

TOMO LVIII

**ACADEMIA NACIONAL
DE AGRONOMIA Y VETERINARIA**

ISSN 0327-8093

BUENOS AIRES

REPUBLICA ARGENTINA

Glicobiología, una nueva dimensión para el estudio de la Biología y de la Patología

Conferencia del Académico de Número

Dr. M.V. Eduardo J. Gimeno

y M.V. Claudio G. Barbeito



Sesión Pública Extraordinaria
del
15 de Abril de 2004

Conferencia del Académico de Número Dr. M.V. Eduardo J. Gimeno y M.V. Claudio G. Barbeito

Glicobiología, una nueva dimensión para el estudio de la Biología y de la Patología

Resumen

El campo de la glicobiología incluye el estudio de los glicoconjugados, las enzimas que catalizan su síntesis y las lectinas que los reconocen. Los monosacáridos, que intervienen en su composición, pueden combinarse en varios puntos y formar estructuras lineales o ramificadas, mientras que los nucleótidos y los aminoácidos sólo pueden formar compuestos lineales, lo que restringe su diversidad. Hoy resulta evidente que los carbohidratos poseen una enorme capacidad para transmitir información, mucho mayor que los ácidos nucleicos y las proteínas. Numerosos carbohidratos tienen roles específicos cruciales en procesos tan variados como infección, inflamación, inmunidad, fertilización, diseminación de células tumorales y plegamiento de proteínas, por nombrar algunos pocos.

El glicoma, esto es, la totalidad de los carbohidratos de un organismo, es miles de veces más complejo que el genoma y que el proteoma, debido a su diversidad. Los carbohidratos intervienen como transmisores de información en todos "los rincones" de la biología. El conocimiento de los mecanismos de síntesis y degradación de estos compuestos es de gran importancia para comprender, diagnosticar y tratar enfermedades.

Summary

The field of glycobiology encompasses the study of glycoconjugates, the enzymes that catalyse their biosynthesis and the lectins that recognize them. The component molecules of carbohydrates, the monosaccharides, can interconnect at several points to form a wide variety of branched or linear structures. The aminoacids in proteins as well as nucleotides in nucleic acids can form only linear assemblies, which restricts their diversity. It is now evident that carbohydrates offer the highest capacity for carrying information when compared with nucleic acids and proteins. Many carbohydrates play crucial roles in many biological processes like infection, inflammation, immunity, fertilization, dissemination of cancer cells and protein folding.

The glicome is the collective identity of the entirety of carbohydrates in an organism. The glycome is many thousands of times more complicated than the genome and the proteome. The glycoconjugates transfer relevant information in "every corner of biology". The knowledge of the control mechanisms in the biosynthesis and degradation of glycoprotein glycans may be helpful in understanding, diagnosing, and treating disease.

Glicobiología, una nueva dimensión para el estudio de la Biología y de la Patología

Sr. Presidente de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria Dr. Alberto E. Cano

Sres. Académicos

Señoras y Señores:

Introducción

La biología actual puede explicar las bases moleculares de procesos tan variados como la unión óvulo espermatozoide; la implantación del blastocisto; la adhesión de los virus y las bacterias a las células del organismo; los mecanismos mediante los cuales escapan las células tumorales y algunos microorganismos de los macrófagos y los linfocitos; el rechazo de injertos y el modelado de tejidos durante el desarrollo embrionario. En todos los casos mencionados, la base molecular del proceso proviene de la variedad de los carbohidratos de superficie que intervienen en el reconocimiento entre células. Entre fines de la década de 1960 y la de 1980, el estudio de la bioquímica de los carbohidratos entró en un nuevo estado de desarrollo, los glúcidos pasaron a ser considerados mucho más que reservorios energéticos o compuestos estructurales como la celulosa y la quitina. Se reconoce entonces la importancia de los glicoconjugados, compuestos formados por la unión entre mono, oligo o polisacáridos por un lado y lípidos o proteínas por otra parte. La porción formada por azúcares dentro del glicoconjugado fue denominado glicano (Spicer et al. 1965, Shapiro 1969, Hold 1991, Opdenakker et al. 1993, Taylor y Drickamer 2003).

