289-307.
- ¹¹⁶ Schachter H. Enzymes associated with glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 1991; 1: 755-765.
- ¹¹⁷ Paulson JC, Colley KJ. Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* 1989; 264: 17615-17618.
- ¹¹⁸ Maddry JA, Suling WJ, Reynolds RC. Glycosyltransferases as targets for inhibition of cell wall synthesis in *M. tuberculosis* and *M. avium*. *Res Microbiol* 1996; 147: 106-112.
- ¹¹⁹ Unligil UM, Rini JM. Glycosyltransferase structure and mechanism. *Current Opin Struct Biol* 2000; 10: 510-517.

-
- ¹²⁰ Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J, Editores. *Essentials of Glycobiology*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, La Jolla 1999.
- ¹²¹ Sharon N, Lis H. Lectins as cell recognition molecules. *Science* 1989; 246: 227-234.
- ¹²² Laine RA. Invited commentary: A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: the isomer barrier to development of single method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology* 1994; 4: 759-767.
- ¹²³ Blix G, Lindberg E, Odin L, Werner I. Sialic acids. *Nature* 1955, 175 (4451): 340-341.
- ¹²⁴ Blix G, Gottschalk A, Klenk E. Proposed nomenclature in the field of sialic acids. *Nature* 1957, 175: 340-341
- ¹²⁵ Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. Historical Background and Overview. En: *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999: 1-16.
- ¹²⁶ Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* 2002, 102: 439-469.
- ¹²⁷ Schauer R. Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J* 2000, 17: 485-499.
- ¹²⁸ Crook MA, Couchman S, Tutt P. Plasma fibrinogen and its relationship to plasma sialic acid in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996, 7: 586-589.
- ¹²⁹ Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Current Opin Struc Biol* 2009; 19: 1-8.
- ¹³⁰ Yogeewaran G. Cell surface glycolipids and glycoproteins in malignant transformation. *Adv Cancer Res* 1983, 38: 289-350.
- ¹³¹ Yogeewaran G, Salk PL. Metastatic potential is positively correlated with cell surfacesialylation of cultured murine tumor cell lines. *Science* 1981, 212: 1514-1516.
- ¹³² Black PH. Shedding from the cell surface of normal and cancer cells. *Adv Cancer Res* 1980, 32: 75-199.
- ¹³³ Lee M, Lee H-J, Bae S, Lee Y-S. Protein Sialylation by Sialyltransferase Involves Radiation Resistance. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 1316-1325.
- ¹³⁴ Sharon N. Lectins: From obscurity into the limelight. *Prot Sci* 1998; 7: 2042-2048.
- ¹³⁵ Hirabayashi J. Introduction to "Lectin". www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEA00E.html. última actualización: 2007
- ¹³⁶ Hamelryck TW, Dao-Thi M, Poortmans F, Chrispeels MJ, Wynst L, Lorist R. The Crystallographic Structure of Phytohemagglutinin-L. *J Biol Chem* 1996; 271: 20479-20485.
- ¹³⁷ Olsnes S. The history of Ricin, abrin and related toxins". *Toxicon* 2004; 44: 361-370.
- ¹³⁸ Olsnes S, Pihl A. Ricin – A potent inhibitor of protein synthesis. *FEBS Letters* 1972; 20: 327-329.
- ¹³⁹ Boyd WC, Shapleigh E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* 1954; 119: 419.
- ¹⁴⁰ D'Adamo P. Lectins and mitogens. *Townsend Let Doct* 1990; 1: 16-32.
- ¹⁴¹ Sumner JB, Howell SF. The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with Concanavalin A. *Am J Bacteriol* 1936; 32: 227-237.
- ¹⁴² Rosen SD. Cell surface lectins in the immune system. *Semin Immunol* 1993; 5: 237-247.

-
- ¹⁴³ Goldstein IJ, Poretz RD. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. En: *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine* (Liener, I.E., Sharon, N, Goldstein, I.J., eds) Academic Press, Orlando, USA. 1986; 233 - 247.
- ¹⁴⁴ Sung LA, Kabat EA, Chien S. Interaction of lectins with membrane receptors on erythrocyte surfaces. *J Cell Biol* 1985; 101: 646-651.
- ¹⁴⁵ Banerjee S, Dungdung SR, Das K, Majumder GC. Synchronous modulation of cell surface lectin and its receptor in a homologous cell population: A novel mechanism of cellular regulation. *Exp Cell Res* 2006; 312: 2299-2308.
- ¹⁴⁶ Vijayan M, Chandra N. Lectins. *Current Opin Struct Biol* 1999; 9: 707-714.
- ¹⁴⁷ Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L. Legume lectin structure. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1383: 9-36.
- ¹⁴⁸ Sharon N, Lis H. Lectins cell agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* 1972; 177: 949–958.
- ¹⁴⁹ Drickamer K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 1988; 263: 9557-9560.
- ¹⁵⁰ Weis WI, Drickamer K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 441-473.
- ¹⁵¹ Elgavish S, Shaanan B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *TIBS* 1997; 22: 462-467.
- ¹⁵² Cunningham BA. Lectins: A chemical approach to the cell surface. *Pure Appl Chem* 1975; 41: 31-46.
- ¹⁵³ Lis H, Sharon N. Lectins as molecules and as tools. *Annu Rev Biochem* 1986; 55: 35-67.
- ¹⁵⁴ Alvarez G, Lascurain R, Hernández-Cruz P, Yeyaert D, Degand P, Gorocica P, Espinosa B, Zenteno E, Chávez R. Differential O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 1235-1240.
- ¹⁵⁵ Hernández P, Martín O, Rodríguez Y, Ganem FA. Aplicaciones de las lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1999; 15: 91-95.
- ¹⁵⁶ Borges LF, Sidman RL. Axonal transport of lectins in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 1982; 2: 647-653.
- ¹⁵⁷ Simpson DL, Thorne DR, Loh HH. Developmentally regulated lectin in neonatal rat brain. *Nature* 1997; 266: 367-369.
- ¹⁵⁸ Gabius H-J. Eukaryotic glycosylation and lectins: Hardware of the sugar code (Glycocode) in biological information transfer. 2001, www.lectins.de/lectins_engl. última actualización: 2007
- ¹⁵⁹ Ambrosi M, Cameron NR, Davis BG. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycocode. *Org Biomol Chem* 2005; 3: 1593-1608.
- ¹⁶⁰ Gabius H-J, André S, Kaltner H, Siebert H-C. The sugar code: functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 165-177.
- ¹⁶¹ Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem* 2007; 282: 2753-2764.
- ¹⁶² Sherwani AF, Mohmood S, Khan F, Khan RH, Azfer MA. Characterization of lectins and their specificity in carcinomas – an appraisal. *Indian J Clin Biochem* 2003; 18: 169-180.

-
- ¹⁶³ Sanchez J-F, Lescar J, Chazalet V, Audfray A, Gagnon J, Alvarez R, Breton C, Imberty A, Mitchell EP. Biochemical and structural analysis of *Helix pomatia* agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. *J Biol Chem* 2006; 281: 20171-20180.
- ¹⁶⁴ Schumacher U, Adam E, Brooks SA, Leatham AJ. Lectin-binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular reference to *Helix pomatia* agglutinin. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 275-281.
- ¹⁶⁵ García P, Vataru C, de Souza W, Morgado-Díaz JA. Differential expression of sialic acid and N-Acetylgalactosamine residues on the cell surface of intestinal epithelial cells according to normal or metastatic potential. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 629-640.
- ¹⁶⁶ Opdenakker G, Rudd PM, Ponting CP, Dwek RA. Concepts and principles of glycobiology. *Faseb J* 1993; 7: 1330-1337.
- ¹⁶⁷ Hakomori S. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: Overview and perspectives. *Cancer Res* 1985; 45: 2405-2414.
- ¹⁶⁸ Hakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res* 1996; 56: 5309-5318.
- ¹⁶⁹ Fukuda M. Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res* 1996; 56: 2237-2244.
- ¹⁷⁰ Hakomori S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated antigens. *Adv Cancer Res* 1989; 52: 257-331.
- ¹⁷¹ Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *PNAS* 2002; 99: 10231-10233.
- ¹⁷² Ono M, Hakomori S. Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. *Glycoconjugate J* 2004; 20: 71-78.
- ¹⁷³ Couldrey C, Green JE. Metastases: the glycan connection. *Breast Cancer Res* 2000; 2: 321-323.
- ¹⁷⁴ Mackiewicz A, Mackiewicz K. Glycoforms of serum alpha 1-acid glycoprotein as markers of inflammation and cancer. *Glycoconj J* 1995; 12: 241-247.
- ¹⁷⁵ Sell S. Cancer-associated carbohydrates identified by monoclonal antibodies. *Hum Pathol* 1990; 21: 1003-1019.
- ¹⁷⁶ Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473: 67-95.
- ¹⁷⁷ Zeng G, Li DD, Birkle S, Bieberich E, Tokuda A, Yu RK. Alteration of ganglioside composition by stable transfection with antisense vectors against GD3-synthase gene expression. *Biochemistry* 1999; 38: 8762-8769.
- ¹⁷⁸ Hood JD, Cheresh DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 91-100.
- ¹⁷⁹ Koochekpour S, Merzak A, Pilkington GJ. Vascular endothelial growth factor production is stimulated by gangliosides and TGF-beta isoforms in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett* 1996; 102: 209-215.
- ¹⁸⁰ Melnyk O, Shuman MA, Kim KJ. Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effects on primary tumor growth. *Cancer Res* 1996; 56: 921-924.
- ¹⁸¹ Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocrine Rev* 2004; 25: 581-611.

-
- ¹⁸² Dennis JW. N-linked oligosaccharide processing and tumor cell biology. *Semin Cancer Biol* 1991; 2: 411-420.
- ¹⁸³ Pierce M, Arango J. Rous sarcoma virus-transformed baby hamster kidney cells express higher levels of asparagine-linked tri- and tetraantennary glycopeptides containing [GlcNAc-beta(1,6)Man-alpha(1,6)Man] and poly-N-acetyllactosamine sequences than baby hamster kidney cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 10772-10777.
- ¹⁸⁴ Dennis JW, Laferte S, Waghorne C, Breitman ML, Kerbel RS. Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 1987; 236: 582-585.
- ¹⁸⁵ Buckhaults P, Chen L, Fregien N, Pierce M. Transcriptional regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V by the src oncogene. *J Biol Chem* 1997; 272: 19575-19581.
- ¹⁸⁶ Wojciechowicz DC, Park PY, Paty PB. Beta 1-6 branching of N-linked carbohydrate is associated with K-Ras mutation in human colon carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212: 758-766.
- ¹⁸⁷ Dennis JW. Changes in glycosylation associated with malignant transformation and tumor progression. En: Fukuda M, editor. *Cell Surface Carbohydrates and cell Development*, CRC Press, Boca Raton, 1992, pp 161-194.
- ¹⁸⁸ Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delanoy P. The human sialyltransferase family. *Biochimie* 2001; 83: 727-737.
- ¹⁸⁹ Morgenthaler J, Kemmer W, Brossmer R. Sialic acid dependent cell adhesion to collagen IV correlates with in vivo Tumorigenicity of the human colon carcinoma sublines HCT116, HCT116a and HCT116b. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171: 860-866.
- ¹⁹⁰ Dall'Olio F, Malagolini N, DiStefano G, Minni F, Marrano D, Serafini-Cessi F. Increased CMP-NeuAc: Gal-beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6-sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *Int J Cancer* 1989; 44: 434-439.
- ¹⁹¹ Gessner P, Riedl S, Quentmaier A, Kemmer W. Enhanced activity of CMP-NeuAc: Gal Beta 1-4GlcNAc: alpha 2,6-sialyltransferase in metastasizing human colorectal tumor tissue and serum of tumor patients. *Cancer Lett* 1993; 75: 143-149.
- ¹⁹² Dall'Olio F, Chiricolo M, Ceccarelli C, Minni F, Marrano D, Santini D. Beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase in human colon cancer: contribution of multiple transcripts to regulation of enzyme activity and reactivity with Sambucus nigra agglutinin. *Int J Cancer* 2000, 1; 88: 58-65.
- ¹⁹³ Lin S, Kemmner W, Grigull S, Schlag PM. Cell Surface □2,6-Sialylation Affects Adhesion of Breast Carcinoma Cells. *Exp Cell Res* 2002; 276: 101-110.
- ¹⁹⁴ Wang PH, Lo WL, Hsu CC, Lin TW, Lee WL, Wu CY, Yuan CC, Tasi YC. Different enzyme activities of sialyltransferases in gynecological cancer cell lines. *Eur J Gynecol Oncol* 2002; 23: 221-226.
- ¹⁹⁵ Fernández-Rodríguez J, Feijoo-Carnero C, Merino-Trigo A, Páez de la Cadena M, Rodríguez-Berrocal FJ, de Carlos A, Butrón M, Martínez-Zorzano VS. Immunohistochemical Analysis of Sialic Acid and Fucose Composition in Human Colorectal Adenocarcinoma. *Tumor Biology* 2000, 21:153-164.
- ¹⁹⁶ Bronckart Y, Nagy N, Decaestecker C, Bouckaert Y, Rummelink M, Gelden I, Hittelet A, Darro F, Pector JC, Yeaton P, Danguy A, Kiss R, Salmon I. Grading dysplasia in colorectal adenomas by means of the quantitative binding pattern determination of *Arachis hypogaea*, *Dolichos biflorus*, *Amaranthus caudatus*, *Maackia amurensis*, and *Sambucus nigra* agglutinins. *Hum Pathol*; 30: 1178-1191.

