

Determinación del perfil de glicosilación de los glicoconjugados de membrana de la línea celular A427 de adenocarcinoma pulmonar humano mediante el uso de lectinas

José Antonio Serrato,* ✉ Ricardo Lascurain,[‡] David García-Herrera,[§] Patricia Gorocica Rosete*

*Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas; [‡]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM; [§]Hospital Psiquiátrico Dr. Samuel Ramírez Moreno.
Trabajo recibido: 05-VIII-2011; aceptado: 27-X-2011

RESUMEN. Gracias a los avances recientes en el área de la glicobiología, los glicanos presentes en los glicoconjugados de la superficie celular han adquirido potencial como biomarcadores para el diagnóstico específico y oportuno del cáncer pulmonar. Sin embargo, la ubicuidad inherente a los glicanos celulares dificulta en gran medida la identificación de estructuras sacarídicas específicas de células tumorales. El uso de líneas celulares es una estrategia que ayuda en el proceso de identificación de estructuras sacarídicas específicas cuando se desea desarrollar un método de diagnóstico. En el presente estudio se determinó, mediante el uso de lectinas, el perfil de glicosilación de los glicoconjugados de la línea celular A427 de adenocarcinoma pulmonar humano con la finalidad de identificar oligosacáridos que se expresan abundantemente en la membrana celular. Se utilizaron nueve lectinas para la identificación de estructuras de N- y O-oligosacáridos específicos. El análisis del perfil de glicosilación mostró mayor abundancia relativa de moléculas del tipo **Sialil-Tn**, estructuras de **lactosamina** y O-glicanos cortos como el antígeno **T**, en comparación con los N-glicanos de tipo complejo, híbridos y de alta manosa. Los resultados del presente estudio sugieren que dichas moléculas pueden constituir marcadores potenciales de adenocarcinoma pulmonar.

Palabras clave: Lectinas, N-glicosilación, O-glicosilación, cáncer pulmonar, A427, oligosacárido, Cell-ELISA, biomarcador.

ABSTRACT. Due to recent advances in glycobiology, cell surface glycoconjugate molecules have arisen as potential biomarkers for the early and specific lung cancer diagnosis. However, the inherent ubiquity of cellular glycans makes difficult the identification of tumor specific saccharidic structures. The use of cell lines is an approach that helps to identify tumor-related saccharidic structures for the development of a diagnostic method. Our objective was to evaluate the glycosylation profile on cell membrane glycoconjugates of the human lung adenocarcinoma cell line A427. The identification of specific N- and O-glycan structures was carried out by the use of nine different lectins. Glycosylation profile analysis showed an increase in the relative abundance of sialylated structures, specifically **Sialyl-Tn** glycans, as well as **lactosamine** and short O-glycans like T-antigen in comparison with complex, hybrid and high mannose type N-glycans. Our data suggest these structures are well candidate molecules to search for glycans specific of lung adenocarcinoma.

Key words: Lectin, N- and O-glycosylation, lung cancer, A427 cell line, oligosaccharide, cell-ELISA, biomarker.

INTRODUCCIÓN

En los últimos diez años ha habido avances muy significativos en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el cáncer de pulmón continúa siendo la principal causa de muerte debida a cáncer, y el pronóstico sigue siendo aún muy bajo, en el mejor de los casos solamente el 15% de los pacientes alcanzará el índice de supervivencia de 5 años.^{1,2} Dadas las características particulares de dicha patología, la experiencia acumulada muestra que el

diagnóstico temprano es la única forma para conseguir incrementar la supervivencia de los enfermos que padecen esta enfermedad.³

Entre los principales cambios estructurales que ocurren en las células durante su transformación neoplásica se presentan alteraciones en el patrón de glicosilación de los glicoconjugados (glicoproteínas, proteoglicanos y glicolípidos) de la superficie celular.^{4,5} Dichas alteraciones comprenden desde una síntesis incompleta del oligosacárido (con lo cual la función de la molécula se modifica)