Los glicoconjugados se dividen en:

glicolípidos, siempre anclados en las membranas y *glicoproteínas*, que pueden ser tanto componentes de las membranas como complejos secretados hacia la región o hacia la circulación, o incluso localizarse en el núcleo o en el citosol. Las glicoproteínas a su vez se dividen en las que tienen glicanos N-ligados y las que lo tienen O-ligados. En los N-ligados el sacárido se une a asparagina, mientras que en los O-ligados la unión puede ser a distintos aminoácidos que posean grupos OH (Stryer 1995, Lodish et al. 2002).

Los glicanos que forman parte del glicoconjugado proveen estructura a la cubierta celular y a la matriz extracelular; modifican la solubilidad y la estabilidad de las proteínas y regulan la unión a otros glicanos o a proteínas. En algunos casos la proteína o el lípido que forman parte del glicoconjugado sólo tienen una función de sostén del glicano. En otros compuestos, ambas porciones del glicoconjugado poseen diferentes actividades, por ejemplo la mayor parte de los glicanos que determinan el complejo de grupos sanguíneos ABO del hombre están unidos a un transportador iónico: la proteína banda 3 cuya función es independiente del sacárido al que este unido (Oriol et al. 1992, Taylor y Drickamer 2003).

A partir de estos conocimientos, surge la glicobiología, rama de la bioquímica y la biología celular que estudia los glicoconjugados, las enzimas que catalizan su biosíntesis y las lectinas que los reconocen.

Para comprender las funciones biológicas y las posibles alteraciones de los sacáridos se deben conocer ciertos detalles sobre su estructura química, los que se detallan en la siguiente sección.

Estructura de los gliconjugados

Por lo general los monómeros que se reúnen para formar los glicanos son hexosas. Las hexosas tienen 4 carbonos asimétricos o quirales, cada uno de los cuales puede tener su grupo OH en dos posiciones distintas, esto genera la existencia de 16 isómeros, a los que se denomina epímeros. Por ejemplo la manosa es el epímero de la glucosa que difiere de esta en la posición del OH en el C2, mientras que la galactosa es el epímero de la glucosa que difiere en la posición del OH en el C4. La posición del OH en el C quiral más alejado del grupo aldehído determina las formas D o L de la hexosa (Fig.

1). En la naturaleza las hexosas se encuentran por lo general en forma D. Cuando dos isómeros tienen en todos los C asimétricos los OH en distinta posición, y por lo tanto son imágenes especulares, se los denominan enantiómeros (Stryer 1995, Lodish et al. 2002).

Las hexosas forman ciclos por la reacción hemiacetalica entre el grupo aldehído del C1 y un grupo OH, por lo general el del C5, en este caso el ciclo posee 6 átomos (5 C y un O), quedando el C6 fuera del ciclo. El C1 pasa entonces a ser asimétrico existiendo dos nuevos isómeros posibles: los anómeros alfa y beta. Estos ciclos de 6 átomos constituyen la forma piranósica, que en la naturaleza suele tomar una distribución espacial que recuerda a una silla (Fig. 1a). En el espacio los grupos OH de los monosacáridos suelen ubicarse en una de las caras de la molécula, la que por lo tanto será polar o hidrofílica, mientras que la cara opuesta será hidrofóbica. En algunos casos los azúcares pueden tomar una forma espacial constituida por un ciclo de 5 átomos de C denominada forma furanósica (Roth 1993, Stryer 1995, Lodish et al. 2002).