-
- ¹⁹⁷ Lityńska A, Przybyło M, Książek D, Laidler P. Differences of $\alpha 3\beta 1$ -integrin glycans from different human bladder cell lines. *Acta Biochem Polonica* 2000, 47: 427-434.
- ¹⁹⁸ Mathias JV, Webke F, Sophie B, Korff T, Thomasz JZ. Quantitative lectin histochemical and immunohistochemical studies on the occurrence of alpha(2,3)- and alpha(2,6)-linked sialic acid residues in colorectal carcinomas. *Cancer* 1995; 76: 727-735.
- ¹⁹⁹ Hennes T, Chui D, Paulson JC, Marth JD. Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. *PNAS USA* 1998, 95: 4504-4509.
- ²⁰⁰ Geng JG, Chen M, Chou KC. P-selectin cell adhesion molecule in inflammation, thrombosis, cancer growth and metastasis. *Curr Med Chem* 2004; 11: 2154-2160.
- ²⁰¹ Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA, Muschel RJ. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 2004; 64: 8613-8619.
- ²⁰² Yamamoto H, Saito T, Kaneko Y, Kersey D, Wee V, Bremer EG, Mkrdichian E, Cerullo L, Leestma J, Moskal JR. Alpha2,3-sialyltransferase mRNA and alpha2,3-linked glycoprotein sialylation are increased in malignant gliomas. *Brain Res* 1997; 755: 175-179.
- ²⁰³ Yamamoto H, Oviedo A, Sweeley C, Saito T, Moskal JR. $\alpha 2,6$ -Sialylation of cell-surface *N*-glycans inhibits glioma formation *in vivo*. *Cancer Res* 2001; 61: 6822-6829.
- ²⁰⁴ Fuster MM, Brown JR, Wang L, Esko JD. A disaccharide precursor of sialyl X inhibits metastatic potential of tumor cells. *Cancer Res* 2003; 63: 2775-2781.
- ²⁰⁵ Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *PNAS* 1998; 95: 9325-9330.
- ²⁰⁶ Borsig L. Selectins facilitate carcinoma metastasis and heparin can prevent them. *News Physiol Sci* 2004; 19: 16-21.
- ²⁰⁷ Varki A. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 1992; 2: 25-40.
- ²⁰⁸ Suzuki M, Angata K, Nakayama J, Fukuda M. Polysialic Acid and Mucin Type O-Glycans on the Neural Cell Adhesion Molecule Differentially Regulate Myoblast Fusion. *J Biol Chem*, 2003; 278: 49459-49468.
- ²⁰⁹ Kohla G, Stockfleth E, Schauer R. Gangliosides with O-Acetylated Sialic Acids in Tumors of Neuroectodermal Origin. *Neurochem Res*. 2002; 27: 583-592.
- ²¹⁰ Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Rev Cancer* 2004; 4: 45-60.
- ²¹¹ Kleene R, Yang H, Kutsche M, Schachner M. The Neural Recognition Molecule L1 Is a Sialic Acid-binding Lectin for CD24, Which Induces Promotion and Inhibition of Neurite Outgrowth. *J Biol Chem*, 2001; 276: 21656-21663.
- ²¹² Shen Y, Kohla G, Lrhofli AL, Sipos B, Kalthoff H, Gerwig GJ, Kamerling JP, Schauer R, Tiralongo J. O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids in human colorectal carcinoma. *Eur J Biochem* 2004; 271: 281-290.
- ²¹³ Varki A, Kornfeld S. An autosomal dominant gene regulates the extent of 9-O-acetylation of murine erythrocyte sialic acids. *J Exp Med*, 1980; 152: 532-544.

-
- ²¹⁴ Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *PNAS* 2002; 99: 10231–10233.
- ²¹⁵ Jiménez MC, Trejo H, Herrera A, Romero JL, Chávez R, Lascurain R, Zenteno E. Alteraciones de la glicosilación en las enfermedades humanas. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2002; 15: 39-47.
- ²¹⁶ Susuki O, Nosawa Y, Kawaguchi T, Abe M. UDP-GlcNAc2-epimerase regulates cell surface sialylation and cell adhesion to extracellular matrix in Burkitt's lymphoma. *Int J Oncol* 2002; 20: 1005-1011.
- ²¹⁷ Goswami K, Nandeesha H, Koner BC, Nandakumar DN. A comparative study of serum protein-bound sialic acid in benign and malignant prostatic growth: possible role of oxidative stress in sialic acid homeostasis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2007; 10: 356-359.
- ²¹⁸ Cazet A, Julien S, Bobowski M, Krzewinski-Recchi M-A, Harduin-Lepers A, Groux-Degroote S, Delannoy P. Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydr Res* 2010; 345: 1377-1383.
- ²¹⁹ Passaniti A, Hart GW. Cell Surface Sialylation and tumor Metastasis. *J Biol Chem* 1988; 263: 7591-7603.
- ²²⁰ Kawaguchi T. Cancer metastasis: characterization and identification of the behavior of metastatic tumor cells and the cell adhesion molecules, including carbohydrates. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005; 5: 39-64.
- ²²¹ Groelik E, Galili U, Avraham R. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2001; 20: 245-277.
- ²²² Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 29-41.
- ²²³ Springer GF. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science*. 1984; 224: 1198-206.
- ²²⁴ Shigeoka H, Karsten U, Okuno K, Yasutomi M. Inhibition of liver metastases from neuraminidase-treated colon 26 cells by an anti-Thomsen-Friedenreich-specific monoclonal antibody. *Tumour Biol* 1999, 20: 139-146.
- ²²⁵ Fukuda M. Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1573: 394-405.
- ²²⁶ Schwartz B, Bresalier RS, Kim YS. The role of mucin in colon cancer metastasis. *Int J Cancer* 1992, 52: 60-65.
- ²²⁷ Cao Y, Karsten U, Liebrich W, Haensch W, Springer GF, Schlag P. Expression of Thomsen-Friedenreich-related antigens in primary and metastatic colo-rectal cancer: a reevaluation. *Cancer* 1995, 76: 1700-1708.
- ²²⁸ Regimbald LH, Pilarski LM, Longenecker BM, Reddish MA, Zimmermann G, Hugh JC. The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res* 1996, 56: 4244-4249.
- ²²⁹ Krishnan V, Bane SM, Kawle PD, Naresh KN, Kalraiya RD. Altered melanoma cell surface glycosylation mediates organ specific adhesion and metastasis via lectin receptors on the lung vascular endothelium. *Clin Experim Metastasis* 2005; 22: 11-24.
- ²³⁰ Hilkens J, Ligtenber MJL, Vos HKL, Litvinov SV. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biol Sci* 1992, 17: 359-363.

-
- ²³¹ Gimmi CD, Morrison BW, Mainprice BA, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GL, Park SYL, Watanabe M, Gong J, Hayes DF, Kufe DW, Nadler LM. Breast cancer-associated antigen DF3/MUC1 induces apoptosis of activated human T cells. *Nature Med* 1996; 2: 1367-1370.
- ²³² Iurisci I, Tinari N, Natoli C, Angelucci D, Cianchetti E, Iacobelli S. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1389-1393.
- ²³³ Lahm H, Andre S, Hoeflich A, Fischer JR, Sordat B, Kaltner H, Wolf E, Gabius HJ. Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 375-386.
- ²³⁴ Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or turners of the inflammatory response?. *Trends Immunol* 2002; 23: 313-320.
- ²³⁵ DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M. Proteases, extracellular matrix, and cancer. *Am J Pathol* 2004; 164: 1131-1139.
- ²³⁶ Xu X, Wang Y, Chen Z, Sternlicht MD, Hidalgo M, Steffensen B. Matrix metalloproteinase-2 contributes to cancer cell migration on collagen. *Cancer Res* 2005; 65: 130-137.
- ²³⁷ Van den Steen PE, Opdenakker G, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM. Matrix remodeling enzymes, the protease cascaded and glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1528: 61-73.
- ²³⁸ Seales EC, Jurado GA, Brunson BA, Wakefield JK, Frost AR, Bellis SL. Hypersialylation of β_1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res* 2005; 65: 4645-4652.
- ²³⁹ Narayanan S. Sialic acid as a tumor marker. *Ann Clin Lab Sci* 1994; 24: 376-384.
- ²⁴⁰ Yogeewaran G, Salk PL. Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines. *Science* 1981; 212: 1514-1516.
- ²⁴¹ Waltregny D, Bellahcène A, de Leval X, Florkin B, Weidle U, Castronovo V. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 834-843.
- ²⁴² Bruijn JA, Heer De E. Adhesion molecules in renal diseases. *Lab Invest* 1995; 72: 387-394.
- ²⁴³ Haapasalmi K, Makela M, Oksala O, Heino J, Yamada KM, Uitto V-J, Larjava H. Expression of epithelial adhesion proteins and integrins in chronic inflammation. *Am J Pathol* 1995; 147: 193-206.
- ²⁴⁴ Bacus SS, Zelnick CR, Chin DM, Yarden Y, Kaminski DB, Bennington J, Wen D, Marcus JN, Page DL. Medullary carcinoma is associated with expression of intercellular adhesion molecule-1, Implication to its morphology and its clinical behavior. *Am J Pathol* 1994; 145: 1337-1348.
- ²⁴⁵ Chen CP, Posy S, Ben-Shaul A, Shapiro L, Honig BH. Specificity of cell-cell adhesion by classical cadherins: Critical role for low-affinity dimerization through beta-strand swapping. *PNAS* 2005; 102: 8531-8536.
- ²⁴⁶ Dustin ML, Springer TA. T cell receptor cross linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 1989; 341: 619-624.
- ²⁴⁷ Shimizu Y, Van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. Role of adhesion molecules in T cell recognition – fundamental similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in expression, binding and costimulation. *Immunol Rev* 1990; 114: 109-143.

-
- ²⁴⁸ Krensky AM, Robbins E, Springer TA, Burakoff SI. LFA-1, LFA-2, LFA-3 antigens are involved in CTL-target conjugation. *J Immunol* 1984; 132: 2180-2182.
- ²⁴⁹ Kohl S, Springer TA, Schmalstieg FC, Loo LS, Anderson DC. Defective natural killer cytotoxicity and polymorphonuclear leukocyte antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with LFA-1 OKM-1 deficiency. *J Immunol* 1984; 133: 2972-2978.
- ²⁵⁰ Aplin AE, Howe AK, Juliano RL. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol*, 1999; 11: 737-744.
- ²⁵¹ Murray P, Frampton G, Nelson PN. Cell adhesion molecules, Sticky moments in the clinic. *BMJ*. 1999; 319: 332-334.
- ²⁵² Truong K, Ikura M. The cadherin superfamily database. *J Struct Funct Genomics*, 2002; 2: 135–143.
- ²⁵³ Bhiels J. Cadherins classification. *Adhesion molecules II. Bioch Biom*, 1998; 10: 892-897.
- ²⁵⁴ Copper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta*. 2002. 1572: 209-231.
- ²⁵⁵ Leffler H. Galectins structure and function-a synopsis. *Results Probl Cell Differ*; 2001. 33: 57-83.
- ²⁵⁶ Almquist J, Fäldt J, Dahlgren C, Leffler H, Karlsson A. Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and f-Met-Leu-Phe. *Infect Immun* 2001. 69: 832-837.
- ²⁵⁷ Danguy A, Camby I, Kiss R. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1572: 285-293.
- ²⁵⁸ Janković M, Golubović S. 200 kDa glycoprotein isolated from breast cancer tissue: a putative ligand for galectin-1. *Arch Oncol* 2000; 8: 39-43.
- ²⁵⁹ Reiji K, Akiko K. Glycobiology of Sialyl 6-Sulfo Lewis x, a New Carbohydrate Ligand for Selectins. *Trends GlycoSc Glycotech* 1999; 11: 329-344.
- ²⁶⁰ Elangbam CS, Qualis CW, Dahlgren RR. Cell adhesion molecules –Update. *Vet Pathol* 1997; 34: 61-73.
- ²⁶¹ Jorgensen OS, Bock E. Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. *J Neurochem* 1974; 23: 879-880.
- ²⁶² Rutishauser U, Thiery JP, Brackenbury R, Sela BA, Edelman GM. Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 577-581.
- ²⁶³ Brackenbury R, Thiery JP, Rutishauser U, Edelman GM. Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding. *J Biol Chem* 1977; 252: 6835-6840.
- ²⁶⁴ Moore SE, Thompson J, Kirkness V, Dickson JG, Walsh FS. Skeletal Muscle Neural Cell Adhesion Molecule (N-CAM): Changes in Protein and mRNA Species during Myogenesis of Muscle Cell Lines. *J Cell Biol* 1987; 105: 1377-1386.
- ²⁶⁵ Watanabe M. The Neural Cell Adhesion Molecule and Heart Development: What is NCAM Doing in the Heart?. *Basic Appl Myol* 1998; 8: 277-291.
- ²⁶⁶ Markovi-Lipkovski J, Müller CA, Klein G, Flad T, Klatt T, Blaschke S, Wessels JT, Müller GA. Neural cell adhesion molecule expression on renal interstitial cells. *Nephrol Dialysis Transpl* 2007; 22: 1558-1566.
- ²⁶⁷ Drake PM, Nathan JK, Stock CM, Chang PV, Muench MO, Nakata D, Reader JR, Gip P, Golden KPK, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, Troy II FA, Bertozzi CR. Polysialic Acid, a Glycan with Highly Restricted Expression, Is Found on Human and Murine Leukocytes and Modulates Immune Responses. *J Immunol*

-
- 2008; 181: 6850-6858.
- ²⁶⁸ Curreli S, Arany Z, Gerardy-Schahn R, Mann D, Stamatou NM. Polysialylated Neuropilin-2 Is Expressed on the Surface of Human Dendritic Cells and Modulates Dendritic Cell-T Lymphocyte Interactions. *J Biol Chem* 2007; 282: 30346-30356.
- ²⁶⁹ Yabe U, Sato C, Matsuda T, Kitajima K. Polysialic Acid in Human Milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J Biol Chem* 2003; 278: 13875-13880.
- ²⁷⁰ Murray BA, Hemperly JJ, Gallin WJ, MacGregor JS, Edelman GM, Cunningham BA. Isolation of cDNA clones for the chicken neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 5584-5588.
- ²⁷¹ Bathels D, Santoni M-J, Wille W, Ruppert C, Chaix J-C, Hirsch M-R, Fontecilla-Camps JC, Goridis C. Isolation and nucleotide sequence of mouse NCAM cDNA that codes for a Mr79 000 polypeptide without a membrane-spanning region. *EMBO J* 1987; 6: 907-914.
- ²⁷² Rutishauser U, Hoffman S, Edelman GM. Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 685-689.
- ²⁷³ Cole GJ, Loewy A, Glaser L. Neuronal cell-cell adhesion depends on interactions of N-CAM with heparin-like molecules. *Nature* 1986; 320: 445-447.
- ²⁷⁴ Horstkorte R, Schachner M, Magyar JP, Vorherr T, Schmitz B. The Fourth Immunoglobulin-like Domain of NCAM Contains a Carbohydrate Recognition Domain for Oligomannosidic Glycans Implicated in Association with L1 and Neurite Outgrowth. *J Cell Biol* 1993; 121: 1409-1421.
- ²⁷⁵ Dzhandzhugazyan K, Bock E. Demonstration of (Ca²⁺)-Mg²⁺-ATPase activity of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett* 1993; 336: 279-283.
- ²⁷⁶ Dubyak GR, el Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993; 265: C577-C606.
- ²⁷⁷ Kiselyov VV, Soroka V, Berezin V, Bock E. Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *J Neurochem* 2005; 94: 1169-1179.
- ²⁷⁸ Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P. Activation of the FGF receptor underlies outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 1994; 13: 583-594.
- ²⁷⁹ Saffell JL, Williams EJ, Mason IJ, Walsh FS, Doherty P. Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* 1997; 18: 231-242.
- ²⁸⁰ Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 2003; 113: 867-879.
- ²⁸¹ Probstmeier R, Kuhn K, Schachner M. Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix. *J Neurochem* 1989; 53: 1794-1801.
- ²⁸² Cole GJ, Akeson R. Identification of a heparin binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM using synthetic peptides. *Neuron* 1989; 2: 1157-1165.
- ²⁸³ Grumet M, Flaccus A, Margolis RU. Functional characterization of chondroitin sulfate proteoglycans of brain: interactions with neurons and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 1993; 120: 815-824.