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/neumologia>

o su sobreexpresión, hasta la aparición de nuevas estructuras que en condiciones normales no existen.^{6,7} Gracias a los avances recientes en el área de la glicobiología y especialmente en el desarrollo de metodologías para la identificación de estructuras de glicanos, los oligosacáridos presentes en los glicoconjugados de la superficie de las células se pueden utilizar como biomarcadores específicos para la identificación del cáncer.⁸⁻¹⁰ Debido a que los cambios en la glicosilación se presentan antes de que los cambios morfológicos o fisiológicos sean evidentes durante la transformación neoplásica, la identificación y caracterización de dichas estructuras tiene gran potencial para llevar a cabo un diagnóstico oportuno.^{11,12}

En virtud de que la gran mayoría de estructuras de glicanos se comparten entre tejidos, tipos celulares, o se expresan bajo estados fisiológicos que no necesariamente están relacionados con un proceso de transformación neoplásica, muy pocas estructuras de oligosacáridos llegan a ser consideradas como un marcador tumoral específico de una patología.^{5,13} Con base en lo anterior, la determinación del patrón de glicosilación en líneas celulares es una estrategia que facilita la identificación de biomarcadores específicos de una patología que puedan ser utilizados para la implementación de un método diagnóstico. La línea celular A427, de origen epitelial, proveniente de cáncer pulmonar humano,¹⁴ ha sido ampliamente utilizada para el estudio *in vitro* de múltiples aspectos de la patología.¹⁵ Por lo tanto, la línea A427 representa un excelente modelo biológico para la caracterización del perfil de glicosilación de células de cáncer pulmonar humano y la identificación de las estructuras de glicanos que se expresan de manera abundante y/o característica en la patología.

La multitud de estructuras de oligosacáridos presentes en los glicoconjugados de la superficie celular, en su conjunto, proporcionan un perfil de glicosilación característico que puede ser caracterizado mediante el uso de lectinas. Las lectinas son proteínas con capacidad para reconocer estructuras específicas de oligosacáridos.¹⁶ Lo anterior, las convierte en una herramienta útil para caracterizar el perfil de glicosilación de los glicanos de membrana de cualquier línea celular, así como para la identificación de alteraciones en dicho patrón ante modificaciones del medio ambiente extracelular o durante la transformación neoplásica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Orto-fenilendiamina, 3,3' diaminobencidina, estreptavidina-peroxidasa, ácido clorhídrico, periodato de sodio, dimetilsulfóxido, suero fetal bovino (SFB), Tween-20,

glicerol, albúmina sérica bovina (BSA) y tripsina fueron obtenidos de Sigma Co. (St. Louis Mo, USA). Peróxido de hidrógeno, sulfato de sodio, sulfato de potasio y p-formaldehído fueron obtenidos de Merck Inc. (West Point, PA, USA). Medio esencial mínimo (MEM) y medio Dulbecco modificado (DMEM) fueron de *in vitro* (Madison WI, USA). El N-hidroxisucínimido-biotina (NHS-Biotina) se obtuvo de Pierce Chemical Co. (Rockfor, IL, USA).

Lectinas

Se utilizaron nueve lectinas, la tabla 1 muestra una descripción detallada con sus abreviaturas y el tipo específico de estructuras de oligosacárido que reconocen. Brevemente, **Con A** y **LCA** son lectinas que reconocen estructuras de N-glicanos de tipo complejo, híbrido y de alta manosa; las lectinas **MAA**, **LPA**, **SNA** y **WGA** reconocen estructuras de N- y O-glicanos con ácido siálico terminal; **WGA** tiene, además, la capacidad de reconocer estructuras de **lactosamina** y **SNA** al antígeno **Sialil-Tn**. Finalmente **ALL**, **PNA** y **ABA** son lectinas que reconocen específicamente los antígenos O-glicosilados **T** y **Tn**. Ocho de las lectinas fueron adquiridas de Sigma (St. Louis Mo, USA) y la lectina de *Amaranthus leucocarpus* **ALL** fue donada por el Dr. Edgar Zenteno (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM). Todas las lectinas fueron previamente conjugadas a biotina de acuerdo a la técnica descrita por Savage *et ál.*¹⁷ y tituladas con la finalidad de utilizar la cantidad apropiada de lectina conjugada en los ensayos de Cell-ELISA.

