

EXPRESION DIFERENCIAL DE LOS CARBOHIDRATOS DE MUCINA EN ENDOMETRIOS HUMANOS

Frede Silvia, Ortiz Susana, Hliba Ernesto.

Cátedra de Patología, Dpto de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba.

Resumen

La aplicación de Lectinas para la identificación de oligosacáridos constituyentes de las Mucinas presentes en la superficie celular, es una herramienta técnica muy útil, debido a que, probablemente estas sustancias estén involucrados en procesos tales como invasión y metástasis.

En este trabajo, nosotros estudiamos tejido endometrial normal con entidades benignas y malignas, para investigar la presencia de Galactosa β 1-3 N Acetilgalactosamina ($\text{Gal}\beta$ 1-3GalNac α) y de Galactosa β 1-3 N Acetilgalactosamina ($\text{Gal}\beta$ 1-3GalNac α y β) empleando dos Lectinas: *Agaricus bisporus* (ABL) y *Arachis hipogea* (PNA) respectivamente. Los controles fueron realizados con baños de galactosa para PNA y con mucina porcina de estómago de cerdo para ABL.

El uso de estas dos Lectinas, permitió encontrar diferencias en los patrones de unión, ya que si bien ambas se unen a los mismos oligosacáridos, ABL realiza la unión en presencia de Acido Siálico mientras que PNA no. Se observaron significativas diferencias en los patrones de unión de ambas lectinas en tejidos, con entidades benignas, malignas y tejido normal. En este último, la marcación fue siempre continua con ambas Lectinas, mientras que fue irregular en el carcinoma.

Palabras claves: *Agaricus bisporus*-*Arachis hipogea*. Mucina-carbohidratos- endometrios normales y patológicos.

Abstract

The use of Lectins to identify oligosaccharides in mucin substances has been increased by the role played by cell surface carbohydrates in invasion and metastasis processes.

We studied in this work normal endometrial tissue, with benign and malignant entities in search for the presence of the Galactose β 1-3 N Acetilgalactosamine ($\text{Gal}\beta$ 1-3 GalNAC α and Galactose β 1-3 N Acetilgalactosamine ($\text{Gal}\beta$ 1-3 α and β) empleando the Lectins: *Agaricus bisporus* (ABL) and *Arachis hipogea* (PNA) respectively.

The specific control were baths with galactose for PNA and with porcine stomach mucin for ABL.

The use of these two Lectins allowed to differentiate substances bonded or non bonded to Sialic Acid, since PNA fails to label when the oligosaccharide is bonded to this acid Sialic. Significant differences were noticed on the bonding patterns of both Lectins on tissues with benign, malignant and normal entities. In this latter case the labelling was always continuous in both Lectins whereas it was irregular in the carcinoma.

Key Words: *Agaricus bisporus*-*Arachis hipogea*-Mucin carbohydrates-normal and pathologic endometrium

Introducción

La aplicación de Lectinas, proteínas no inmunes para la identificación de Hidratos de Carbono (HC) presentes en la superficie celular, (2-16) es una herramienta muy útil, debido

al rol que desempeñan estas sustancias en procesos celulares tales como la invasión y la metástasis. (1-3-6-7-11-12-14-15-16-17)

La unión de HC y Proteínas (glicoproteínas), conforma estructuras bioquímicas denominadas Mucinas, las cuales están presentes en diferentes tejidos e incluso con estructuras moleculares distintas. (Fig. N°1) El ácido Siálico o Neuramínico, parte integrante de las mucinas, generalmente está ubicado en el extremo terminal de la cadena y desempeña un papel muy importante al interactuar con los diferentes HC que conforman la mucina. (Fig. N°1) (4-16)

El Objetivo de este trabajo fue comparar la expresión de HC y sus formas aminadas en endometrios humanos normales y patológicos por medio de dos Lectinas: 1-Agaricus bisporus (ABL), la cual reconoce Galactosa β 1-3N Acetilgalactosamina (Gal β 1-3 Gal Nac) en unión α también denominado Antígeno T (disacárido que posee zonas de unión comprometidas con las lectinas). 2- Arachis hipogea (PNA) que también reconoce en Antígeno T, pero con dos diferencias fundamentales: sólo lo realiza en ausencia de ácido Siálico y en unión α y β (2 - 4 - 7 - 12 - 13).