-
- ²⁸⁴ Burg MA, Halfter W, Cole GJ. Analysis of proteoglycan expression in developing chicken brain: characterization of a heparan sulfate proteoglycan that interacts with the neural cell adhesion molecule. *J Neurosci Res* 1995; 41: 49-64.
- ²⁸⁵ Probstmeier R, Fahrig T, Spiess E, Schachner M. Interactions of the neural cell adhesion molecule and the myelin-associated glycoprotein with collagen type I: involvement in fibrillogenesis. *J Cell Biol* 1992; 116: 1063-1070.
- ²⁸⁶ Walmod PS, Kolkova K, Berezin V, Bock E. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res* 2004; 29: 2015-2035.
- ²⁸⁷ Büttner B, Kannicht C, Reutter W, Horstkorte R. The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 967-971.
- ²⁸⁸ He Q, Meiri KF. Isolation and characterization of detergent-resistant microdomains responsive to NCAM-mediated signaling from growth cones. *Mol Cell Neurosci* 2002; 19: 18-31.
- ²⁸⁹ Reyes AA, Small SJ, Akeson R. At least 27 alternatively spliced forms of the neural cell adhesion molecule mRNA are expressed during rat heart development. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1654-1661.
- ²⁹⁰ Nguyen C, Mattei MG, Mattei JF, Santoni MJ, Goidis C, Jordan BR. Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. *J Cell Biol* 1986; 102: 711-715.
- ²⁹¹ Yasue M, Serikawa T, Kuramoto T, Mori M, Higashiguchi T, Ishizaki K, Yamada J. Chromosomal assignments of 17 structural genes and 11 related DNA fragments in rats (*Rattus norvegicus*) by Southern blot analysis of rat x mouse somatic cell hybrid clones. *Genomics* 1992; 12: 659-664.
- ²⁹² Olsen M, Krog L, Edvardsen K, Skovgaard LT, Bock E. Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane. *Biochem J* 1993; 295 (Pt3): 833-840.
- ²⁹³ Kulahin N, Rudenko O, Kiselyov V, Poulsen FM, Berezin V, Bock E. Modulation of the homophilic interaction between the first and second Ig modules of neural cell adhesion molecule by heparin. *J Neurochem* 2005; 95: 46-55.
- ²⁹⁴ Hemperly JJ, Edelman GM, Cunningham BA. cDNA clones of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) lacking a membrane-spanning region consistent with evidence for membrane attachment via a phosphatidylinositol intermediate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9822-9826.
- ²⁹⁵ Albach C, Damoc E, Denzinger T, Schachner M, Przybylski M, Schmitz B. Identification of N-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2004; 378: 1129-1135.
- ²⁹⁶ Finne J. Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J Biol Chem* 1982; 257: 11966-11970.
- ²⁹⁷ Quartu M, Pina M, Boi M, Ibba V, Melis T, Del Fiacco M. Polysialylated-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in the human trigeminal ganglion and brainstem at prenatal and adult ages. *BMC Neurosci* 2008; 9:108-120.
- ²⁹⁸ Kleene R, Schachner M. Glycans and neural cell interactions. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 195-208.

-
- ²⁹⁹ Wang B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu Rev Nutr* 2009; 29: 177-222.
- ³⁰⁰ Haltiwanger RS. Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 2002; 12: 593-598.
- ³⁰¹ Qi J, Chen N, Wang J, Siu C-H. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-Cadherin-mediated adhesion and activation of the B-catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4386-4397.
- ³⁰² Becker CG, Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Wezl H, Schachner M. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res* 1996; 45: 143-152.
- ³⁰³ Rutishauser U, Landmesser L. Polysialic acid in vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci* 1996; 19: 422-427.
- ³⁰⁴ Oltmann-Norden I, Galuska SP, Hildebrandt H, Geyer R, Gerardy-Schahn R, Geyer H, Mühlenhoff M. Impact of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV on the polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. *J Biol Chem* 2008; 283: 1463-1471.
- ³⁰⁵ Finne J. Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J Biol Chem* 1982; 257: 11966-11970.
- ³⁰⁶ Troy FA. Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology* 1992; 2: 5-23.
- ³⁰⁷ Sato K, Iwai M, Nagano I, Shoji M, Abe K. Changes of localization of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in rat hippocampus with exposure to repeated kindled seizures. *Brain Res* 2002; 946: 323-327.
- ³⁰⁸ Rodríguez JJ, Montaron MF, Petry KG, Arousseau C, Marinelli M, Premier S, Rougon G, Le Moal M, Arous DN. Complex regulation of the expression of polysialylated form of the neural cell adhesion molecule by glucocorticoids in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 2994-3006.
- ³⁰⁹ Mazzetti S, Ortino B, Inverardi F, Frassoni C, Amadeo A. PSA-NCAM in the developing and mature thalamus. *Brain Res Bulletin* 2007; 71: 578-586.
- ³¹⁰ Varea E, Nacher J, Blasco-Ibáñez JM, Gómez-Climent MA, Castillo-Gómez E, Crespo C, Martínez-Guijarro FJ. PSA-NCAM expression in the rat medial prefrontal cortex. *Neurosci* 2005; 136: 435-443.
- ³¹¹ Moebius JM, Widera D, Schmitz J, Kaltzschmidt C, Piechaczek C. Impact of polysialylated CD56 on natural killer cell cytotoxicity. *BMC Immunol* 2007; 8: 13-21.
- ³¹² Murphy JA, Hartwick ATE, Rutishauser U, Clarke DB. Endogenous polysialylated neural cell adhesion molecule enhances the survival of retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 861-869.
- ³¹³ Inoue S, Lin SL, Chang T, Wu SH, Yao CW, Chu TY, Troy FA 2nd, Inoue Y. Identification of free deaminated sialic acid (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid) in human red blood cells and its elevated expression in fetal cord red blood cells and ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 27199-204.
- ³¹⁴ Bruses JL, Rutishauser U. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie* 2001; 83: 635-643.
- ³¹⁵ Sytnyk V, Leshchyn's'ka I, Nikonenko AG, Schachner M. NCAM promotes assembly and activity-dependent remodeling of the postsynaptic signaling complex. *J Cell Biol* 2006; 174: 1071-1085.

-
- ³¹⁶ Seki T. and Arai Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res* 1993; 17: 265-290.
- ³¹⁷ Rutishauser U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature Rev Neurosci* 2008; 9: 26-35.
- ³¹⁸ Fernandes AI, Gregoriadis G. Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1341: 26-34
- ³¹⁹ Galuska SP, Rollenhagen M, Kaup M, Eggers K, Oltmann-Norden I, Schiff M, Hartmann M, Weinhold B, Hildebrandt H, Geyer R, Mühlenhoff M, Geyer H. Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 10250-10255.
- ³²⁰ Kiss JZ, Rougon G. Cell biology of polysialic acid. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 640-647.
- ³²¹ Parka C, Choa K, Ryua JH, Shinb KS, Kima J, Ahna H, Huh Y. 7-Nitroindazole upregulates phosphorylated cAMP response element binding protein, polysialylated-neural cell adhesion molecule and tryptophan hydroxylase expression in the adult rat hippocampus. *Brain Research* 2004; 1008: 120-125.
- ³²² Mikkonen M, Soininen H, Tapiola T, Alafuzoff I, Miettinen R. Hippocampal plasticity in Alzheimer disease: changes in highly polysialylated NCAM immunoreactivity in the hippocampal formation. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 1754-1764.
- ³²³ Rutishauser U, Landmesser L. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci* 1996; 19: 422-427.
- ³²⁴ Cheung IY, Vickers A, Cheung NK. Sialyltransferase STX (ST8SialI): A novel molecular marker of metastatic neuroblastoma. *Int J Cancer* 2006; 119: 152-156.
- ³²⁵ Bonfanti L. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol* 2006; 80: 129-164.
- ³²⁶ Bart J, Groen HJM, Hendrikse NH, van der Graaf WTA, Waalburg W, Vries EGE. The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treat Rev* 2000; 26: 449-462.
- ³²⁷ Vries HE, Kuiper J, De Boer AG, Van Berkel TJC, Breimer DD. The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammatory Diseases. *Pharmac Rev* 1997; 49: 143-155.
- ³²⁸ Gold R, Archelos JL, Hartung HP. Mechanism of Immune Regulation in the Peripheral Nervous System. *Brain Pathol* 1999; 9: 343-360.
- ³²⁹ Acheson A, Sunshine J, Rutishauser U. NCAM Polysialic Acid Can Regulate both Cell-Cell and Cell-Substrate Interactions. *J Cell Biol* 1991; 114: 143-153.
- ³³⁰ Seidenfaden R, Krauter A, Schertzinger F, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5908-5918.
- ³³¹ Zenteno, E.; Debray, H.; Montreuil, J. Purification and partial characterization of two lectins from the cactus *Machaerocereus eruca*. *FEBS Letters* 1988; 238: 95-100.
- ³³² Savage D, Mattson G, Desai S, Nielander G, Morgensen S, Conklin E, editores. *Avidin-biotin chemistry: A handbook*. Ed. Pierce Chemical Company, Rockford IL, USA. 1992

-
- ³³³ Bøgg-Hansen T. En: Thorkild's lectin page. University of Copenhagen. <http://plab.ku.dk/tcbh/lectin-links>. última actualización: 2007
- ³³⁴ Hall J. Inclusión de tejidos. En: Métodos Histotecnológicos. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC 1995; C7: 41-46.
- ³³⁵ Achstetter VA. Microtomía. En: Métodos Histotecnológicos. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, 1995; C8: 47-54.
- ³³⁶ Mayoral M, Zenteno E, Espinosa B, Martínez S, Guevara J. Perspectiva monográfica del cáncer pulmonar: Un enfoque molecular y la metástasis al cerebro. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2004; 17: 283-292.
- ³³⁷ Steeg PS. Molecular biology of breast cancer metastasis 'Has it spread?': disarming one of the most terrifying questions. *Breast Cancer Res* 2000; 2: 396-399.
- ³³⁸ Hsiung R, Zhu W, Klein G, Qin W, Rosenberg A, Park P, et al. High basic fibroblast growth factors levels in nipple aspirate fluid are correlated with breast cancer. *Cancer J* 2002; 8: 303-310.
- ³³⁹ Kumar SR, Sauter ER, Quinn TP, Deutscher SL. Thomsen-Friedenreich and Tn antigens in nipple fluid: carbohydrate biomarkers for breast cancer detection. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6868-6871.
- ³⁴⁰ Cruz-Bustillos D. Molecular genetics of colorectal cancer. *Rev Esp Enf Digest* 2004; 96: 48-59.
- ³⁴¹ Hull SR, Carraway KL. Mechanism of expression of Thomsen-Friedenreich (T) antigen at the cell surface of a mammary adenocarcinoma. *FASEB J* 1988; 2: 2380-2384.
- ³⁴² Bresalier RS, Ho SB, Schoeppner HL, Kim YS, Sleisenger MH, Brodt P, Byrd JC. Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1354-1367.
- ³⁴³ Yu L-G. The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression. *Glycoconjugate J* 2007; 24: 411-420.
- ³⁴⁴ Irazoqui FJ, Jansson B, Lopez PHH, Nores GA. Correlative fine specificity of several Thomsen-Friedenreich disaccharide-binding proteins with an effect on tumor cell proliferation. *J Biochem* 2001; 130: 33: 37.
- ³⁴⁵ Wang BL, Springer GF, Carlstedt SC. Quantitative computerized image analysis of Tn and T (Thomsen-Friedenreich) epitopes in prognostication of human breast carcinoma. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 1393-1400.
- ³⁴⁶ Cao Y, Karsten U, Otto G, Bannasch P. Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich antigen, Tn, sialyl-Tn, and alpha2,6-linked sialic acid in hepatocellular carcinomas and preneoplastic hepatocellular lesions. *Virchows Archiv* 1999; 434: 503-509.
- ³⁴⁷ Schindlbeck C, Jeschke U, Schulze S, Karsten U, Janni W, Rack B, Krajewski S, Sommer H, Friese K. Prognostic impact of Thomsen-Friedenreich tumor antigen and disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 101: 17-25.
- ³⁴⁸ Hernandez P, Tetaert D, Vergoten G, Debray H, Jimenez MC, Alvarez G, Agundis C, Degand P, Zenteno E. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin for O-glycopeptides. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1674: 282-290.

-
- ³⁴⁹ Galili U, Buehler J, Shohet SB, MAcher BA. The human natural anti-Gal IgG. III The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J Exp Med* 1987; 165: 693-704.
- ³⁵⁰ Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N. The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* 1975; 250: 8518-8523.
- ³⁵¹ Cooper HS. Lectins as probes in histochemistry and immunohistochemistry: The peanut (*Arachis hypogaea*) lectin. *Hum Pathol* 1984; 15: 904-906
- ³⁵² Chacko BK, Appukuttan PS. Peanut (*Arachis hypogaea*) lectin recognizes α -linked galactose, but not *N*-acetyl lactosamine in *N*-linked oligosaccharide terminals. *Int J Biol Macromol* 2001; 28: 365-371
- ³⁵³ Zenteno E, Vazquez L, Chavez R, Cordoba F, Wieruszkeski JM, Montreuil J, Debray H. Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for oligosaccharides from porcine stomach mucin. *Glycoconj J* 1995; 12: 699-706.
- ³⁵⁴ Laferte S, Chan NW, Sujino K, Lowary TL, Palcic MM. Intracellular inhibition of blood group A glycosyltransferase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4840-4849.
- ³⁵⁵ Lee JS, Ro JY, Sahin AA, Hong WK, Brown BW, Mountain CF, Hittelman WN. Expression of blood-group antigen A- a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 1991; 324: 1084-1090.
- ³⁵⁶ Matsumoto H, Muramatsu H, Shimotakahara T, Yanagi M, Nishijima H, Mitani N, Baba K, Muramatsu T, Shimazu H. Correlation of expression of ABH blood group carbohydrate antigens with metastatic potential in human lung carcinomas. *Cancer* 1993; 72: 75-81.
- ³⁵⁷ Moldvay J, Scheid P, Wild P, Nabil K, Siat J, Borrelly J, Marie B, Farre G, Labib T, Pottier G, Sesboue R, Bronner C, Vignaud JM, Martinet Y, Martinet N. Predictive survival markers in patients with surgically resected non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1125-1134.
- ³⁵⁸ Ichikawa D, Handa K, Withers DA, Hakomori S. Histo-blood group A/B versus H status of human carcinoma cells as correlated with haptotactic cell motility: approach with A and B gene transfection. *Cancer Res* 1997; 57: 3092-3096.
- ³⁵⁹ Prokopishyn NL, Puzon-McLaughlin W, Takada Y, Laferte S. Integrin $\alpha 3\beta 1$ expressed by human colon cancer cells is a major carrier of oncodevelopmental carbohydrate epitopes. *J Cell Biochem* 1999; 72: 189-209.
- ³⁶⁰ Hirota M, Mogaki M, Pour PM, Chaney WG. Glycan structure of blood group-A antigen in hamster normal tissues and pancreatic cancers. *Exp Mol Pathol* 1993; 58: 169-178.
- ³⁶¹ Dall'Olio F, Chiricolo M. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate J* 2001; 18: 841-850.
- ³⁶² Tang W, Mafune K, Nakata M, Konishi T, Kojima N, Mizuochi T, Makuuchi M. Association of histochemical expression of *Maackia amurensis* leucoagglutinin-positive glycoconjugates with behaviour of human gastric cancer. *Histopathology* 2003; 42: 239-245.
- ³⁶³ Julien S, Adriaenssens E, Ottenberg K, Furlan A, Courtand G, Vercoutter-Edouart A-S, Hanisch F-G, Delanoy P, Le Bourhis X. ST6GalNAc I in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumorigenicity. *Glycobiology* 2006; 16: 54-64.