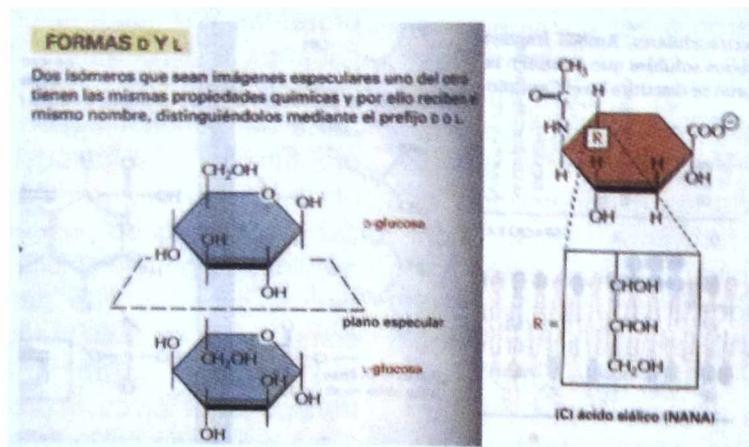


Fig 1a. Cuando las hexosas se disponen como imágenes especulares se denominan enantiómeros. Fig. 1b. Existen azúcares derivados que incluyen formas aminadas y ácidas.

A partir de las hexosas se forman monosacáridos derivados. Dentro de ellos los aminoazúcares, como la 2-glucosamina y la 2-galactosamina, poseen un grupo NH₂ en reemplazo de un OH. En otros derivados, como el ácido glucurónico, el C6 se oxida y se transforma en un grupo carboxilo. También puede ocurrir una desoxidación, como se observa en la fucosa originada por la pérdida de un OH en el C6 de la L-galactosa. Los ácidos siálicos son azúcares ácidos de 9 átomos de C, el más común de ellos es el ácido neuramínico que surge de la condensación del piruvato y la N-acetilmanosamina (Fig. 1b). También pueden mencionarse algunos monosacáridos poco comunes, por ejemplo la manosa 6-fosfato en los metazoos y la N-acetilmanosa en *Clostridium symbiosum* (Stryer 1995, Lodish et al. 2002, Taylor y Drickamer 2003)

Las glicosiltransferasas

Los monosacáridos se unen mediante enlaces entre el grupo hemiacetalico de un ciclo y cualquier OH de otro carbohidrato. Por lo tanto, tras el enlace siempre queda un grupo aldehído libre que constituye el extremo reductor. La energía necesaria para la polimerización de los monosacáridos proviene de un nucleótido difosfato como uridindifosfato (UDP) o guanosindifosfato (GDP), que está unido al azúcar que se incorpora. La unión es catalizada por enzimas del grupo de las glicosiltransferasas. Estos catalizadores se localizan en la membrana de organoides como el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Clausen et al. 1992, Dennis et al. 1999a, Dennis et al. 1999b, Taylor y Drickamer 2003).

Existen más de 500 glicosiltransferasas distintas, cuya expresión difiere según el tipo de célula, el momento del desarrollo ontogénico, el grado de diferenciación, la especie, el sexo, etc. La actividad secuencial de las glicosiltransferasas construye el glicano, sin la existencia de un molde previo, a diferencia de lo que ocurre con los ácidos nucleicos o las proteínas, generados siempre a partir de un molde de ácido nucleico. Algunas glicosiltransferasas tienen alta especificidad, otras pueden unir un mismo azúcar a distintos grupos, además puede existir redundancia de funciones. Además de las glicosiltransferasas de los organoides, se encontraron algunas glicosiltransferasas solubles en el citosol. Las enzimas que tienen la función inversa, catalizando la separación de un monosacárido del glicano, se denominan glicosidasas (Dennis et al. 1999a, Taylor y Drickamer 2003).

Los glicanos como fuente de información biológica

En los apartados anteriores se señaló que existe una gran cantidad de isómeros de monosacáridos, también la presencia de una amplia variedad de C que pueden intervenir en las uniones y además se manifestó que las glicosiltransferasas presentan expresión diferencial. Todas estas características determinan que exista una enorme cantidad de sacáridos posibles, generando una fuente muy importante de información biológica.