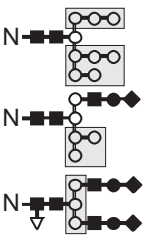
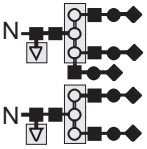






Línea celular y condiciones de cultivo

Para la realización del presente estudio empleamos la línea celular A427 de adenocarcinoma pulmonar humano (ATCC Núm. HTB-53). Las células fueron cultivadas en condiciones de esterilidad en frascos estáticos de cultivo celular de 25 cm² de área de contacto (Corning, Foster, CA, USA). Se empleó medio de cultivo esencial mínimo suplementado con suero fetal bovino al 10% (MEM-10% SFB), 100 UL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin (*in vitro*, Madison, WI, USA). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda.

Determinación de los oligosacáridos en la membrana celular de A427 por medio de Cell-ELISA

Con la finalidad de identificar los oligosacáridos presentes en la superficie celular de A427, fue adaptada la técnica convencional de ELISA para realizar el ensayo denominado Cell-ELISA. Este tipo de ELISA es directo, pero en lugar de utilizar macromoléculas utiliza células fijadas a la superficie de la placa; dicho procedimiento

Tabla 1. Estructuras de los oligosacáridos reconocidos por las lectinas utilizadas.

Nombre	Abr.	Reconoce	Estructura
<i>Canavalia ensiformis</i> lectin (Concanavalin A)	Con A	N-glicanos Manosa	
<i>Lens culinaris</i> Agglutinin (Lentil lectin)	LCA	N-glicanos Fucosa con manosa	
<i>Maackia amurensis</i> Agglutinin	MAA	Ácido siálico	
<i>Limulus polyphemus</i> Agglutinin	LPA	Ácido siálico	Muchos N y O-glicanos
<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin	SNA	Sialil Tn Ácido siálico	
<i>Triticum vulgare</i> Agglutinin	WGA	Poli-lactosamina Ácido siálico	 Muchos N y O-glicanos
<i>Amaranthus leucocarpus</i> Lectin	ALL	O-glicanos Antígeno T Antígeno Tn	
<i>Arachis hypogaea</i> Agglutinin (Peanut Agglutinin)	PNA	O-glicanos Antígeno T	
* <i>Agaricus bisporus</i> Agglutinin	ABA	O-glicanos Antígeno T	

■, N-Acetilglucosamina; □, N-Acetilgalactosamina; O, manosa; ●, galactosa; ◆, ácido siálico; y ▽, fucosa. * De acuerdo con Irazoqui, **ABA** posee una unión muy particular por el antígeno T, lo que la diferencia especialmente de otras lectinas como jacalina y **PNA**.³³

ya ha sido empleado con anterioridad para diferentes aplicaciones.^{18,19}

Las células en cultivo se despegaron de la superficie de los frascos mediante incubación con 1 mL de solución de tripsina/EDTA (0.25/0.05%) por 5 min. Se lavaron dos veces con medio MEM sin suero, se centrifugaron a 1,200 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante. El botón celular fue resuspendido en medio MEM sin suero a una concentración celular de 1 x 10⁷ células/mL. Luego se colocaron 1 x 10⁴ células por pozo en 100 μL de

medio MEM-10% SFB en una placa de poliestireno para ELISA de 96 pozos con fondo plano (NUNC, Rochester, NY, USA). La placa se incubó a 37 °C con 5% de CO₂ en atmósfera húmeda durante 24 h para obtener una monocapa confluyente de células. Se eliminó el medio de cultivo y cada pozo fue lavado suavemente 3 veces con PBS (del inglés *phosphate buffered saline*) pH 7.2 a 37 °C, cuidando de no desprender las células.