-
- ³⁶⁴ Berois N, Mazal D, Ubillos L, Trajtenberg F, Nicolas A, Sastre-Garau X, Magdelenat H, Osinaga E. UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-6 as a new immunohistochemical breast cancer marker. *J Histochem Cytochem* 2006; 54: 317-328.
- ³⁶⁵ Sinha D, Chatterjee M, Mandal C. O-Acetylated sialic acids- their detection, biological significance and alteration in diseases. *Trends Glycosci Glycotech* 2000; 12: 17-33.
- ³⁶⁶ Inbar M, Sachs L. Interaction of the Carbohydrate-Binding Protein Concanavalin A with Normal and Transformed Cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 63: 1418-1425.
- ³⁶⁷ Suzuki T, Hasegawa R, Murasaki G, Cohen SM. Distinction by concanavalin A agglutination between ulceration and repair of rat bladder epithelium induced by freezing or cyclophosphamide and the effect of sodium saccharin. *Cancer Res* 1984; 44: 74-77.
- ³⁶⁸ Juntavee A, Sripa B, Pugkhem A, Khuntikeo N, Wongkham S. Expression of sialyl Lewis(a) relates to poor prognosis in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 249-54.
- ³⁶⁹ Krause T, Turner GA. Are selectins involved in metastasis?. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 183-192.
- ³⁷⁰ Gaßmann P, Enns A, Haier J. Role of Tumor Cell Adhesion and Migration in Organ-Specific Metastasis Formation. *Onkologie* 2004; 27: 577-582.
- ³⁷¹ Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J* 1997; 14: 569-576.
- ³⁷² Kannagi R. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj J* 1997; 14: 577-584.
- ³⁷³ Ivanov S, Stoilov J, Ivanov D, Gavazova E. Acceptor specificity of fucosyltransferase in normal and malignant cells, and in the serum of healthy and tumor bearing rats. *Exp Pathol Parasitol* 1999; 3: 27-31.
- ³⁷⁴ Mas E, Pasqualini E, Caillol N, El Battari A, Crotte C, Lombardo D, Sadoulet MO. Fucosyltransferase activities in human pancreatic tissue: comparative study between cancer tissues and established tumoral cell lines. *Glycobiology* 1998; 8: 605-613.
- ³⁷⁵ Sun J, Thurin J, Cooper HS, Wang P, Mackiewicz M, Steplewski Z, Blaszczyk-Thurin M. Elevated expression of H type GDP-L-fucose: beta-D-galactoside alpha-2-L-fucosyltransferase is associated with human colon adenocarcinoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5724-5728.
- ³⁷⁶ Chandrasekaran EU, Chawda R, Locke RD, Piskorz CF, Matta K. Biosynthesis of the carbohydrate antigenic determinants, Globo H, blood group H, and Lewis b: a role for prostate cancer cell alpha-1,2-L-fucosyltransferase. *Glycobiology* 2002; 12: 153-162.
- ³⁷⁷ Goupille C, Marionneau S, Bureau V, Hallouin F, Meichenin M, Rocher J, Le Pendu J. alpha1,2-Fucosyltransferase increases resistance to apoptosis of rat colon carcinoma cells. *Glycobiology* 2000; 10: 375-382.
- ³⁷⁸ Chandrasekaran EV, Chauda R, Rhodes JM, Locke RD, Piskorz CF, Matta KL. The Binding characteristic and utilization of *Aleuria aurantia*, *Lens culinaris* and few other lectins in the elucidation of fucosyltransferase activities resembling cloned FT VI and apparently unique to colon cancer cells. *Carbohydrate Res* 2003; 338: 887-901.

-
- ³⁷⁹ Yoshida S, Kurokohchi K, Arima K, Masaki T, Hosomi N, Funaki T, Murota M, Kita Y, Watanabe S, Kuriyama S. Clinical significance of lens culinaris agglutinin-reactive fraction of serum alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 2002 Feb; 20: 305-309.
- ³⁸⁰ Aoyagi Y, Mita Y, Suda T, Kawai K, Kuroiwa T, Igarashi M, Kobayashi M, Waguri N, Asakura H. The fucosylation index of serum alpha-fetoprotein as useful prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma in special reference to chronological changes. *Hepatol Res* 2002; 23: 287-295.
- ³⁸¹ Hanish FG. O-glycosylation of the mucin-type. *Biol Chem* 2001; 382: 143-149.
- ³⁸² Pratt MR, Hang HC, Ten Hagen KG, Rarick J, Gerken TA, Tazbak LA, Bertozzi CR. Deconvoluting the functions of polypeptide N-alpha-acetylgalactosaminyltransferase family members by glycopeptide substrate profiling. *Chem Biol* 2004; 11: 1009-1116.
- ³⁸³ Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 2004, 5:146–156.
- ³⁸⁴ Jensen SM, Gazdar AF, Cuttitta F, Russell EK, Linnoila RI. A comparison of synaptophysin, chromogranin, and L-dopa decarboxylase as markers for neuroendocrine differentiation in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1990; 15: 6068-6074.
- ³⁸⁵ Leshchynska I, Sytnyk V, Morrow JS, Schachner M. Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKC2 via BI spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Cell Biol* 2003, 161 (3): 625–639.
- ³⁸⁶ Fogar, P. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res* 1997. 17, 1227–1230.
- ³⁸⁷ Probstmeier, R., Kuhn, K. & Schachner, M. Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix. *J. Neurochem* 1989. 53, 1794–1801
- ³⁸⁸ Burden-Gulley SM, Brady-Kalnay SM. PTP μ Regulates N-Cadherin-dependent Neurite Outgrowth. *J Cell Biol*, 1999; 144: 1323-1336.
- ³⁸⁹ Crnic I, Strittmatter K, Cavallaro U, Kopfstein L, Jussila L, Alitalo K, Christofori G. Loss of Neural Cell Adhesion Molecule Induces Tumor Metastasis by Up-regulating Lymphangiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 8630-8638.
- ³⁹⁰ Bequen W-D, Engl T, Ogbomo H, Relja B, Cinatl J, Bereiter-Hahn J, Oppermann E, Jonas D, Blaheta RA. Valproic acid modulates NCAM polysialylation and polysialyltransferase mRNA expression in human tumor cells. *Int J Immuno pharmacol* 2005; 5: 757-769
- ³⁹¹ Petridis AK, Wedderkopp H, Hugo HH, Mehdorn HM. Polysialic acid overexpression in malignant astrocytomas. *Acta Neurochir* 2009; 151: 601-604.
- ³⁹² Amoureux M-C, Coulibaly B, Chinot O, Loundou A, Metellus P, Rougon G, Figarella-Branger D. Polysialic Acid Neural Cell Adhesion Molecule (PSA-NCAM) is an adverse prognosis factor in glioblastoma, and regulates oligo expression in glioma cell lines. *BMC Cancer* 2010; 10: 91
- ³⁹³ Suzuki M, Suzuki M, Nakayama J, Suzuki A, Angata K, Chen S, Sakai K, Hagihara K, Yamaguchi Y, Fukuda M. Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology* 2005; 15: 887-894.
- ³⁹⁴ Daniel L, Trouillas J, Renaud W, Chevallier P, Gouvernet J, Rougon G, Figarella-Branger D. Polysialylated-Neural Cell Adhesion Molecule Expression in Rat Pituitary Transplantable Tumors (Spontaneous Mammatropic Transplantable Tumor in Wistar-Furth Rats) Is Related to Growth Rate and Malignancy.

-
- Cancer Res 2000; 60: 80-85.
- ³⁹⁵ Schreiber SC, Giehl K, Kastilan C, Hasel C, Mühlenhoff M, Adler G, Wedlich D, Menke A. Polysialylated NCAM Represses E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion in Pancreatic Tumor Cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 1555-1566.
- ³⁹⁶ Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K, Wada H. Expression of Polysialic acid and STX, a Human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 3072-3080.
- ³⁹⁷ Aletsee-Ufrecht MC, Langley K, Rotsch M, Havemann K, Gratz M. NCAM: a surface marker for human small cell lung cancer cells. *FEBS* 1990; 267: 295-300.
- ³⁹⁸ Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Inui K, Oyanagi H, Yamada T, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K, Wada H. Prognostic Significance of Polysialic Acid Expression in Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 1666-1670
- ³⁹⁹ Komminoth P, Roth J, Lackie PM, Bitter-Suermann D, Heitz PU. Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule distinguishes small cell lung carcinoma from carcinoids. *Am J Pathol* 1991; 139: 297-304.
- ⁴⁰⁰ Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S. Inactivation of the C-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 1994; 367: 455-459.
- ⁴⁰¹ Fryer JL, Hockfield S. The role of polysialic acid and other carbohydrate polymers in neural structural plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 113-118
- ⁴⁰² Kiss JZ, Rougon G. Cell biology of polysialic acid. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 640-646.
- ⁴⁰³ Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U, Leckband DE. Direct Evidence That Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Polysialylation Increases Intermembrane Repulsion and Abrogates Adhesion. *J Biol Chem* 2005; 280: 137-145.
- ⁴⁰⁴ Doherty P, Fruns M, Saetón P, Dickson G, Sears TA, Walsh FS. A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth. *Nature* 1990; 343: 464-466.
- ⁴⁰⁵ Zhang H, Miller RH, Rutishauser U. Polysialic acid is required for optimal growth of axons on neuronal substrate. *J Neurosci* 1992; 12: 3107-3114
- ⁴⁰⁶ Bruses JL, Rutishauser U. Roles, regulation and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochemie* 2001; 83: 635-643.
- ⁴⁰⁷ Ono K, Tomaszewicz H, Magnuson T, Rutishauser U. N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 1994; 13: 595-609.
- ⁴⁰⁸ Weinhold B, Seidenfaden R, Röckle I, Mühlenhoff M, Schertzing F, Conzelmann S, Marth JD, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 2005; 280: 42971-42977.
- ⁴⁰⁹ Seidenfaden R, Krauter A, Schertzing F, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic NCAM interactions. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5908-5918.
- ⁴¹⁰ Seki T, Arai Y. Expression of highly polysialylated NCAM in the neocortex and piriform cortex of the developing and the adult rat. *Anat Embryol* 1991; 184: 395-401.

-
- ⁴¹¹ Mikkonen M, Soininen H, Tapiola T, Alafuzoff I, Miettinen R. Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease: changes in highly polysialylated NCAM immunoreactivity in the hippocampal formation. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 1754-1764
- ⁴¹² Doherty P, Fazeli MS, Walsh FS. The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *J Neurobiol* 1995; 26: 437-446.
- ⁴¹³ Rutishauser U, Landmesser L. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci* 1996; 19: 422-427.
- ⁴¹⁴ El Maarouf A, Kolesnikov Y, Pasternak G, Rutishauser U. Polysialic acid-induced plasticity reduces neuropathic insult to the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 1516-11520.
- ⁴¹⁵ El Maarouf A, Petridis AK, Rutishauser U. Use of polysialic acid in repair of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 16989-16994.

ANEXOS

SPRINGER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

This is a License Agreement between Miguel Mayoral ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions. **All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard,Langford Lane Kidlington,Oxford,OX5 1GB,UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Miguel Mayoral
Customer address	Eucaliptos 401 Oaxaca, other 68050
License number	2474050949757
License date	Jul 22, 2010
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Progress in Neurobiology
Licensed content title	PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis
Licensed content author	Luca Bonfanti
Licensed content date	October 2006
Licensed content volume number	80
Licensed content issue number	3
Number of pages	36
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	Not specified
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	
Format	print
No	
No	
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	Glycosylation like a mechanism of metastasis
Expected completion date	Sep 2010
Estimated size (number of pages)	100
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

- Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
- Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:
"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."
- Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.
- Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)
- If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.
- Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
- Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
- Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
- No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without

publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.

16. **Website:** The following terms and conditions apply to electronic reserve and author websites: **Electronic reserve:** If licensed material is to be posted to website, the web site is to be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course if: This license was made in connection with a course, This permission is granted for 1 year only. You may obtain a license for future website posting. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image, A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>, and Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

17. **Author website** for journals with the following additional clauses:

All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image, and the permission granted is limited to the personal version of your paper. You are not allowed to download and post the published electronic version of your article (whether PDF or HTML, proof or final version), nor may you scan the printed edition to create an electronic version. A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx>, As part of our normal production process, you will receive an e-mail notice when your article appears on Elsevier's online service ScienceDirect (www.sciencedirect.com). That e-mail will include the article's Digital Object Identifier (DOI). This number provides the electronic link to the published article and should be included in the posting of your personal version. We ask that you wait until you receive this e-mail and have the DOI to do any posting. Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

18. **Author website** for books with the following additional clauses: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. A hyper-text must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>

All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

19. **Website** (regular and for author): A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx>, or for books to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>

20. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

SPRINGER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

This is a License Agreement between Miguel Mayoral ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions. **All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	2476580252201
License date	Jul 26, 2010
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Glycobiology
Licensed content title	Diversity in the sialic acids
Licensed content author	Ajit Varki
Licensed content date	April 1992
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	Glycosylation like a mechanism of metastasis
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Sep 2010
Permissions cost	0.00 USD
Value added tax	0.00 USD
Total	0.00 USD
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oxfordjournals.org
7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.
8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.
10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
12. Other Terms and Conditions: In addition to the permission granted above permission is granted for the translation and republication of the requested material in the Spanish language.

v1.4

SPRINGER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

This is a License Agreement between Miguel Mayoral ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions. **All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	2478060535055
License date	Jul 29, 2010
Licensed content publisher	Springer
Licensed content publication	Neurochemical Research
Licensed content title	Zippers Make Signals: NCAM-mediated Molecular Interactions and Signal Transduction
Licensed content author	Peter S. Walmod
Licensed content date	Nov 1, 2004
Volume number	29
Issue number	11
Type of Use	Thesis/Dissertation
Portion	Figures
Author of this Springer article	No
Order reference number	
Title of your thesis / dissertation	Glycosylation like a mechanism of metastasis
Expected completion date	Sep 2010
Estimated size (pages)	100
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Introduction The publisher for this copyrighted material is Springer Science + Business Media. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Limited License With reference to your request to reprint in your thesis material on which Springer Science and Business Media control the copyright, permission is granted, free of charge, for the use indicated in your enquiry. Licenses are for one-time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process.