Los nucleótidos en los ácidos nucleicos, y los aminoácidos en las proteínas se pueden unir de una sola manera, mientras que los monosacáridos pueden hacerlo en múltiples puntos. Dos monosacáridos idénticos se pueden combinar en 11

disacáridos diferentes (Fig. 2), mientras que dos aminoácidos pueden generar solamente un dipéptido. Cuatro nucleótidos distintos pueden combinarse en 24 tetranucleótidos, mientras que cuatro monosacáridos pueden combinarse para formar 35560 tetrasacáridos. Los carbohidratos pueden entonces codificar mucha más información por unidad de peso que los ácidos nucleicos o las proteínas. Los monosacáridos constituirían, de esa manera, las letras de un amplio vocabulario de especificidad biológica. Las variaciones en dicho vocabulario estarían dadas no sólo por los distintos monosacáridos que intervienen en el compuesto, sino también por diferencias en las ligaduras entre los mismos, y por la presencia o ausencia de ramificaciones en la cadena del glicano (Sharon and Lis 1993). El mensaje que portan los sacáridos es la consecuen-

cia de la actividad de las glicosiltransferasa, que a su vez son el producto de la actividad génica y del mensaje escrito en el ADN. El código puede requerir de un paso más para ser descifrado, ya no se limita a ADN>ARN>PROTEÍNA, sino que puede ser ADN>ARN> PROTEÍNA> GLÚCIDO. Los glúcidos deben considerarse como un producto secundario de la expresión génica. Pese a que menos de un 1 % del genoma está relacionado con los procesos de glicosilación, los genes involucrados en ellos son fundamentales para la vida, por ejemplo los ratones nulos para los genes que codifican algunas glicosiltransferasas mueren en el útero (Taylor y Drickamer, 2003).

Se analizan continuación los distintos tipos de glicoconjugados.

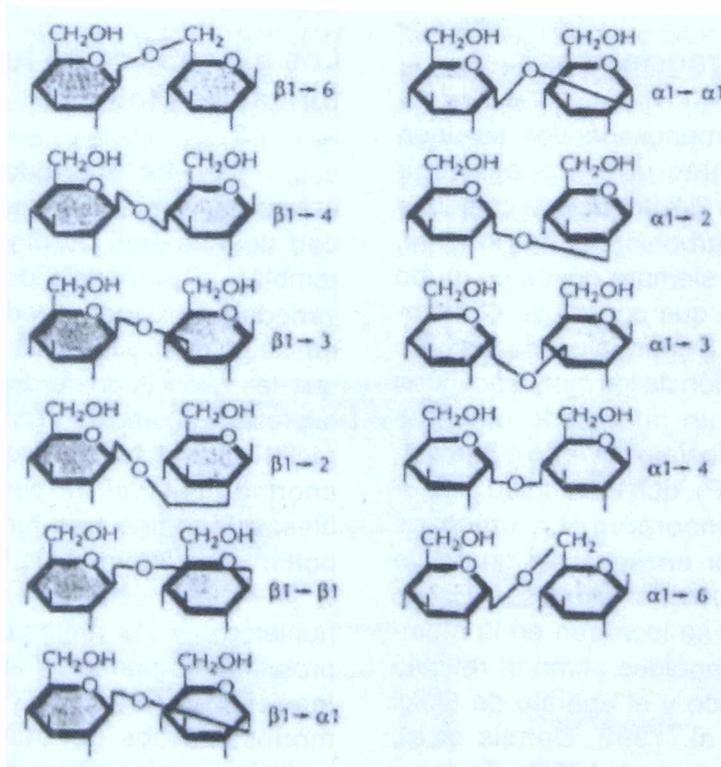


Fig 2. Dos monosacáridos idénticos pueden combinarse para formar 11 disacáridos completamente diferentes.

Glicoproteínas

Las glicoproteínas son el resultado de la glicosilación de las cadenas peptídicas y actualmente se incluye también en este grupo a los proteoglicanos, glicoconjugados que poseen características diferentes a las de otras glicoproteínas. Existen glicoproteínas que poseen el mismo polipéptido y distintos glicanos y a estos se los denomina glicofomas (Dennis et al. 1999b, Taylor y Drickamer 2003).