Material y Métodos

El universo estudiado correspondió a un total de 12 endometrios: de los cuales 3 eran normales en fase de secreción avanzada, 3 con Hiperplasia Glándulo Quística sin Atipia, 3 Hiperplasias con Atipia y 3 con Carcinoma moderadamente diferenciado. Todos los materiales poseían diagnóstico histopatológico previo, habiéndoselos corroborados nuevamente.

Para la técnica de Lectinas unidas a Peroxidasa se realizaron secciones de aproximadamente 5 micras de espesor, las cuales fueron montadas con Poly L-Lisina. Una vez desparafinizadas con xilol durante 15 minutos, se las deshidrató y se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ y metanol al 0,6% durante 30 min. a 37°C. Se incubó con la Lectina correspondiente, durante 45 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Los controles negativos fueron realizados con mucina de estómago de cerdo (Sigma) para ABL y con Galactosa para PNA.

Para el revelado se utilizó Diaminobencidina (DAB), deteniéndose el mismo con agua bidestilada. El contraste de las estructuras histológicas fue realizado con Hematoxilina. La Lectina PNA fue de Laboratorio Sigma y ABL fue purificada de un hongo de Villa Allende, Córdoba, por el Dr. F. Irazoqui, de la Facultad de Ciencias Químicas U.N.C.

PNA fue utilizada a una concentración de 40 mg/ml y ABL de 20 mg/ml. Las secciones histológicas marcadas con PNA sufrieron digestión enzimática con Neuraminidasa tipo VI (Sigma) al 0,1% durante 15 min. a 37°C.

Las estructuras observadas fueron: Borde luminal y Basal, secreción glandular, citoplasma y componente estromal. La medición se realizó en cruces: 0 / + /++ /+++ teniendo en cuenta extensión e intensidad de la reacción.

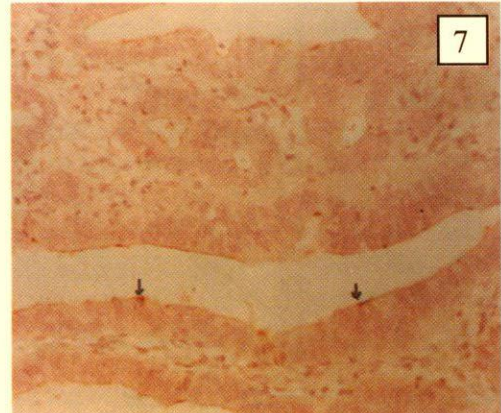
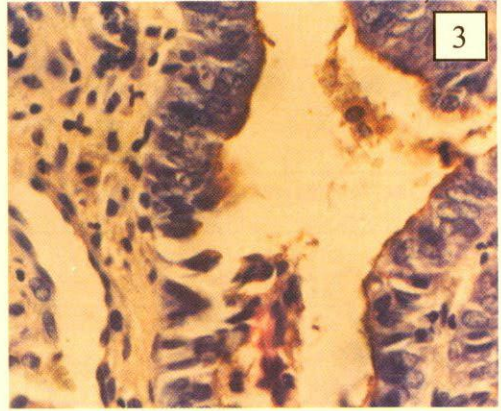
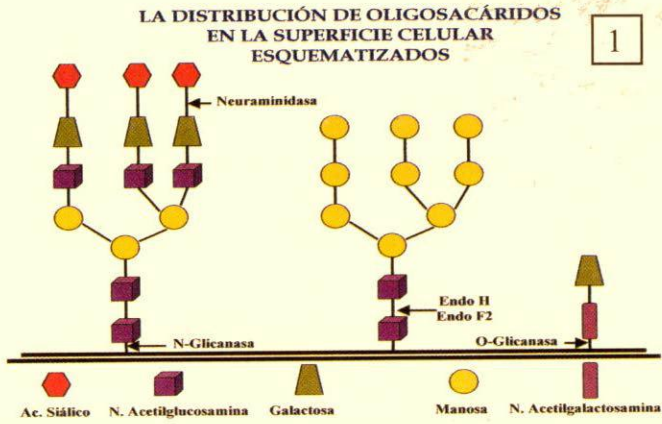
Resultados

Para poder correlacionar los resultados, ambas Lectinas fueron utilizadas en forma simultánea para que, de esta manera, las condiciones de tratamiento del material fuesen idénticas.