This License includes use in an electronic form, provided it is password protected or on the university's intranet, destined to microfilming by UMI and University repository. For any other electronic use, please contact Springer at (permissions.dordrecht@springer.com or permissions.heidelberg@springer.com)

The material can only be used for the purpose of defending your thesis, and with a maximum of 100 extra copies in paper.

Although Springer holds copyright to the material and is entitled to negotiate on rights, this license is only valid, provided permission is also obtained from the (co) author (address is given with the article/chapter) and provided it concerns original material which does not carry references to other sources (if material in question appears with credit to another source, authorization from that source is required as well). Permission free of charge on this occasion does not prejudice any rights we might have to charge for reproduction of our copyrighted material in the future.

Altering/Modifying Material: Not Permitted However figures and illustrations may be altered minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of the author(s) and/or Springer Science + Business Media. (Please contact Springer at permissions.dordrecht@springer.com or permissions.heidelberg@springer.com)

Reservation of Rights Springer Science + Business Media reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

Copyright Notice: Please include the following copyright citation referencing the publication in which the material was originally published. Where wording is within brackets, please include verbatim. "With kind permission from Springer Science+Business Media: <book/journal title, chapter/article title, volume, year of publication, page, name(s) of author(s), figure number(s), and any original (first) copyright notice displayed with material>."

Warranties: Springer Science + Business Media makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

Indemnity You hereby indemnify and agree to hold harmless Springer Science + Business Media and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

No Transfer of License This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without Springer Science + Business Media's written permission.

No Amendment Except in Writing This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of Springer Science + Business Media, by CCC on Springer Science + Business Media's behalf).

ORIGINAL ARTICLE
Clinical Translational Therapeutics

Identification of Galectin-3 and Mucin-Type O-Glycans in Breast Cancer and Its Metastasis to Brain

M. A. Mayoral,¹ C. Mayoral,² A. Meneses,³ L. Villalvazo,⁴ A. Guzmán,⁴ B. Espinosa,⁵ J. L. Ochoa,⁶
E. Zenteno,⁷ and J. Guevara¹

Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Del. Tlalpan, México.¹

Servicio de Cirugía Plástica y Reconstructiva, Hospital General “Dr. Manuel Gea Gonzalez”, Col. Toriello Guerra, Del. Tlalpan, México.²

Departamento de Patología, Instituto Nacional de Cancerología, Col. Sección XVI, Del. Tlalpan, México.³

Opción de Técnico en Histopatología, Escuela Nacional Preparatoria, Universidad Nacional Autónoma de México, Del. Xochimilco, México.⁴

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Col. Sección XVI, Del. Tlalpan, México.⁵

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Col. Playa Palo de Sta. Rita, La Paz, Baja California Sur, México.⁶

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito escolar, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, México.⁷

ABSTRACT

Galectin-3 has been implicated in tumor progression. We demonstrated immunohistochemically that Galectin-3 was negative in normal breast tissue, but it was highly increased in breast cancer and in metastatic tissues to brain. Similarly, histochemistry with mucin-specific lectins showed increased recognition in breast tumor and metastasis with *Machaerocereus eruca* agglutinin (Fu α 1,2 (GalNAc α 1,3) Gal β 1,4 in complex mucin) but not for *Amaranthus leucocarpus* (Gal β 1,3-GalNAc- α 1,0-Ser/Thr) and *Arachis hypogaea* lectins (Gal β 1,3GalNAc/Gal β 1,4GlcNAc). Mucin-type glycans and Galectin-3 colocalized in breast cancer and metastasis, but not in normal tissue, suggesting upregulated biosynthesis of complex O-glycosidically linked glycans and Galectin-3 favor breast cancer progression and brain metastasis.

INTRODUCTION

Metastasis is the major and fatal complication in cancer. Several mechanisms have been proposed by which cancer cells migrate and establish metastases. One of these mechanisms could be exerted through carbohydrate interactions. The key role of

tumor-associated glycoconjugates in diverse cell interactions is not clear. It has been suggested that cell surface glycoconjugates seem to be pivotal for oncogenic transformation, facilitating tumor cell migration and metastasis by affecting cell-cell and cell-matrix interactions (1, 2). In this regard, glycoproteins and glycolipids play relevant roles in cellular development, differentiation, and in pathological conditions (1–3). The role for O-glycosidically-linked glycans in tumor cells adhesion and metastasis has been proposed on the existence of O-glycans-mediated adhesion moieties from highly metastatic murine cells (4).

Mucin-type O-glycosylation is initiated by a large family of UDP-GalNAc:polypeptide GalNAc-transferases that adds GalNAc to selected Ser and Thr residues. Further assembly of O-glycan chains involves different biosynthetic pathways. The O-glycosidically linked glycans present in glycoproteins could be initiated by mucin-type core-1 (Gal β 1,3GalNAc-Ser/Thr, or T antigen) or by UDP-GalNAc β 1,3Gal-transferase activity that could be converted, in turn, to complex-type core-2 by UDP-GlcNAc:Gal β 1,3GalNAc α 1,6GlcNAc-transferase. They could form mucin-type core-3 by UDP-GlcNAc:GalNAc α 1,3GlcNAc-transferase (5) or more complex structures, such as

This project was in part supported by CONACYT (G3859ON), (61205), FUNSALUD, INNN, SSA-CONACYT (7165) and the Programa Universitario de Epidemiología, Genómica y Proteómica (SDEI.PTID.05.2), UNAM, Mexico.

Keywords: Mucins, O-glycosylation, Breast cancer, Metastasis, Lectin, Galectin-3, T-antigen

Corresponding to:

Jorge Guevara, Ph.D.

Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Insurgentes Sur 3877. Col. La Fama. Del. Tlalpan

C. P. 14269, México, D. F.

México

email: jguevara@innn.edu.mx

core-8 by core-8- α Gal-transferase (6). One of the most widely proposed cancer-associated cell surface mucin type O-glycan is the *Thomsen-Friedenreich* (T)-antigen (3). T-antigen is a core-1 mucin-type disaccharide Gal β 1,3GalNAc and is the core disaccharide of O-linked glycoconjugates expressed on the cellular surface of most human carcinomas (3, 7). In healthy cells, T-antigen-associated O-glycans seem to be encrypted (8) and have been suggested to participate in homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of human breast carcinoma cells as well as to favor human breast carcinoma cell adhesion to the endothelium (9).

Lectins are proteins or glycoproteins that recognize carbohydrates or precipitate glycoconjugates. They have important functions as tools for oligosaccharide characterization as well as for isolation of cellular populations (10). *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) shows specificity to the T-antigen disaccharide in O-glycopeptides that can be in the sialylated form. *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA) shows specificity to galactose residues in terminal position of non-sialylated glycoconjugates and also shows affinity for GalNAc or lactosamine residues. *Machaerocereus eruca* agglutinin (MEA) interacts with a biantennary O-glycan possessing the terminal Fu α 1,2 (GalNAc α 1,3) Gal β 1,4 in complex mucin structures.

Galectins are a family of soluble β -galactoside-binding animal lectins that modulate cell-to-cell adhesion and cell-to-extracellular matrix interactions (11) and play a role in tumor progression (12). The Galectin-3 protein contains a single carbohydrate binding domain, which binds galactose-containing glycoconjugates (13, 14). Galectin-3 is expressed in colonic and intestinal epithelia, inflammatory macrophages, papillary and follicular carcinomas, neoplastic astrocytes, and some B and T lymphocytes. Upregulated expression of Galectin-3 is involved in cancer progression and metastasis. Galectin-3 may also be used as a marker for diagnosing cases involving Hurthle cell adenomas and carcinomas. Recently, it has been suggested that Galectin-3 plays an important role in metastasis (12) by promoting tumor cell adhesion (11) and invasiveness (15), as well as by antagonizing tumor cell apoptosis (16).

The aim of this work was to demonstrate that Galectin-3 and specific differences in the O-glycosylation pattern might play a role in human brain metastasis of breast origin. We used lectins that show specificity for different O-glycosidically-linked glycans as well as anti-Galectin-3 antibody, in order to identify their potential participation in tumor progression and its metastatic capacity to brain.

MATERIALS AND METHODS

Tissues

Human normal breast, breast cancer, and breast metastasis to brain tissues from autopsies were supplied by the Departamento de Neuropatología, INNN and Hospital General "Dr. Manuel Gea Gonzalez," and Departamento de Patología, Hospital General de México, Mexico City, Mexico. There was not match between the primary tumor cases with brain metastasis

tissues. The Ethics Surveillance Committees of the Institutions authorized the use of tissue in this evaluated research protocol. The tissue specimens were diagnosed by standard histopathological criteria. Tissues were fixed in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde and embedded in paraffin.

Lectins

Amaranthus leucocarpus seeds were obtained in Tulyehualco, Mexico, and the *A. leucocarpus* lectin (ALL) (specific for Gal β 1,3-GalNAc- α 1,0-Ser/Thr) was purified by affinity chromatography on stroma from human erythrocytes type O (17). *Machaerocereus eruca* agglutinin (MEA) (Fu α 1,2 (GalNAc α 1,3) Gal β 1,4 in complex mucin structures) was purified from cactus stems by affinity chromatography on mucin-Sepharose 4B (18). ALL and MEA were labeled with the N-hydroxysuccinimide ester of biotin from Pierce Chem. Co. (Rockford, Illinois, USA) at a label/protein ratio of 2:1 (19). Biotin-labeled *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA) (specific for Gal β 1,3GalNAc/Gal β 1,4GlcNAc), was purchased from EY Lab (St. Mateo, California, USA).

Histochemistry

Sections (5 μ m thick) were deparaffinized and re-hydrated according to conventional histological techniques. Then they were rinsed with a phosphate-saline buffer (PBS, 50 mM sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4). Unspecific binding sites were blocked by IgG-free 2% bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louis, Missouri, USA) for 30 min. Afterwards, specimens were incubated for 10 min with 0.2% Triton X-100 in PBS, rinsed with 1 mM PBS-Ca²⁺, and, then, tissue sections were incubated with biotinylated lectins (MEA and PNA, 1:100; ALL 1:200, as optimal dilutions) at 37°C in a humid-storage chamber for 2 h. Slides were rinsed twice with PBS-Ca²⁺ and incubated at 37°C with extravidin-fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma), dilution 1:60, in a dark humid-storage chamber for 1 h, the slides were sealed with VectaShield mounting medium containing DAPI (Vector Labs, Burlingame, California, USA) (20).

Immunohistochemistry

Triple labeling of slides was performed. A mouse monoclonal antibody anti-synaptophysin protein and polyclonal rabbit antibody anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, DAKO Cytomation, Denmark), both at 1:100 dilutions and a monoclonal anti-Galectin-3 (EY Labs, San Mateo, California, USA) dilution 1:200, were used to label breast cancer metastasis to brain. Antibodies labeling was recognized with isospecific secondary lissamine-rhodamine conjugated antibody and visualized in the red channel. Lectins were labeled with FITC, as described above, and visualized in the green channel. Finally, slides were counterstained with VectaShield with DAPI (Vector Labs) for nuclei staining (blue channel).

Sialidase and trypsin treatment of tissues

Slides were deparaffinized and re-hydrated similarly as described for histochemistry and rinsed with PBS. Tissues were

incubated with 2% trypsin (Gibco, Canada) in PBS at several time intervals (30 to 120 min) at 37°C in a humidified chamber. Then, tissues were washed with PBS and incubated 30 min with IgG-free 2% BSA and washed 10 min with 0.2% Triton X-100. Exhaustive rinses with PBS-CaCl₂ were made and the specimens were incubated for 2 h with biotinylated lectins at 37°C (dilution 1:100), followed by another 1 h incubation in a dark humidified chamber at 37°C with extravidin-FITC, dilution 1:60. Preparations were mounted with VectaShield-DAPI. Specimens were treated with 0.1 I.U. of *Clostridium perfringens* sialidase (Sigma) in PBS, under similar conditions as for trypsin before adding biotinylated lectins.

Specificity of lectin labeling

To determine the specificity in the interaction of lectins with tissues, control assays were performed using lectins incubated previously with 100 mM GalNAc and lactose, for ALL and PNA lectins, respectively, or phenyl beta galactose in PBS, for MEA, prior to labeling the tissues.

Fluorescence microscopy

Slides were observed through a Leica DM/LS fluorescent microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, GmbH) with 10X, 20X, 40X, 63X, and 100X objectives. Fluorochromes were visualized with their specific filters and analyzed in three channels: green for lectins, red for antibodies, and blue for nuclei. Images were captured with a Leica DFC-300FX digital camera (Leica Microsystems Digital Imaging, Coldhams Lane, Cambridge, UK) adapted to the microscope. The images were projected with a Leica IM1000 version 1.20 release-9 computer-based program (Imagic Bildverarbeitung AG, Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland).

RESULTS

Histochemistry for normal breast tissue

In normal breast tissue, ALL and PNA showed intense reactivity at the stromal region (Figure 1A and B, respectively). We observed connective acellular tissue, which was recognized by ALL (Figure 1A, D, G) although this lectin did not recognize acinar structures. Reactivity to PNA was observed in the stromal region (Figure 1D). Positive labeling was observed with PNA in all the normal breast tissues analyzed. PNA and ALL showed negative recognition of acinar structures. Normal breast showed no reactivity to MEA (Figure 1G).