Las características de las glicoproteínas son muy distintas según posean sacáridos N u O ligados.

Los sacáridos N-ligados siempre tienen un núcleo común de carbohidratos, pero a partir de este núcleo pueden originarse porciones terminales de dos tipos distintos: alta manosa o tipo complejo.

La formación de los N-ligados se inicia en el retículo endoplasmático rugoso por la intervención del dolicol, un lípido de la membrana del organoide. El oligosacárido inicia su formación unido al dolicol, desde la

cara citosólica del organoide, pero luego este lípido lo transfiere en bloque al péptido en la cara luminal del retículo endoplasmático. El bloque inicial de carbohidratos siempre es glucosa3 manosa9N-acetil Glucosamina 2. Estos pasos tempranos ocurren por completo en el retículo y por lo tanto pueden acontecer tanto en forma simultánea a la síntesis de proteínas, como una vez terminada la misma. Por último, a lo largo de su viaje por el retículo y especialmente por las distintas porciones del aparato de Golgi, el oligosacárido se enfrenta a distintas glicosiltransferasas y glicosidasas que van agregando y removiendo monosacáridos del mismo. Cada sector del sistema de endomembranas expresa, en las distintas poblaciones celulares y según el estado de diferenciación de las células, enzimas específicas lo que permite originar la amplia variedad existente de glicocomplejos (Fig. 3). Hasta el momento se han caracterizado más de 500 glicanos N-ligados distintos, producto de la actividad diferencial de cientos de glicosiltransferasas diferentes (Taylor y Drickamer 2003).

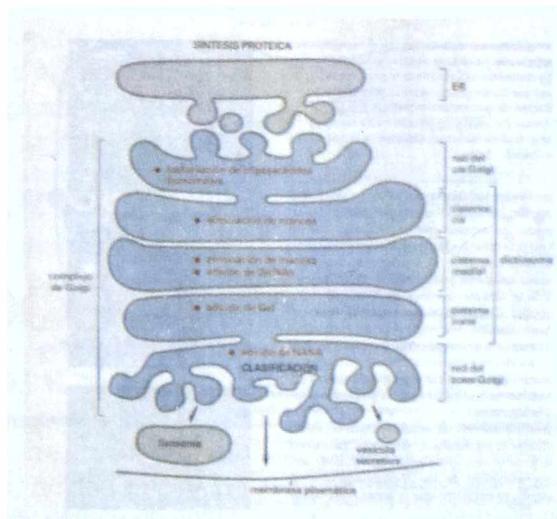


Fig. 3. Se esquematizan los cambios que ocurren en las glicoproteínas dentro del sistema de endomembranas.

Un ejemplo típico de N-ligandos lo representan los grupos sanguíneos ABO, constituidos por oligosacáridos (Fig. 4), que si bien pueden formar parte de un glicolípido, por lo general están unidos a proteínas. Los antígenos de los grupos sanguíneos se forman por la unión de los antígenos A o B al antígeno H, un oligosacárido con polilactosamina ligada a fucosa. Este antígeno H es el producto de fucosiltransferasas llamadas enzimas de Lewis de las que existen tres formas distintas. Entonces ABO es un gen polimórfico que posee tres alelos distintos: A que codifica para una glicosiltransferasa que le agrega N-acetilgalactosamina a H; B que codifica para una enzima que le agrega galactosa a H y O que codifica para una proteína inactiva. A y B difieren en 4 aminoácidos y A y O solamente en uno. Los antígenos A y B están en distintos alimentos, por lo que todos los

individuos se exponen a ellos y generamos clones de linfocitos inmunocompetentes para reaccionar contra aquellos antígenos que no poseen. Por lo tanto, frente a una transfusión sanguínea con glóbulos rojos que poseen el antígeno se genera una respuesta rápida. La presencia de los antígenos ABH no se limita a los glóbulos rojos, sin embargo la existencia de estos sacáridos en los eritrocitos es exclusiva del hombre. En los epitelios estos carbohidratos aparecen ya en anfibios y reptiles y se relacionan con el grado de diferenciación celular; por ejemplo en la epidermis el estrato espinoso solo posee antígeno H, pero en los estratos más superficiales se expresan A o B. En general la expresión de los antígenos AB, va desapareciendo cuando aumenta el grado de diferenciación celular y muchos órganos dejan de expresarlo cuando se hacen funcionales (Oriol et al. 1992, Lodish et al. 2002, Taylor y Drickamer 2003).