Se procedió a fijar las células con acetona al 30% en PBS pH 7.2 durante 12 h a 4 °C. Posteriormente,

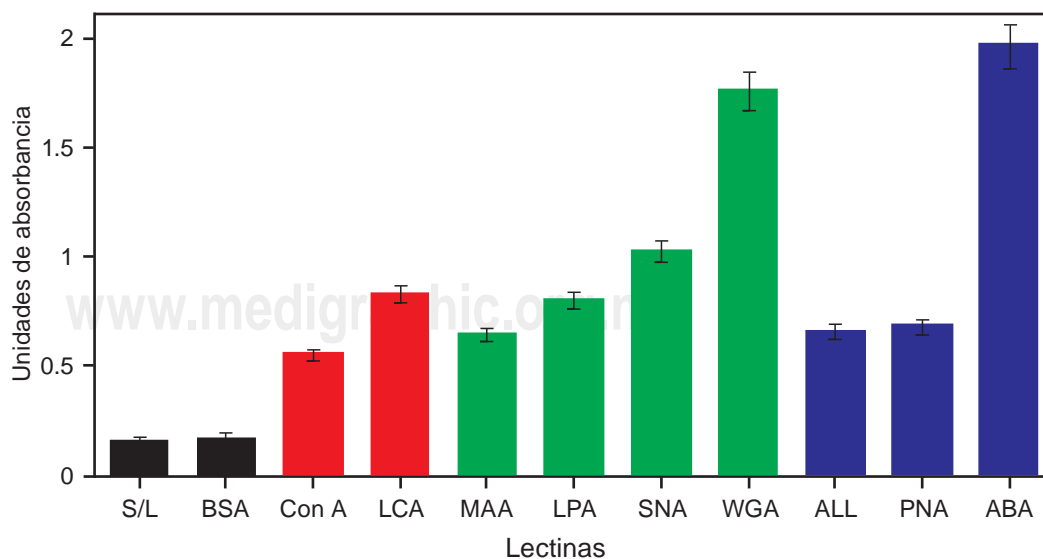
cada pozo se lavó suavemente de 3 a 4 veces con PBS-Tween 20 al 0.01% (PBS-Tween) para eliminar la solución fijadora. Se procedió entonces a bloquear la peroxidasa endógena de las células con 50 mL de una solución de H₂O₂ al 0.3% en PBS durante 20 min a 37 °C. Se lavó la placa de 2 a 3 veces con PBS-Tween. Con la finalidad de cubrir los sitios de la placa no ocupados por las células, las placas de ELISA fueron incubadas con una solución al 5% de leche descremada en PBS durante 1 h a 37 °C (100 μL/pozo). Posteriormente, fueron lavadas las placas 2 veces con PBS-Tween y una tercera con PBS únicamente. Finalmente, se adicionó por columnas (de la 1 a la 9) con 5 repeticiones (de A a E), 100 μL/pozo de la correspondiente lectina conjugada a biotina. Las columnas 10 y 11 se utilizaron para el blanco y control negativo (BSA). Las placas se incubaron por 1 h a temperatura ambiente y lavadas suavemente 4 veces por 5 min con PBS-Tween con CaCl₂ al 0.1 mM (PBS-Tween-Calcio). Después se incubaron con 100 μL/pozo de estreptavidina-peroxidasa a una dilución de 1:4,000 en PBS, por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las placas de cultivo fueron lavadas 4 veces por 5 min cada vez con PBS-Tween-Calcio y a cada pozo se le adicionó 100 μL de solución de revelado (4 mg de orto-fenilendiamina, 40 mL de H₂O₂ al 3% en 12 mL de amortiguador de citratos 50 mM pH 5.6) incubando por 10 min en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 μL/pozo de HCl 3N. El color desarrollado por la reacción se registró mediante la medición de la absorbancia generada a una longitud de onda de 492 nm en un lector de placas de ELISA (Labsystem Multiskan MS). La intensidad del color medido en unidades de absorbancia fue proporcional a

la cantidad de lectina unida a las estructuras de oligosacárido presentes en las células. Como blanco, se empleó la absorbancia obtenida por células que se procesaron de la misma manera, pero que no fueron incubadas con lectinas. Las absorbancias resultantes por la reacción de reconocimiento de cada una de las lectinas fue el valor promedio de cinco repeticiones.