Histochemistry for breast cancer tissue

Primary ductal breast cancer tissues were classified as histological grade II and III (not illustrated). All analyzed breast cancer tissues presented high-grade of intraductal component with comedo-type necrosis and were poorly differentiated. In grade II breast ductal tissues ALL was medium intensity of reactivity. Both glandular structures and stromal areas presented a homogeneous pattern of labeling. In grade III breast ductal

tissues ALL was a high intensity of reactivity. Labeling was observed mainly in the glandular region that showed connective tissue. In both grades breast cancers, we observed not reactivity at the cell nucleus (Figure 1B). PNA-positive medium intensity labeling was found mainly in periglandular structures in grade III ductal cancer. Myoepithelial cells, intraductal and stromal zones were poorly reactive in both stages (Figure 1E). In grade II ductal cancer MEA showed medium intensity both in glandular and myoepithelial zones, but a low intensity in stromal areas. Whereas, in grade III ductal cancer, MEA showed positive reactivity in glandular, stromal and myoepithelial zones in all the assessed cases (Figure 1H) (Table 1).

Histochemistry of breast metastasis to brain

Brain metastatic tumors of breast origin were found in the temporal and parietal cortices. These metastatic tumors presented nuclear cell polymorphism and nuclear atypia with prominent nucleolus and high mitotic grade. Tissues showed intense dermoplastic reaction, were poorly differentiated, and showed necrosis in almost 80% of tissues. In contrast to primary tumors, metastatic tumors showed low reactivity to ALL in stromal and myoepithelial zones (Figure 1C) whereas pseudoglandular structures were highly recognized by this lectin. Stromal areas showed similar reactivity to both lectins ALL and PNA. Myoepithelial zones showed lower reactivity to PNA than ALL. PNA and MEA showed intense reactivity in pseudoglandular structures of metastatic tumors (Figure 1F, G) (Table 1).

Immunohistochemistry

Metastatic brain tumor tissues showed a low reactivity to both anti-synaptophysin and anti-GFAP antibodies. These antibodies showed reactivity mainly in periglandular (myoepithelial cells) areas embedded within the tumoral mass. Cell nuclei showed no apoptotic data (vg. DNA fragmentation), and DAPI revealed cell nuclei polymorphism and atypia (not illustrated). We found no reactivity to Galectin-3 in normal breast tissue (Figure 2, A, D, G). In contrast, we observed a strong immunoreactivity to Galectin-3 in breast cancer metastasis to brain (Figure 2B, E, H). In these tissues, immunoreactivity to Galectin-3 was mainly observed in glandular structures. Galectin-3 immunoreactivity was observed both intracellularly and extracellularly, but we found also intranuclear reactivity (Figure 2B, E, H). In breast cancer metastasis to brain, we observed a low reactivity to Galectin-3 as compared with that found for breast cancer tissues (Figure 2 C, F, I). The strongest co-localization of Galectin-3 and lectins, in the following order, MEA, PNA, and ALL, was observed more in breast cancer tissues than in metastasis. PNA and MEA reactivity was similar, but ALL showed a periglandular localization (Figure 2 B, E, H) (Table 1).

Sialidase and trypsin treatment of tissues

Tissues from normal breast, breast cancer, and breast cancer metastasis to brain were treated with *C. perfringens* sialidase at different time intervals before histochemical determinations with lectins. After 120 min of sialidase treatment (as optimal

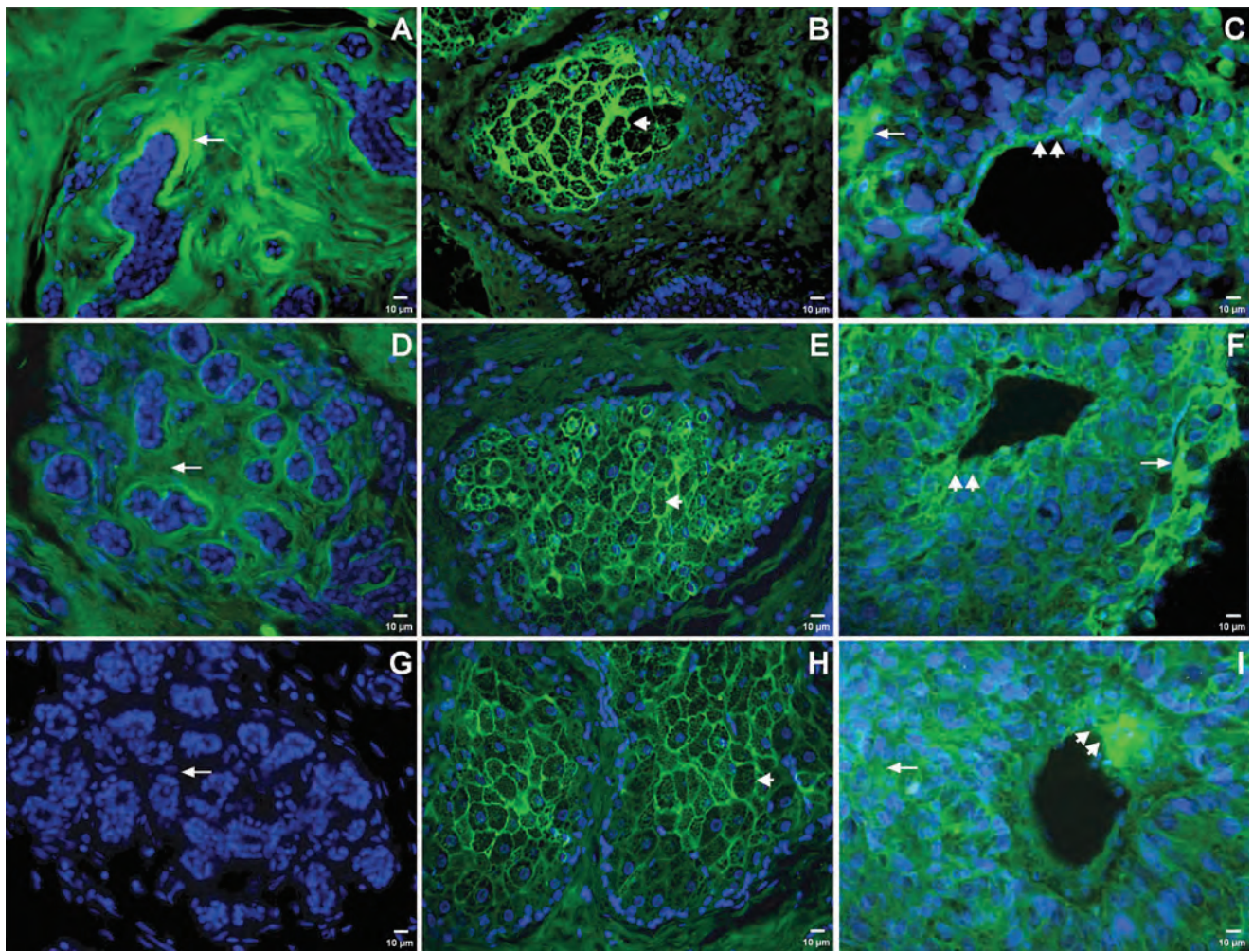


Figure 1. Normal breast tissue was reactive to ALL and PNA mainly in the stromal region (arrow). MEA was completely negative (A, D, G). Breast cancer tissue showed higher lectin reactivity in the glandular than in stromal regions (arrowhead), as compared with normal breast (B, E, H). Breast cancer metastasis to brain showed reactivity in peripheral regions (arrow) and ductal zones (double arrowheads) of these structures (C, F, I). The rest of the metastatic tissue was poorly reactive, especially for ALL (C).

Table 1. Description of lectin reactivity and Galectin-3 immunoreactivity in human tissues of normal breast, breast cancer and metastasis to brain. We compared different cellular structures to its reactivities

	ALL	PNA	MEA	Galectin-3
Normal Breast				
Glandular structures	±	+	-	-
Stromal areas	+++		-	-
Myoepithelial zones	++		-	-
Breast Cancer				
Glandular structures	+++	+	++	+++
Stromal areas	++	+	+	±
Myoepithelial zones	+++	+	++	±
Metastasis to Brain				
Pseudoglandular structures	+++	+++	+	+++
Stromal areas	+	+	++	+
Myoepithelial zones	++	+	++	+

time), increased lectin reactivity was observed with PNA and MEA in cancer samples; however, as for non-treated cancer samples, positive staining with these lectins was mainly observed in the periglandular, myoepithelial cells zone and intraductal zones (Figure 3C, D). Increased reactivity to MEA (Figure 2 E, F) was observed after sialidase treatment only in breast cancer and metastasis; low increase of reactivity was found for ALL in all analyzed tissues (Figure 3A, B). Under similar conditions, tissues from normal breast, breast cancer, and breast cancer metastasis to brain were treated with trypsin at different time intervals (not illustrated) with an optimal time of treatment of 120 min. Treatment with trypsin, increased reactivity to PNA in all tested tissues, and, as for MEA, the recognition pattern was similar in cancer and metastatic tissues although, with more intense reactivity in brain metastasis (Figure 3 I, J, K, L). As for sialidase, trypsin treatment did not reveal new positive sites to these lectins. Reactivity to ALL showed no changes until 90 min of treatment

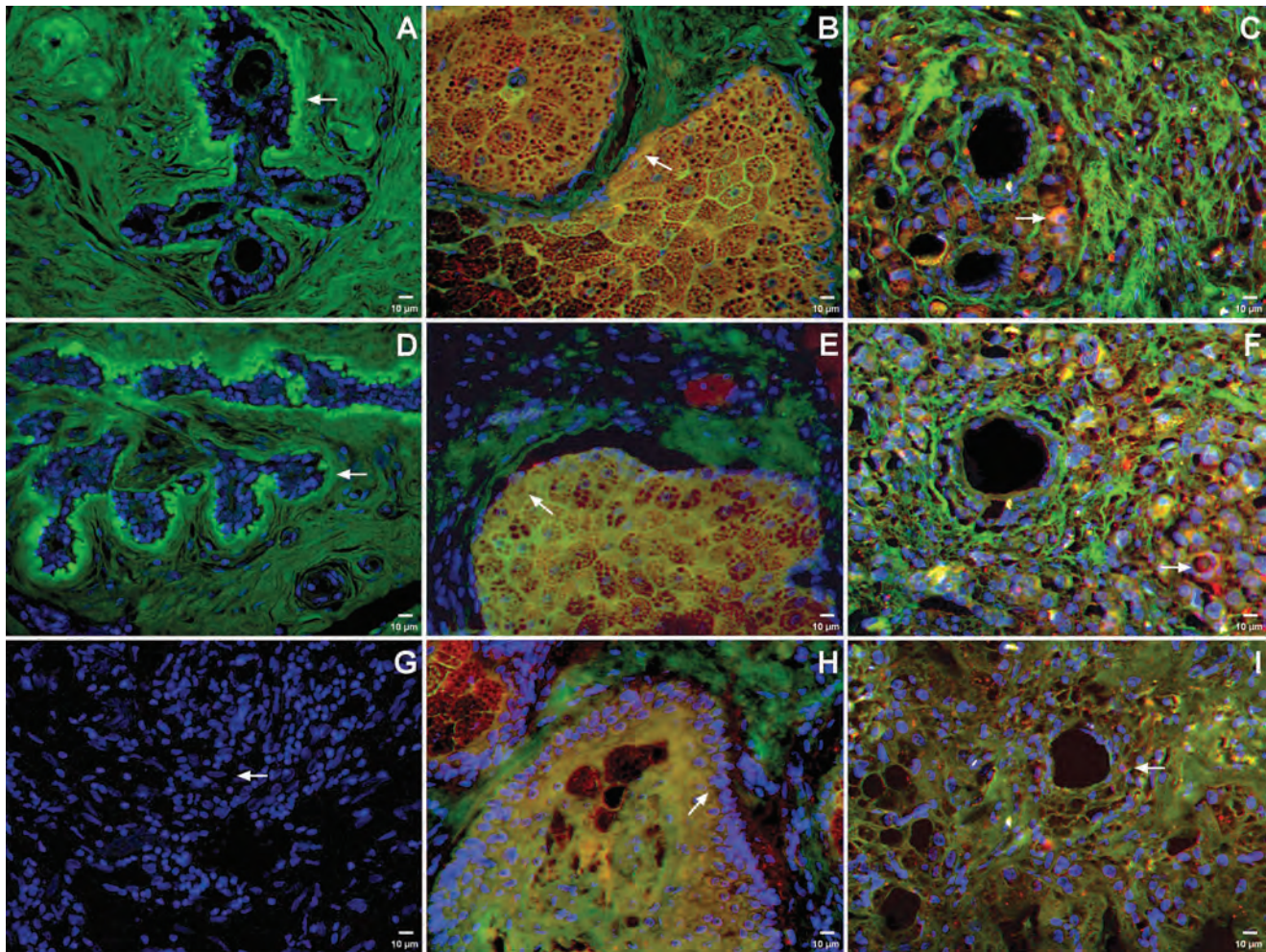


Figure 2. Galectin-3 was negative in normal breast (A, D, G) (arrows) but strongly positive in breast cancer with a complete co-localization with lectins labeling (B, E, H) (yellow color). We found lectin reactivity in glandular structures and immunoreactivity to Galectin-3 mainly in peripheral zones of glandular structures (B, E, H) (arrows). Breast cancer metastasis to brain revealed low reactivity to Galectin-3 as compared with that of breast cancer tissue, but co-localization with lectins labeling was still possible to be observed (C, F, I) (arrows).

with this protease; interestingly, after 120 min of trypsin treatment, reactivity to ALL for healthy breast tissue (not shown), as well as for breast cancer and metastasis, was abolished (Figure 3 G, H).

DISCUSSION

Breast cancer is the most common non-cutaneous cancer diagnosed and the second leading cause of cancer death in women (21). Metastases from breast cancer are often found in the lymph nodes near the breast. However, it can spread through blood vessels or lymph vessels to the bones or it can establish metastases to the liver, lungs, vulva, eye, and brain (22). Early breast cancer detection is critical for successful treatment; however, up to date, only a small set of breast tumor-associated antigens has been used for noninvasive breast cancer screening (23, 24). Malignant transformation of cells is often associated with alterations in carbohydrate antigens in tumor cells. Glycosylated

antigens have been considered potential biomarkers for breast cancer risk and disease detection. Epithelial cancer cells exhibit increased cell surface expression of mucin-type antigens with aberrant O-glycosylation (25).

In this work, we demonstrated that Galectin-3 participated in breast tumor progression and its metastasis to brain. Also using lectins with well-known sugar specificity, we compared O-linked mucin-type glycans from breast cancer and its metastasis to brain.