Marcación con ABL: En endometrios normales, comparados con los que presentaban atipia o eran francamente neoplásicos, el borde luminal varió en la marcación tanto en intensidad como en extensión. Asimismo, el citoplasma mostró cambios en endometrios normales e hiperplasia sin atipia(++) mientras que en los tejidos con atipia o con cáncer eran negativos. Es de recalcar que siempre el borde basal en todas las entidades fue negativo para esta Lectina. (Figs. N°2-3-4-) TABLA N° I

Marcación con PNA: Los endometrios normales y con Cáncer presentaron una franca disminución de la marcación con esta Lectina en el borde luminal.

Fue muy llamativo en esta marcación que tanto en las hiperplasias con atipia como en las sin atipia este sector fue francamente positivo con una extensión de +++. Figs. N° (5 - 6 - 7) TABLA N°II. Es de remarcar que con ambas Lectinas los bordes basales fueron siempre negativos y que la marcación en los



- Fig. 1: Esquema de la distribución de oligosacáridos constituyentes de la mucina junto a sus formas aminadas.
- Fig. 2: Hiperplasia glándulo-quística sin atipia. El borde luminal y secreción muy marcados Marcación con ABL X 400.
- Fig. 3: Hiperplasia con atipia. El borde luminal y el producto secretorio irregularmente marcados con ABL X 400.
- Fig. 4: Carcinoma marcado con ABL. Marcación escasa y discontinua en borde luminal y secreción X 300.
- Fig. 5: Hiperplasia sin Atipia con PNA. Se observa el borde luminal y secreción positivos X 200.
- Fig. 6: Hiperplasia con Atipia marcada con PNA Borde luminal muy positivo, como así también la secreción en forma irregular. X200.
- Fig. 7: Carcinoma con escasa y puntual marcación con PNA X 300.

TABLA N° I

MARCACION CON ABL

ENDOMETRIO	Borde luminal-	Basal	citoplasma-secreción-estroma		
Normal	+++	-	++	+++	-
Hiperplasia SinAtipia	+++	-	+a++	++	-
Hiperplasia Con Atipia	++	-	+	++	-
Carcinoma	+	-	-	+	-

Nota: La marcación está dada en: 0 / + /++ /+++

TABLA N° II

MARCACION CON PNA

ENDOMETRIO	Borde luminal-	Basal	citoplasma-secreción-estroma		
Normal	++	-	++	++	-
Hiperplasia Sin Atipia	+++	-	+++	+++	-
Hiperplasia Con Atipia	+++	-	++	-	-
Carcinoma	-/+	-	-	+	-

Nota: La marcación está dada en: 0 / + /++ /+++

tejidos con atipia o francamente neoplásicos siempre fue discontinua, mientras que en los normales o sin atipia fue regular.

Discusión

La marcación con Lectinas, proteínas que generalmente se extraen de vegetales, permite reconocer a través de las distintas características de cada una de ellas, la presencia o ausencia de Acido Siálico. (2-3) Las Lectinas utilizadas en este trabajo, no fueron escogidas al azar, sino que se pretendió tener un espectro de conocimiento más específico, el cual permitiese obtener aproximaciones al problema. Así ABL que se une fundamentalmente a Galactosa β 1-3 N-Acetilgalactosamina es un inhibidor reversible no citotóxico de la proliferación celular epitelial(3-8-9-13), mientras que el clásico Antígeno disácarido específico de PNA estimula la proliferación celular.(4-12-13). Además nos permitió inferir la presencia, ausencia y/o disminución del Acido Siálico en los tejidos a estudiar, debido a las diferentes especificidades que poseen.

Nuestro trabajo permitió no sólo encontrar diferencias en la marcación de los diferentes tejidos, sino que expuso dificultades con las que se enfrenta el Patólogo cuando intenta analizar no sólo la morfología sino también el comportamiento químico de las células, ya que un mismo epitope de carbohidrato presentado con diferentes transportadores en el interior de la célula o en su membrana puede reaccionar en forma distinta al unirse a una Lectina. (2-13-16)

Pero este hecho demuestra también que el morfológico, ya sea Histólogo, Biólogo o Patólogo puede tener aproximaciones al problema, mediante distintas técnicas especiales de tinción, tales como PAS, Alcian Blue, Masson o las múltiples variantes de impregnación argéntica o de Lectinas, que además de no ser tan onerosas como los anticuerpos monoclonales, permiten inferir diferentes características no sólo morfológicas, sino también moleculares, las cuales otorgan una mayor profundidad científica de los mecanismos etiopatogénicos involucrados.