RESULTADOS

Se implementó el ensayo denominado Cell-ELISA empleando nueve lectinas en lugar de anticuerpos, el cual permitió determinar estructuras de N- y O-oligosacáridos presentes en los glicoconjugados de la membrana celular de la línea A427 de adenocarcinoma pulmonar humano. En la figura 1 se muestran los niveles relativos de expresión de las diferentes estructuras de oligosacáridos identificados con las lectinas. En todos los casos, la reacción generada por el reconocimiento de las lectinas fue superior a la observada en la reacción de células fijadas a la placa sin la presencia de lectinas (blanco S/L) y el control negativo usando únicamente BSA (véase sección de *Materiales y métodos*). Las estructuras de oligosacáridos con los más altos niveles de expresión fueron las reconocidas por las lectinas **ABA**, **WGA** y **SNA**. Las unidades de absorbancia (UA) alcanzadas por **ABA** fueron 1.95 ± 0.08 UA, para **WGA** 1.75 ± 0.10 UA y para **SNA** 1.02 ± 0.05 UA. Las estructuras reconocidas por **ABA** y **WGA** mostraron niveles de expresión 3.5 y 3.2 veces mayor al de las estructuras reconocidas por **Con A** (0.55 ± 0.05 UA; estructuras con el más bajo nivel de expresión), en tanto que las estructuras reconocidas por **SNA** mostraron un nivel de expresión 1.8 veces mayor al

Figura 1. Reconocimiento mediante lectinas, de estructuras glicosiladas en la línea celular A427 de adenocarcinoma pulmonar humano. Las barras de error representan la desviación estándar del promedio de cinco repeticiones. Para la descripción de las abreviaturas de las lectinas véase la tabla 1. **S/L** y **BSA** representan controles negativos sin lectina y con albúmina sérica bovina, respectivamente.



de las reconocidas por **Con A**, sin embargo, un 75% menor al de las estructuras reconocidas por su homóloga **WGA**. Se determinó un nivel de expresión similar entre las estructuras reconocidas por **LCA** (0.82 ± 0.07 UA) y **LPA** (0.80 ± 0.06 UA); en ambos casos 50% mayor nivel de expresión que las estructuras reconocidas por **Con A**. Finalmente, los niveles de expresión de las estructuras reconocidas por **MAA** (0.64 ± 0.04 UA), **ALL** (0.65 ± 0.04 UA) y **PNA** (0.68 ± 0.11 UA) fueron comparables al de las estructuras reconocidas por **Con A**.

DISCUSIÓN

Las alteraciones presentes en el proceso de glicosilación de células neoplásicas se han visualizado como una estrategia para lograr un diagnóstico oportuno de diversos tipos de cáncer.⁸ Sin embargo, el tipo y nivel de glicosilación de una glicoproteína está determinado, entre otros procesos, por un número considerable de glicosidasas y glicosiltransferasas que actúan secuencialmente, tanto en el retículo endoplásmico como en el aparato de Golgi,⁷ dando lugar a un gran número de estructuras de oligosacáridos. La gran diversidad de estructuras que se presentan en la superficie de una célula hace necesaria la caracterización de su patrón de glicosilación. La determinación del perfil de glicosilación de la superficie celular permite identificar la expresión de determinadas estructuras de oligosacáridos que puedan servir como candidatos potenciales para el diagnóstico del cáncer.^{18,19}

Las técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica han sido utilizadas para la identificación de oligosacáridos de superficie en cortes de tejidos neoplásicos ya sea preservados con algún fijador o congelados, siendo útiles en el diagnóstico y seguimiento de las neoplasias.²⁰⁻²² Sin embargo, tales procedimientos aparte de no ser técnicas cuantitativas, tienen una serie de problemas metodológicos que hacen que la identificación de glicanos de superficie genere resultados poco confiables. La técnica de Cell-ELISA en cambio, permite realizar una determinación cuantitativa de oligosacáridos presentes en las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular. El uso de lectinas en lugar de anticuerpos, permite identificar cambios estructurales en las moléculas glicosiladas así como cambios en la complejidad de la molécula ya sea por modificación en las ramificaciones o en la longitud de la misma.