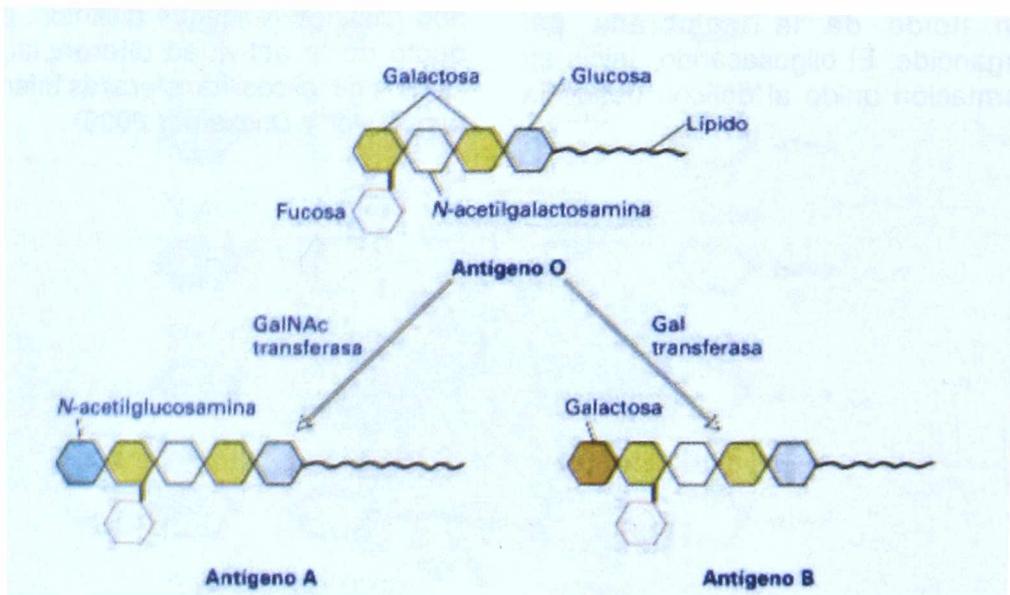


Fig. 4. Se observan las diferencias entre los antígenos de grupos sanguíneos ABO. En la porción superior se observa el antígeno característico del grupo O. Abajo a la izquierda, se muestra como el agregado de N-acetilglucosamina origina el antígeno A y a la derecha como el agregado de galactosa forma el antígeno B.

Los O-ligados: se caracterizan por que el sacárido se une a un grupo OH de un aminoácido. La O-glicosilación ocurre por completo en el aparato de Golgi y es siempre post-traslacional. En este tipo de glicosilación no interviene ningún intermediario como el dolicol, ni hay transferencia en bloque, sino que todos los monosacáridos se incorporan individualmente unidos a nucleótidos difosfato. Dentro de los compuestos que poseen sacáridos O-ligados encontramos a las mucinas, a los proteoglicanos y al colágeno (Brockhausen 1999).

Las mucinas son sustancias glicoproteicas que pueden ubicarse en la membrana o ser secretadas hacia la superficie apical de los epitelios en donde forman el mucus. Su localización más frecuente es en las superficies de los aparatos respiratorio, digestivo y genital femenino. Las proteínas de las mucinas son de alto peso molecular, cuando la sustancia queda en la membrana posee una porción hidrofóbica que permite el anclaje a la misma. A diferencia de otros O-ligados como los proteoglicanos, las mucinas no tienen ácido glucurónico ni idurónico, por lo que las cargas negativas son aportadas por ácidos siálicos y sulfatos. Las mucinas suelen acumularse, en la forma de sus precursores los mucinógenos, en gránulos en los que el calcio se une a los grupos de carga negativa de los sacáridos.