Agradecimientos: Al Dr. Fernando Irazoqui, Fac. De Cs. Qs. por habernos otorgado la Lectina ABL, la cual fue usada por primera vez en tejidos embebidos en parafina

Este trabajo fue subsidiado con fondos de CONICOR Y SECYT.

Referencias

- 1- Abbas A., Lichman A., Pober J. Inmunidad frente a Tumores. Inmunología Celular y Molecular, Editorial Interamericana 399-422 1995, 2ª ed.
- 2- Barondes, S H: Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. Trends Biochem. Sci 13:480-482. 1988
- 3- Carneiro F, Santos L, David L, Dabelsteen E, Sobrinhosimoses M.: T (thomsen-Friedenreich) antigen and other simple mucin-type carbohydrate antigens in precursor lesions of gastric carcinoma. Histopathology 24: 105-113 1994
- 4- Cooper H: Lectins a probes in Histochemistry and immunohistochemistry. The Peanut (Arachis hipogea) lectin. Human Pathol. 15 904-907 1984
- 5- Cumings R: Use of Lectins in Analysis of Glycoconjugates. Methods in Enzymology 230: 66-85 1994n
- 6- Leathem A, Atkins N: Lectin binding to formalin-fixed paraffin sections. J. Clin. Pathol. 36:347-350 1983
- 7- Fucci L, Valentini A, Caruso M: Can peanut agglutinin distinguish between pseudo and true invasion in colonic adenomas? Eur J. Histochem. 37 9335-9343 1995
- 8- Irazoqui F, Zalazar F, Chiabrando G, Romero O, Vides M: Differential Reactivity of Agaricus bisporus lectin with human Ig A subclasses in gel precipitation. J. Of Immunological methods 156: 199-204 1992
- 9- Irazoqui F, Vides M, Nores G.: Structural requirements of carbohydrates to bind Agaricus bisporus lectin. Glycobiology 9 (1): 59-64 1999
- 10- Irazoqui F, Zalazar F.E., Nores G, Vides M. Agaricus bisporus lectin binds mainly O-glycans but also N-glycans of human IgA

- subclasses. *Glycoconjugate J.* 14: 313-319 1997
- 11- Langkilde N.: Studies on the expression of T(Gal beta (1-3) Gal Nac alpha 1-O-R) and T-like antigens in normal and pathologic human and rat urothelium. *Scand. J. Urol. Nephrol Suppl.* 172: 45-49 1996
- 12- Ryder S., Smith J, Rhodes J. Peanut lectin: a mitogen for normal human colonic epithelium and human HT29 colorectal cancer cell. *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 1410-1416 1992
- 13- Saito S, Lavery S, Salyan M, Goldber R, Hakamori S. Common tetrasacharide epitope NeuAc alpha 2-3Gal beta 1-3(neu-Ac alpha 2-6)Gal Nac, presented by differet carrier glycosylceramides or O-linked peptides is reconized by different antibodies and ligands having distinct specificities. *J. Biol. Chem* 269: 5644-5652 1994
- 14- Skutelsky E, Hoenigs S, Griffel B, Alroy J: The distribution of lectin receptor sites in human breast lessions. *Path. Res. Pract.* 183: 469-475 1988
- 15- Taylor-Papadimitriou J, Finn O: Biology biochemistry and immunology of carcinoma-asociated mucin. *Immunol. Today* 18: 105-107 1988
- 16- Weis E, Drickmaer k: Structural basis of lectin-carbohydrate recognition *Annu. Rev. Biochem.* 65: 441-473 1996
- 17- Yang G, Shamsuddin A Gal-Gal Nac a biomarker of colon carcinogenesis. *Histol. Histopathol.* II 801-806 1996
- 18- Yu N. Fernig D, Smith J, Milton H Rhodes J. Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Res* 53: 4627-4632 1993