De las lectinas utilizadas en el análisis se observó que **ABA** mostró el más alto nivel de reconocimiento, lo que sugiere una expresión mayoritaria del antígeno **T** (cuya estructura es **Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr**) en la superficie de la línea celular A427. Una de las alteraciones más importantes que se han identificado en los glicanos pre-

sentados en algunas mucinas es la expresión modificada de antígenos O-glicosilados.^{12,23-26} Dichas glicoproteínas se expresan de manera normal en epitelios y leucocitos. Su función en el epitelio respiratorio es de protección porque se unen a pequeñas partículas que penetran por vía aérea. Se ha determinado que durante procesos inflamatorios o neoplásicos se expresan de forma modificada con respecto a su glicosilación normal.²⁴ En la transformación neoplásica, la biosíntesis de mucinas ya sea incompleta o modificada expone epítomos que normalmente estaban enmascarados en la molécula. Esas nuevas estructuras expuestas, como son los antígenos **T** y **Tn (GalNAc α -Ser/Thr)** interactúan con elementos de la respuesta inmunitaria, o bien participan en el proceso de metástasis.²⁷⁻²⁹ Las mucinas expresadas en cáncer de colon, p. ej., presentan una gran cantidad de epítomos antigénicos glicosilados como los antígenos **T** y **Tn**.³⁰ Interesantemente, las lectinas **ALL** y **PNA** que (al igual que **ABA**) reconocen específicamente antígenos O-glicosilados de tipo **T** y **Tn** mostraron que los niveles de expresión de dichas estructuras fueron de los más bajos. Se sabe que la unión de cada una de estas tres lectinas hacia su ligando, se realiza de forma diferente; **PNA** establece una interacción exclusiva con la galactosa terminal del antígeno **T** y su especificidad se restringe únicamente a dicha estructura;¹⁶ **ALL** tiene una interacción casi exclusiva con la N-acetil-galactosamina (GalNAc) por lo tanto, tiene la capacidad de reconocer a los antígenos **T**, **Tn** e incluso débilmente al sialil-T, pero no reconoce al sialil-Tn.³¹ En el caso de **ABA** su reconocimiento es muy particular y requiere de la interacción del sitio de reconocimiento de la lectina con ambos azúcares del antígeno **T** y su especificidad está restringida a dicho antígeno.³² Las evidencias antes mencionadas pueden explicar un cierto nivel de variaciones en la determinación de los niveles de expresión de determinadas estructuras, sin embargo, no explica el resultado obtenido con dichas lectinas. Una posible explicación es que la línea celular A427 expresa abundantemente una estructura de O-glicano tipo antígeno **T** que solamente la lectina **ABA** puede identificar. Nuestros resultados muestran que las estructuras de glicanos reconocidas por **WGA** y **SNA** tienen altos niveles de expresión. **WGA**, **SNA**, **MAA** y **LPA** son lectinas que reconocen estructuras de N- y O-glicanos con ácido siálico terminal. Además, **WGA** tiene la capacidad de reconocer estructuras conteniendo lactosamina (**[Gal β 1-4GlcNAc β 1-3]ⁿ-R**), mientras que **SNA** reconoce a moléculas del tipo **Sialil-Tn (Neu5Ac α 2-6GalNAc α -Ser/Thr)** en enlace alfa 2-6. Los resultados obtenidos con dichas lectinas sugieren mayor expresión de estructuras con ácido siálico terminal, particularmente la sobreexpresión del antígeno **Tn** sialilado en enlace alfa 2-6, así como la sobreexpresión

de estructuras de glicanos conteniendo **lactosamina**. Con frecuencia el ácido siálico se encuentra en posición terminal en las mucinas (sialomucinas) y juega un papel crítico en la metástasis.^{33,34} Las mucinas expresadas en cáncer de colon además de expresar una gran cantidad de antígenos **T** y **Tn** (como se mencionó), también presentan una gran cantidad de antígenos glicosilados **Sialil-Tn**.³⁰ De igual modo, se ha observado que en células neoplásicas de mamífero suele haber una modificación del ácido siálico terminal en el antígeno **Tn**. Por ejemplo, puede encontrarse una molécula éster O-acetilada en el grupo hidroxil-**Sialil-Tn** y ser considerada como un posible marcador para el diagnóstico en neoplasias como en el caso del cáncer de pulmón.²⁵