Por ser polianiones, las mucinas retienen agua, formando un gel viscoso. Este gel denominado mucus posee un 95 % de agua y casi un 5% de mucinas, presentando otros componentes menores como electrolitos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas séricas. El gel viscoso que forman las mucinas protege de las

bacterias por atrapar los microorganismos en él, además previene del daño que podrían generar otras sustancias del propio organismo, como ocurre en el estómago en donde impide que el HCl injurie al epitelio gástrico. En dicho órgano las características de glicosilación son diferentes entre las mucinas producidas en las glándulas y las elaboradas por el epitelio superficial, estas últimas carecen de sulfatos que inhiben la actividad de las enzimas gástricas (Straus et al. 1993, Taylor y Drickamer 2003).

Los proteoglicanos también son O-ligados que por sus cargas negativas retienen agua, pero su función principal es otorgar estructura a la sustancia extracelular; en el líquido sinovial funcionan como lubricantes. Se caracterizan porque sus glicanos son muy largos y contienen cadenas con secuencias alternadas de un azúcar ácido y uno aminado, por lo que estos glicanos, antes denominados mucopolisacáridos, se conocen en la actualidad como glicosaminoglucanos (GAG). Los proteoglicanos tienen un corazón proteico del que parten alrededor de 100 cadenas de glicosaminoglucanos dentro de los que se conocen: dermatansulfato, condroitinsulfato y heparansulfato; además los proteoglicanos se unen en la sustancia extracelular a otro GAG: el ácido hialurónico (Fig. 5). Dentro de los proteoglicanos se halla el agregano que es el más abundante en el cartílago; otros proteoglicanos de la sustancia extracelular son el perlican, el neurocan y el versican. Algunos proteoglicanos se ubican en la membrana y tienen menos GAG, dentro de ellos el sindecan es uno de los más abundantes (Alberts et al. 1994, Lodish et al. 2002).

Otro O-ligado es el colágeno en que se forman uniones O-glicosídicas entre la 4-hidroxilisina y un disacárido de glucosa y galactosa.

Una descripción detallada de las características bioquímicas y estructurales del colágeno escapa a los objetivos del presente trabajo.

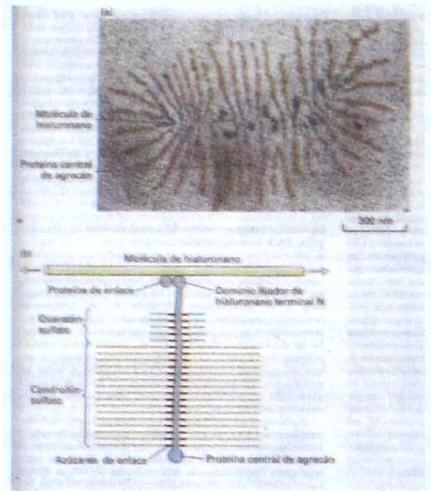


Fig. 5. En la imagen (a) se muestra la relación entre los proteoglicanos y el ácido hialurónico en la sustancia intercelular del cartílago. En la (b) observamos una representación esquemática de un proteoglicano.

Glicolípidos

Estos compuestos se dividen en glicoesfingolípidos, caracterizados por no poseer glicerol y glicofosfolípidos con fosfatidilglicerol. Los glicoesfingolípidos a su vez se dividen en cerebrósidos, que solo poseen un

monosacárido como glucosa o galactosa unida al lípido, y gangliósidos en donde se unen sacáridos más complejos (Fig. 6). Los nombres de estas sustancias sugieren su abundancia en las membranas de las células de los órganos del sistema nervioso (Hakomori 1995).