Breast cancer tumors showed the highest reactivity to ALL in the glandular region, whereas ALL reactivity was addressed to stromal areas in normal breast tissues (Figure 1A, B). ALL recognizes GalNAc in core I O-glycopeptides containing the disaccharide Gal β 1,3GalNAc α 1,0-Ser/Thr (T-antigen) or GalNAc α 1,0-Ser/Thr (Tn-antigen). ALL is specific for a special GalNAc-containing motif found in O-glycoproteins (26). The T and Tn antigens have been suggested to be used in early detection screening for breast cancer (27–29) and for hepatocellular

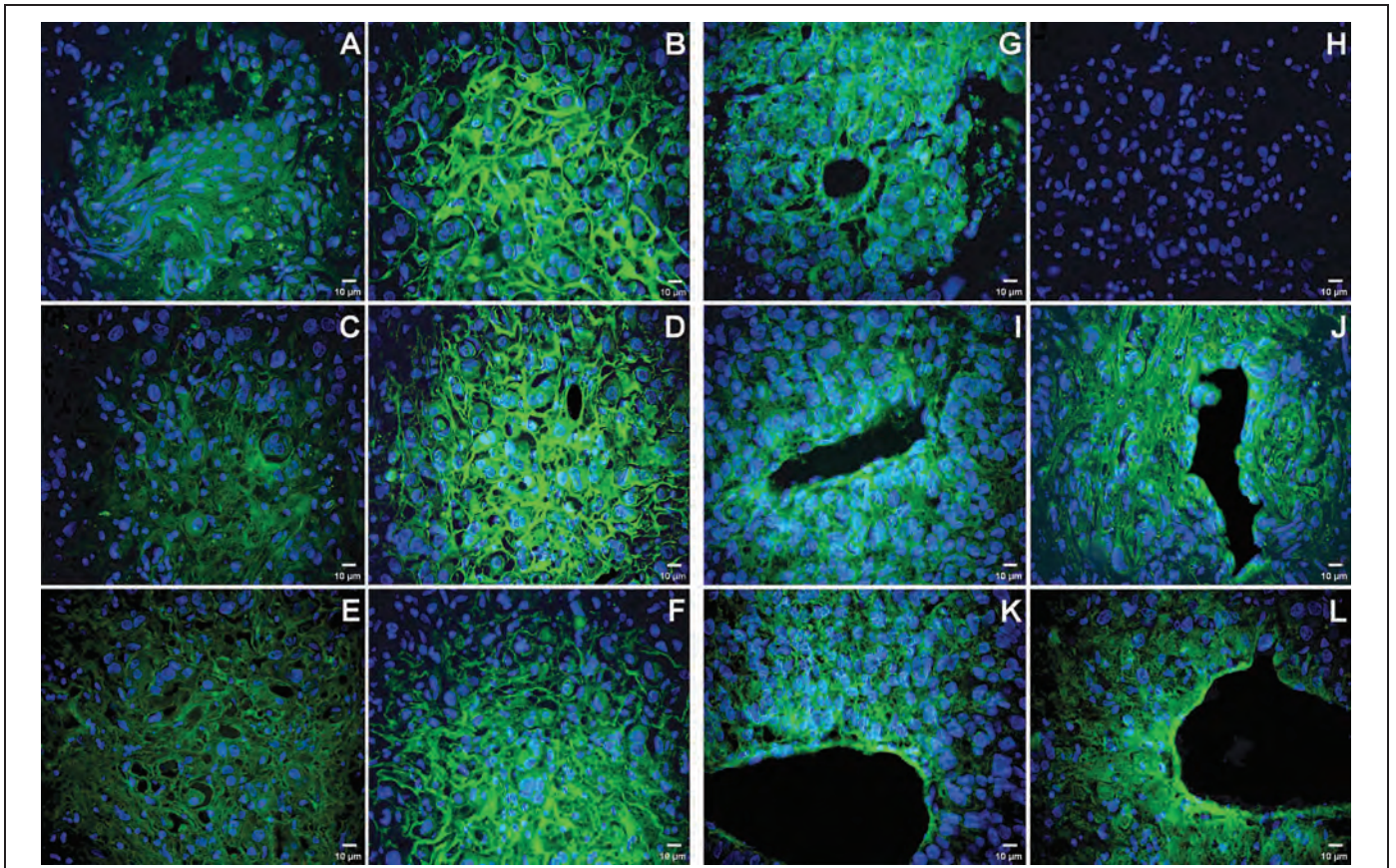


Figure 3. Both treatments at times 0 and 120 minutes are shown. Sialidase treatment increased reactivity to ALL (A, B), PNA (C, D), and MEA (E, F). Interestingly, trypsin treatment abolished reactivity to ALL (G, H) but neither to PNA (I, J) nor to MEA (K, L).

cancer (30, 31), and they have been considered to be associated with tumors with high risk to metastasize (32). In healthy individuals, these antigens have been also associated with immature cells; moreover, it has been identified that ALL⁺ cell populations possess higher resistance to apoptosis. It has been indicated that tumor expansion takes place first in glandular than in stromal regions, suggesting that O-glycosylation in glandular structures could be associated to protection against immune recognition, cell adhesion and migration, and to an increased resistance to cell death. Interestingly, lectin reactivity was increased according to the degree of malignancy.

In normal breast tissues, we observed homogeneous intense reactivity to PNA in the stromal tissue, whereas the glandular structures were poorly recognized by PNA; in breast cancer, this feature is modified since the stromal region showed lower positive reaction with PNA, and the glandular region increased its reactivity to this lectin (Figure 1D, E). PNA recognizes the hydroxyl group on C-4 of the terminal galactose in the T antigen (Gal β 1,3GalNAc) and in lactosamine (Gal β 1,4GlcNAc) residues in N-glycans and in glycolipids (33). PNA reactivity presented a correlate with the degree of malignancy.

In normal breast tissues, we observed no reactivity to MEA (Figure 1G and 2G), but it was highly expressed in breast cancer (Figure 2B, E, H). In breast cancer, reactivity to MEA was higher

than to PNA (Figures 1 and 2) in glandular zones. MEA has an extended binding site and interacts with biantennary O-glycan possessing the terminal trisaccharide Fu α 1,2 (GalNAc α 1,3) Gal β 1,4 in complex mucin structures (34); although MEA agglutinates equally well human A, B, and O erythrocytes, this lectin shows high specificity for mucin containing A+H blood groups (34). It is considered that H-antigen-related structures confer a highly malignant phenotype and metastatic potential (29, 35).

In metastatic tissues, reactivity to ALL was observed in a patched pattern mainly in glandular and ductal structures in a minor intensity in stromal regions (Figure 1C). Reactivity to PNA was heterogeneous and the highest intensity was observed in glandular structures (Figure 1F). Reactivity to MEA was observed heterogeneously mainly in glandular structures (Figure 1I). Lectin labeling in breast cancer metastasis to brain demonstrated a differential O-glycosylation pattern; hence, the possible participation of the receptor to MEA in carcinogenesis cannot be ruled out since it was not present in normal tissues.

Galectin-3 plays an important role in metastasis. Both intracellular and intranuclear, Galectin-3 exerts its function by fostering malignancy and metastatic potential. Galectin-3 recognizes terminal β -galactose residues (13, 14). Galectin-3 facilitates metastasis (12) by promoting tumor cell adhesion (11) and

invasiveness (15), as well as by antagonizing tumor cell apoptosis (16). In healthy breast tissues, immunoreactivity was not observed. In metastatic tumor tissues, we evidenced the presence of Galectin-3 (Figure 2A, D, G). The fact that lectins reactivity was co-localized with Galectin-3 only in acinar structures in primary (Figure 2B, E, H) and metastatic stages (Figure 2C, F, I) suggests the participation of Galectin-3 in tumor cell expansion in these areas. Stromal areas were not reactive to Galectin-3 but showed positive reaction with PNA and ALL. The stromal area contains fibroblasts-enriched connective tissue that supports the remainder structures, whereas acinar structures correspond to the zone of tumoral clonal expansion. These results reveal the presence of both O-glycans and Galectin-3 in acinar structures; and glycan-Galectin interaction might be one of several trigger mechanisms for tumor expansion, colonization, and metastasis.

For instance, expression of galectin-3 has been directly correlated with neoplastic potential and metastatic capacity in fibrosarcoma and melanoma cells (36) whereas Galectin-3 levels were found to be down-regulated in advanced prostate cancer (37) and colon carcinoma (38, 39), when compared with their respective normal counterparts. Similarly, reduced expression of Galectin-3 has been reported in advanced histological grades of breast cancer (40, 41). These findings conflict with *in vitro* studies using MDA-MB-435 and BT-549 breast cancer cell lines in which a direct correlation between galectin-3 expression and metastatic and invasive potential was observed (42). Inhibition of Galectin-3 in cultured breast cancer cell line is associated with “normalization” of the cellular phenotype both *in vivo* and *in vitro* and provide direct evidence that Galectin-3 plays an important role in breast cancer and may be a target for therapeutic modalities (43). Down-regulation of Galectin-3 expression resulted in a significant decrease in liver colonization ability, whereas up-regulation of Galectin-3 increased metastatic potential (44). Interestingly, Galectin-3 is re-expressed in the peripheral tumor cells as duct carcinoma *in situ* (DCIS) lesions evolve and/or progress to comedo-DCIS, the latter a precursor subtype conferring high risk for progression (45, 46).

Such localized expression of Galectin-3 in cancer cells proximal to the stroma (47) could lead to an increase in invasive potential by inducing better interactions with the stromal counterpart. These findings are in agreement with those of LeMarer and Hughes (48), who have indicated that localized increase in threshold concentrations of Galectin-3 at the invasive sites is directly correlated with invasive capacity of a cell.

Galectin-3 could allow the enhancement of interactions with stromal cells and hence greater adhesion to target organ endothelial cells. Galectin-3 is necessary to maintain and stabilize heterotypic interaction networks between EII8 and HUVEC cells. Breast epithelial-endothelial co-culture experiments suggest that Galectin-3 and its cleaved product play an important role in stabilization of epithelial-endothelial interactions. These data reinforces the importance of Galectin-3 and proteolytically cleaved Galectin-3 in stromal-epithelial interactions/angiogenesis/tumor invasion, and its utility as a marker for breast cancer progression and metastasis (49). This is particularly interesting since some data shown a correlation between

Galectin-3 expression and breast cancer progression (50) and metastasis (51). In fact, our data using histochemistry analysis are agree to previously reported results on hepatomas (52) and some kinds of lymphomas (53). Our data on increases mucin type complex identified with MEA as well as increased Galectin-3 on brain metastases, might be not exclusively linked to brain metastasis. We suggest the possibility that metastatic tumor could be identified as MEA⁺/Galectin-3⁺ like a general process in metastasis to other tissues such as lung, bone, liver, kidney or endothelial cells (54), it could not be ruled out and must be proved in future research. Furthermore, we considering that it is necessary to address research studies on primary breast tumors and metastatic tissues coming both from the same patient, in order to better delineate the process of brain metastasis arising from breast cancer.

Considering all our results showed in this work we strongly suggest that Galectin-3, its coupling with O-glycans of the mucin-type, and their interaction might facilitate tumor cells for a successful metastasis. This might reflect the complex architecture and function of mucin structures (55, 56). Finally, the differences in O-glycosylation patterns related with breast cancer and metastasis might result in an upregulation of specific GalNAc-transferases and Galectin-3, indicating that evaluation of these transferases and Galectin-3 receptors represent an alternative new tool in the diagnosis of breast metastasis to brain.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors also want to thank to Dr. Daniel Rembao from the Departamento de Neuropatología, INNN, for providing the diagnosis and some of the tissue samples from the Pathology Archive. This work is dedicated to the loving memory of Dr. José Luis Ochoa, deceased on 22nd November, 2007.

LIST OF ABBREVIATIONS

ALL = *Amaranthus leucocarpus* lectin
 BSA = Bovine serum albumin
 Ca²⁺ = Calcium
 CaCl₂ = Calcium chloride
 DAPI = 4',6-diamyidine-2-phenylindole
 FITC = Fluorescein Isothiocyanate
 Gal = Galactose
 GalNAc = N-Acetylgalactosamine
 GFAP = Glial fibrillary acidic protein
 GlcNAc = N-Acetylglucosamine
 INNN = Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
 MeA = *Machaerocereus eruca* agglutinin
 NaCl = Sodium chloride
 PBS = Phosphate buffer saline
 PNA = *Arachis hypogaea* agglutinin
 Ser = Serine
 T-antigen = Thomsen-Friedenreich antigen, disaccharide
 Galβ1,3GalNAc
 Thr = Threonine

Tn-antigen = Monosaccharide GalNAc α 1,0-Ser/Thr
 UDP-GalNAc:polypeptide = Uridil-diphosphate GalNAc-
 transferase