Se ha determinado que en cambios metastásicos se incrementa la expresión de la enzima GlcNAcT-V con el consecuente aumento en la expresión de estructuras de **lactosamina**.³⁵ Brockhausen, menciona que las estructuras de poli-N-Acetil-**Lactosamina** se sobreexpresan en diferentes tipos de cáncer.³⁶ Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan una base preliminar hacia la identificación de estructuras de glicanos con potencial como biomarcadores de cáncer pulmonar. Se requiere continuar el estudio incluyendo la caracterización del perfil de glicosilación de otras líneas celulares de cáncer pulmonar así como en células tumorales de pacientes con cáncer pulmonar.

CONCLUSIONES

La técnica de Cell-ELISA con el uso de lectinas permitió identificar y determinar los niveles relativos de expresión de diferentes estructuras de oligosacárido presentes en los glicoconjugados de membrana de la línea celular A427.

El perfil de glicosilación determinado mostró una mayor abundancia relativa de estructuras de O-glicanos cortos como el antígeno **T**, estructuras de **lactosamina** y estructuras de glicano sialidadas del tipo **Sialil-Tn** en enlace alfa 2-6; en comparación con estructuras de N-glicanos de tipo complejo, híbrido y de alta manosa. Los resultados anteriores, en conjunto con las evidencias de la literatura muestran que la sobreexpresión de dichas estructuras es un denominador común en células cancerosas de diferentes orígenes.

REFERENCIAS

- Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. *Cancer statistics, trends, and multiple cancer analysis from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program*. *Oncologist* 2007;12:20-37.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. *Cancer statistics, 2007*. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43-66.
- Hammerschmidt S, Wirtz H. *Lung cancer: current diagnosis and treatment*. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106:809-818.
- Ludwig JA, Weinstein JN. *Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection*. *Nat Rev Cancer* 2005;5:845-856.
- Perkins GL, Slater ED, Sanders GK, Prichard JG. *Serum tumor markers*. *Am Fam Physician* 2003;68:1075-1082.
- Peracaula MR. *Altered glycosylation in tumour proteins: biological implications*. *Afinidad* 2007;64:346-355.
- Varki A, editor. *Essentials of glycobiology*. 2nd ed. NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
- Boland M, Rudd PM. *Disease related glycosylation changes and biomarker discovery: challenges and possibilities in an emerging field* [editorial]. *Dis Markers* 2008;25:189-192.
- Durand G, Seta N. *Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring*. *Clin Chem* 2000;46(6, Pt 1):795-805.
- Rudd PM, Dwek RA. *Structural glycobiology in medicine: Carbohydrates and glycoconjugates*. *Curr Opin Struct Biol* 2006;16:559-560.
- Dube DH, Bertozzi CR. *Glycans in cancer and inflammation: potential for therapeutics and diagnostics*. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:477-488.
- Peracaula R, Barrabés S, Sarrats A, Rudd PM, de Llorens R. *Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis*. *Dis Markers* 2008;25: 207-218.
- Shariat SF, Karam JA, Margulis V, Karakiewicz PI. *New blood-based biomarkers for the diagnosis, staging and prognosis of prostate cancer*. *BJU Int* 2008;101:675-683.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, et ál. *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1417-1423.
- Odonkor CA, Achilefu S. *Differential activity of caspase-3 regulates susceptibility of lung and breast tumor cell lines to Paclitaxel*. *Open Biochem J* 2008;2:121-128.
- Nilsson CL, editor. *Lectins analytical technologies*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 2007.
- Savage D, Mattson G, Desai S, Nielander G, Morgensen S, Conklin E, editors. *Biotinylation reagents*. In: *Avidin-biotin chemistry: a handbook*. Rockford IL, USA: Pierce Chemical; 1992:41-48.
- Erdile LF, Smith D, Berd D. *Whole cell ELISA for detection of tumor antigen expression in tumor samples*. *J Immunol Methods* 2001;258:47-53.
- Ravindranath MH, Bauer PM, Cornillez-Ty C, García J, Morton DL. *Quantitation of the density of cell surface carbohydrate antigens on cancer cells with a sensitive cell-suspension ELISA*. *J Immunol Methods* 1996;197:51-67.
- Álvarez-Fernández E, Carretero-Albiñana L. *Lectin histochemistry of normal bronchopulmonary tissues and common forms of bronchogenic carcinoma*. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:475-481.

21. Barkhordari A, Stoddart RW, McClure SF, McClure J. *Lectin histochemistry of normal human lung*. J Mol Histol 2004;35:147-156.
22. Thöm I, Schult-Kronefeld O, Burkholder I, et al. *Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung*. Lung Cancer 2007;56:391-397.
23. Osinaga E. *Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites*. IUBMB Life 2007;59:269-273.
24. Croce MV, Rabassa ME, Price MR, Segal-Eiras A. *MUC1 mucin and carbohydrate associated antigens as tumor markers in head and neck squamous cell carcinoma*. Pathol Oncol Res 2001;7:284-291.
25. Brockhausen I. *Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells*. Biochim Biophys Acta 1999;1473:67-95.
26. Rose MC, Voynow JA. *Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease*. Physiol Rev 2006;86:245-278.
27. Springer GF, Chandrasekaran EV, Desai PR, Tegtmeyer H. *Blood group Tn-active macromolecules from human carcinomas and erythrocytes: characterization of and specific reactivity with mono- and poly-clonal anti-Tn antibodies induced by various immunogens*. Carbohydr Res 1988;178:271-292.
28. Springer GF. *Tn epitope (N-acetyl-D-galactosamine alpha-O-serine/threonine) density in primary breast carcinoma: a functional predictor of aggressiveness*. Mol Immunol 1989;26:1-5.
29. Srinivasan N, Bane SM, Ahire SD, Ingle AD, Kalraiya RD. *Poly N-acetylglucosamine substitutions on N- and not O-oligosaccharides or Thomsen-Friedenreich antigen facilitate lung specific metastasis of melanoma cells via galectin-3*. Glycoconj J 2009;26:445-456.
30. Byrd JC, Bresalier RS. *Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer*. Cancer Metastasis Rev 2004;23:77-99.
31. Hernández P, Tetaert D, Vergoten G, et al. *Specificity of Amaranthus leucocarpus syn. hypocondriacus lectin for O-glycopeptides*. Biochim Biophys Acta 2004;1674:282-290.
32. Irazoqui FJ, Vides MA, Nores GA. *Structural requirements of carbohydrates to bind Agaricus bisporus lectin*. Glycobiology 1999;9:59-64.
33. Matsushita Y, Cleary KR, Ota DM, Hoff SD, Irimura T. *Sialyl-dimeric Lewis-X antigen expressed on mucin-like glycoproteins in colorectal cancer metastases*. Lab Invest 1990;63:780-791.
34. Kim YS, Gum J Jr, Brockhausen I. *Mucin glycoproteins in neoplasia*. Glycoconj J 1996;13:693-707.
35. Chakraborty AK, Sousa JF, Chakraborty D, et al. *GnT-V expression and metastatic phenotypes in macrophage-melanoma fusion hybrids is down-regulated by 5-Aza-dC: evidence for methylation sensitive, extragenic regulation of GnT-V transcription*. Gene 2006;374:166-173.
36. Brockhausen I. *Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions*. EMBO Rep 2006;7:599-604.

✉ **Correspondencia:**

Dr. José Antonio Serrato,
Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de
Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.
Calzada de Tlalpan 4502, colonia Sección XVI.
México, D.F., 14080
Correo electrónico: serratoiner@gmail.com

Los autores declaran no tener conflictos de interés