REFERENCES

- Hakomori, S. Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *PNAS* **2002**, *99*, 10231–10233.
- Couldrey, C.; Green, J.E. Metastases: the glycan connection. *Breast Cancer Res* **2000**, *2*, 321–323.
- Springer, G.F.; Desai, P.R.; Ghazizadeh, M.; Tegmeyer, H. T/Tn pancarcinoma autoantigens: fundamental, diagnostic and prognostic aspects. *Cancer Detect Prev* **1995**, *19*, 173–182.
- Springer, G.F. T and Tn pancarcinoma markers: autoantigenic adhesion molecules in pathogenesis, prebiopsy carcinoma-detection, and long-term breast carcinoma immunotherapy. *Crit Rev Oncogen* **1995**, *6*, 57–85.
- Van den Steen, P.; Rudd, P.M.; Dwek, R.A.; Openakker, G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **1998**, *33*, 151–208.
- Martensson, S.; Levery, S.B.; Fang, T.T.; Bendiak, B. Neutral core oligosaccharides of bovine submaxillary mucin: use of lead tetraacetate in the cold for establishing branch positions. *Eur J Biochem* **1998**, *258*, 603–622.
- Fonseca, I.; Costa Rosa, J.; Felix, A. Therkildsen, M.H.; Soares, J. Simple mucin-type carbohydrate antigens (T, Tn, and sialosyl-Tn) in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Histopathol* **1994**, *25*, 537–543.
- Cao, Y.; Stosiek, P.; Springer, G.F.; Karsten, U. Thomsen Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochem. Cell Biol* **1996**, *106*, 197–207.
- Glinsky, V.V.; Huflejt, M.E.; Glinsky, G.V.; Deutscher, S.L.; Quinn, T.P. Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on β -galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells. *Cancer Res* **2000**, *60*, 2584–2588.
- Lis, H.; Sharon, N. Lectins as molecules and as tools. *Ann Rev Biochem* **1986**, *55*, 35–67.
- Raz, A.; Lotan, R. Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **1987**, *6*, 433–452.
- Zou, J.; Glinsky, V.V.; Landon, L.A.; Matthews, L.; Deutscher, S.L. Peptides specific to the Galectin-3 carbohydrate recognition domain inhibit metastasis-associated cancer cell adhesion. *Carcinogen* **2005**, *26*, 309–318.
- Shigeoka, H.; Karsten, U.; Okuno, K.; Yasutomi, M. Inhibition of liver metastases from neuraminidase-treated colon 26 cells by an anti-Thomsen-Friedenreich-specific monoclonal antibody. *Tumour Biol* **1999**, *20*, 139–146.
- Takenaka, Y.; Fukumori, T.; Raz, A. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J* **2004**, *19*, 453–459.
- Le Marer, N.; Hughes, R.C. Effects of the carbohydrate-binding protein Galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. *J Cell Physiol* **1996**, *168*, 51–58.
- Matarrese, P.; Fusco, O.; Tinari, N.; Natoli, C.; Ciu, F.T.; Semeraro, M.L.; et al. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int J Cancer* **2000**, *85*, 545–554.
- Zenteno, E.; Ochoa, J.L. Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. *Phytochem* **1988**, *27*, 313–317.
- Zenteno, E.; Debray, H.; Montreuil, J. Purification and partial characterization of two lectins from the cactus *Machaerocereus eruca*. *FEBS Letters* **1988**, *238*, 95–100.
- Savage, D.; Mattson, G.; Desai, S.; Nielander, G.; Morgensen, S.; Conklin, E. eds. *Avidin-biotin chemistry: A handbook*. Ed. Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA. 1992.
- Guevara, J.; Espinosa, B.; Zenteno, E.; Vasquez, L.; Luna, J.; Perry, G.; Mena, R. Altered glycosylation pattern in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **1998**, *57*, 905–914.
- American Cancer Society: *Cancer Facts and Figures 2007*. Atlanta, GA: American Cancer Society. 2007.
- Steeg, P.S. Molecular biology of breast cancer metastasis 'Has it spread?': disarming one of the most terrifying questions. *Breast Cancer Res* **2000**, *2*, 396–399.
- Hsiung, R.; Zhu, W.; Klein, G.; Qin, W.; Rosenberg, A.; Park, P. et al. High basic fibroblast growth factors levels in nipple aspirate fluid are correlated with breast cancer. *Cancer J* **2002**, *8*, 303–310.
- Foretova, L.; Garber, J.E.; Sadowsky, N.L.; Verselis, S.J.; Joseph, D.M. Andrade, A.F.F. et al. Carcinoembryonic antigen in breast nipple aspirate fluid. *Cancer Epidem Biom Prev* **1998**, *7*, 195–198.
- Kumar, S.R.; Sauter, E.R.; Quinn, T.P.; Deutscher, S.L. Thomsen-Friedenreich and Tn antigens in nipple fluid: carbohydrate biomarkers for breast cancer detection. *Clin Cancer Res* **2005**, *11*, 6868–6871.
- Hernandez, P.; Tetaert, D.; Vergoten, G.; Debray, H.; del Carmen Jimenez, M.; Fernandez, G.; Agundis, C.; et al. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin for O-glycopeptides. *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1674*, 282–290.
- Yuan, M.; Itzkowitz, S.H.; Boland, C.R.; Kim, Y.D.; Tomita, J.T.; Palekar, A.; et al. Comparison of T-antigen expression in normal, premalignant, and malignant human colonic tissue using lectin and antibody immunohistochemistry. *Cancer Res* **1986**, *46*, 4841–4847.
- Irazoqui, F.J.; Jansson, B.; Lopez, P.H.H.; Nores, G.A. Correlative fine specificity of several Thomsen-Friedenreich disaccharide-binding proteins with an effect on tumor cell proliferation. *J Biochem* **2001**, *130*, 33–37.
- Wang, B.L.; Springer, G.F.; Carlstedt, S.C. Quantitative computerized image analysis of Tn and T (Thomsen-Friedenreich) epitopes in prognostication of human breast carcinoma. *J Histochem Cytochem* **1997**, *45*, 1393–1400.
- Baldus, S.E.; Zirbes, T.K.; Hanisch, F.G.; Kunze, D.; Shafizadeh, S.T.; Nolden, S. et al. Thomsen-Friedenreich antigen presents as a prognostic factor in colorectal carcinoma. A clinicopathologic study of 264 patients. *Cancer* **2000**, *88*, 1536–1543.
- Cao, Y.; Karsten, U.; Otto, G.; Bannasch, P. Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich antigen, Tn, sialosyl-Tn, and alpha 2,6-linked sialic acid in hepatocellular carcinomas and preneoplastic hepatocellular lesions. *Virchows Archiv* **1999**, *434*, 503–509.
- Schindlbeck, C.; Jeschke, U.; Schulze, S.; Karsten, U.; Janni, W.; Rack, B. et al. Prognostic impact of Thomsen-Friedenreich tumor antigen and disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **2007**, *101*, 17–25.
- Lotan, R.; Skutelsky, E.; Danon, D.; Sharon, N. The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* **1975**, *250*, 8518–8523.
- Zenteno, E.; Vazquez, L.; Chavez, R.; Cordoba, F.; Wieruszkeski, J.M.; Montreuil, J.; Debray, H. Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for oligosaccharides from porcine stomach mucin. *Glycoconj J* **1995**, *12*, 699–706.
- Laferte, S.; Chan, N.W.; Sujino, K.; Lowary, T.L.; Palcic, M.M. Intracellular inhibition of blood group A glycosyltransferase. *Eur J Biochem* **2000**, *267*, 4840–4849.
- Meromzky, L.; Lotan, R.; Raz, A. Implications of endogenous tumor cell surface lectins as mediators of cellular interactions and lung colonization. *Cancer Res* **1986**, *46*, 5270–5275.
- Pacis, R.A.; Pilat, M.J.; Pienta, K.J.; Wojno, K.; Raz, A.; Hogan, V.; Cooper, C.R. Decreased galectin-3 expression in prostate cancer. *Prostate* **2000**, *44*, 118–123.

38. Lotz, M.M.; Andrews Jr., C.W.; Korzelius, C.A.; Lee, E.C.; Steele Jr., G.D.; Clarke, A.; Mercurio, A.M. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *PNAS* **1993**, *90*, 3466–3470.
39. Castronovo, V.; Campo, E.; van den Brule, F.A.; Claysmith, A.P.; Cioce, V.; Liu, F.T.; Fernandez, P.L.; Sobel, M.E. Inverse modulation of steady-state messenger RNA levels of two non-integrin laminin-binding proteins in human colon carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **1992**, *84*, 1161–1169.
40. Castronovo, V.; van den Brule, F.A.; Jackers, P.; Clause, N.; Liu, F.T.; Gillet, C.; Sobel, M.E. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol* **1996**, *179*, 43–48.
41. Idikio, H. Galectin-3 expression in human breast carcinoma: correlation with cancer histologic grade. *Int J Oncol* **1998**, *12*, 1287–1290.
42. Nangia-Makker, P.; Thompson, E.; Hogan, C.; Ochieng, J.; Raz, A. Induction of tumorigenicity by galectin-3 in a non-tumorigenic human breast carcinoma cell-line. *Int J Oncol* **1995**, *7*, 1079–1087.
43. Honjo, Y.; Nangia-Makker, P.; Inohara, H.; Raz, A. Down regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **2001**, *7*, 661–668.
44. Bresalier, R.S.; Mazurek, N.; Sternberg, L.R.; Byrd, J.C.; Yunker, C.K.; Nangia-Makker, P.; Raz, A. Metastasis of human colon cancer is altered by modifying expression of the β -galactose-binding protein galectin-3. *Gastroenterology* **1998**, *115*, 287–296.
45. Meyer, J.S. Cell kinetics of histologic variants of in situ breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* **1986**, *7*, 171–180.
46. Lagios, M.D.; Westdahl, P.R.; Margolin, F.R.; Rose, M.R. Duct carcinoma in situ. Relationship of extent of noninvasive disease to the frequency of occult invasion, multicentricity, lymph node metastases, and short-term treatment failures. *Cancer* **1982**, *50*, 1309–1314.
47. Nangia-Makker, P.; Sarvis, R.; Visscher, D.W.; Bailey-Penrod, J.; Raz, A.; Sarkar, F.H. Galectin-3 and L1 retrotransposons in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* **1998**, *49*, 171–183.
48. Le Marer, N.; Hughes, R.C. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. *J Cell Physiol* **1996**, *168*, 51–58.
49. Shekhar, M.P.V.; Nangia-Makker, P.; Tait, L.; Miller, F.; Raz, A. Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial-endothelial interactions. *Am J Pathol* **2004**, *165*, 1931–1941.
50. Baptiste, T.A.; James, A.; Saria, M.; Ochieng, J. Mechano-transduction mediated secretion and uptake of galectin-3 in breast carcinoma cells: implications in the extracellular functions of the lectin. *Exp Cell Res* **2007**, *313*, 652–664.
51. Song, Y.K.; Billiar, T.R.; Lee, Y.J. Role of galectin-3 in breast cancer metastasis. Involvement of Nitric Oxide. *Am J Pathol* **2002**, *160*, 1069–1075.
52. Hsu, D.K.; Dowling, C.A.; Jeng, K.C.; Chen, J.T.; Yang, R.Y.; Liu, F.T. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **1999**, *17*, 519–526.
53. Hoyer, K.K.; Pang, M.; Gui, D.; Shintaku, I.P.; Kuwabara, I.; Liu, F.T.; Said, J.W.; Baum, L.G.; Teitell, M.A. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* **2004**, *164*, 893–902.
54. Glinsky, V.V.; Glinsky, G.V.; Rittenhouse-Olson, K.; Huflejt, M.E.; Glinskii, O.V.; Deutscher, S.L.; Quinn, T.P. The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium. *Cancer Res* **2001**, *61*, 4851–4857.
55. Hanisch, F.G. O-glycosylation of the mucin-type. *Biol Chem* **2001**, *382*, 143–149.
56. Pratt, M.R.; Hang, H.C.; Ten Hagen, K.G.; Rarick, J.; Gerken, T.A.; Tazbak, L.A.; Berotozzi, C.R. Deconvoluting the functions of polypeptide N-alpha-acetylgalactosaminyltransferase family members by glycopeptide substrate profiling. *Chem Biol* **2004**, *11*, 1009–1116.

Tumor Biology

Expression of PSA-NCAM and O-acetylsialic acid in human ductal breast brain metastasis

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	TUBI-D-13-00176
Full Title:	Expression of PSA-NCAM and O-acetylsialic acid in human ductal breast brain metastasis
Short Title:	PSA-NCAM and O-Acetylsialic acid in brain metastasis
Article Type:	Research Article
Corresponding Author:	Jorge Guevara, PhD MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Miguel Mayoral-Chavez, MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Miguel Mayoral-Chavez, MSc
	Daniel Rembao, PhD
	Abelardo Meneses, PhD
	Lorena Vazquez, PhD
	Edgar Zenteno, PhD
	Jorge Guevara, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Alterations in membrane cell glycosylation seem to be the hallmark of malignant transformation. By histochemistry, using sialic acid (SA)-specific lectins and polysialic acid (PSA) antibodies, we evaluated SA expression in primary breast adenocarcinoma tissues and in brain metastasis. Our results indicated that in healthy tissues, epithelial glycoconjugates showed higher interaction with Maackia amurensis agglutinin (MAA, specific for SA 2,3), than Sambucus nigra agglutinin (SNA, SA 2,6) that interacts mainly with connective tissue and Macrobrachium rosenbergii lectin (MRL, O-acetylSA) showed no recognition. In ductal breast tumors, MAA and MRL recognized glandular structures; whereas, SNA showed increased recognition of the periglandular and glandular structures. In metastasis was identified higher reactivity of pseudoglandular structures by MAA and MRL, than by SNA. PSA antibodies showed high immunoreactivity in pseudoglandular-like structures exclusively in brain metastasis. After trypsin or sialidase treatment of all tissues, reactivity of the lectin and PSA antibodies was abolished in tumor and metastasis cells. Our results showed increased expression of O-acetylated SA and PSA in brain metastasis that seems to be associated to malignant potential in tumor cells.
Suggested Reviewers:	Gerardo Vasta, PhD Researcher, Center of Marine Biotechnology, University of Maryland Biotechnology Institute vasta@umbi.umd.edu Because Dr. Vasta is an expert in the field of glycosylation
	Henri DEBRAY, PhD

	<p>Researcher, Laboratoire de Chimie Biologique, Bât C9, U.S.T.L. 59655 Villeneuve d Ascq, CEDEX France Henri.Debray@univ-lille1.fr Because Dr. Debray is an expert in the field of glycobiology and cancer</p>
	<p>Tony Lefebvre , PhD Researcher, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris. Tony.Lefebvre@univ-lille1.fr Because Dr. Tony has investigated O-glycosylation</p>
	<p>Sergio Estrada , PhD Researcher, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N iestrada@encb.ipn.mx Dr. Sergio is an expert in cancer</p>
Opposed Reviewers:	

Expression of PSA-NCAM and O-acetylsialic acid in human ductal breast brain metastasis

Miguel Mayoral^{1,2}, Daniel Rembao³, Abelardo Meneses⁴, Lorena Vazquez⁵, Edgar Zenteno¹, Jorge Guevara¹.

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, C.P. 04510, Mexico.

² Centro de Investigación en Ciencias Médicas y Biológicas, Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, C.P. 68000, México.

³ Departamento de Neuropatología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), C.P. 14269, México.

⁴ Departamento of Patología, Instituto Nacional de Cancerología, C.P. 14080, México.

⁵ Laboratorio de lectinas CIQ, Universidad Autónoma de Morelos, Cuernavaca Morelos, C.P. 60225, México.

Corresponding author: Jorge Guevara, PhD.
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México.
Col. Copilco. 04510 México D.F.
Email: jguevara@laguna.fmedic.unam.mx

Abstract

Alterations in membrane cell glycosylation seem to be the hallmark of malignant transformation. By histochemistry, using sialic acid (SA)-specific lectins and polysialic acid (PSA) antibodies, we evaluated SA expression in primary breast adenocarcinoma tissues and in brain metastasis. Our results indicated that in healthy tissues, epithelial glycoconjugates showed higher interaction with *Maackia amurensis* agglutinin (MAA, specific for SA α 2,3), than *Sambucus nigra* agglutinin (SNA, SA α 2,6) that interacts mainly with connective tissue and *Macrobrachium rosenbergii* lectin (MRL, O-acetylSA) showed no recognition. In ductal breast tumors, MAA and MRL recognized glandular structures; whereas, SNA showed increased recognition of the periglandular and glandular structures. In metastasis was identified higher reactivity of pseudoglandular structures by MAA and MRL, than by SNA. PSA antibodies showed high immunoreactivity in pseudoglandular-like structures exclusively in brain metastasis. After trypsin or sialidase treatment of all tissues, reactivity of the lectin and PSA antibodies was abolished in tumor and metastasis cells. Our results showed increased expression of O-acetylated SA and PSA in brain metastasis that seems to be associated to malignant potential in tumor cells.

Key words: sialic; metastasis; brain; glycosylation