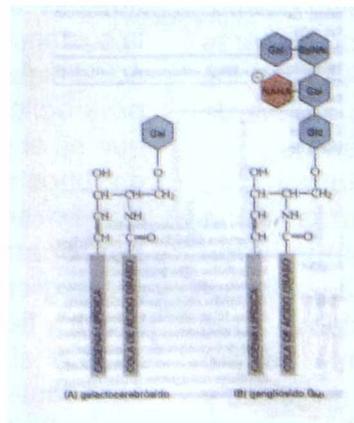


Fig. 6. Se observa la estructura de dos de los glicolípidos más comunes; un cerebrósido (A) más sencillo y un gangliósido (B) de estructura más compleja.

La síntesis de glicolípidos comienza en retículo endoplasmático liso. En la cara citosólica de este organoide se forma la ceramida que se une a UDP-Glucosa o UDP-Galactosa, luego se produce el «*flipping*» que la lleva hacia la cara luminal. Por lo general el glicolípidio queda rodeado de otros lípidos, que le forman una «balsa» para su inserción en la membrana (Taylor y Drickamer 2003).

Normalmente los glicolípidos representan solo el 5 % de los lípidos tisulares, pero en ciertas localizaciones como las vainas de mielina constituyen más del 25 %. En esta última localización intervienen en la formación de los nudos de Ranvier y en la interacción entre las capas de membrana que forman dicha vaina (Taylor y Drickamer 2003).

Un caso especial es el del anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI), en este caso el glicano actúa como puente entre la proteína y el lípido. Este proceso no es una verdadera glicosilación, por lo que ha recibido el nombre de glicoproteína. Las proteínas de anclaje no tienen porciones transmembrana y suelen estar en «balsas» de lípidos. En los compuestos que poseen este tipo de anclaje los glicanos no tienen funciones en el reconocimiento y la adhesión celular (Lodish 2002, Taylor y Drickamer 2003).

Evolución de los glicocomplejos

Las glicoproteínas son sintetizadas por los organismos de todos los reinos observándose ya su producción en eubacterias y arqueobacterias. En los organismos procariontes y en los eucariotas más primitivos como levaduras la función de las glicoproteínas

es esencialmente estructural. En todos los eucariotas se agrega la función de regular el plegado de otras proteínas y por último en los organismos pluricelulares intervienen en el reconocimiento y la adhesión celular. Además, los mecanismos de glicosilación y los monosacáridos que forman parte de los glicocomplejos, se modificaron durante la evolución filogenética, por ejemplo los eucariotas más primitivos tienen sacáridos N-ligados ricos en manosa y carecen de los de tipo complejo. Algunos azúcares sólo se encuentran en los glicoconjugados de ciertos grupos, por ejemplo la presencia de manosa 6-P es exclusiva de los metazoos (Drickamer y Taylor 1998, Dennis et al. 1999b, Taylor y Drickamer 2003)

Tal como ocurre en otros aspectos de su biología, también en lo referente a los sacáridos de membrana, los parásitos y sus hospedadores muestran un proceso de co-evolución; los hospedadores cambian su patrón de glicosilación para escapar de los parásitos y estos últimos lo hacen para poder unirse a las células en que intentan ingresar.

Como se verá en otra sección muchos oligosacáridos ligados poseen funciones específicas, además como los microorganismos y las toxinas suelen ingresar al organismo uniéndose a los glicanos, las modificaciones de estos podrían ser un mecanismo de protección

Funciones de los glicocomplejos

Como ya se mencionó, los sacáridos de membrana poseen múltiples funciones, por ejemplo protegen a las células epiteliales de la acción de los pH extremos o de las enzimas hidrolíticas. Además, algunos

glicoconjugados pueden unirse a las células citotóxicas e inhibirlas, este es un mecanismo de protección de las células normales, pero también puede facilitar el escape de las células tumorales a los mecanismos de defensa del organismo (Sharon y Lis 1993, Taylor y Drickamer 2003).

Los sacáridos de los glicolípidos y glicoproteínas de membrana junto a glicoproteínas adsorbidas a la membrana forman el glicocálix o cubierta celular (Fig. 7). El glicocálix genera un microambiente en el que se localizan enzimas como las peptidasas intestinales (Alberts et al. 1994, Lodish et al. 2002).

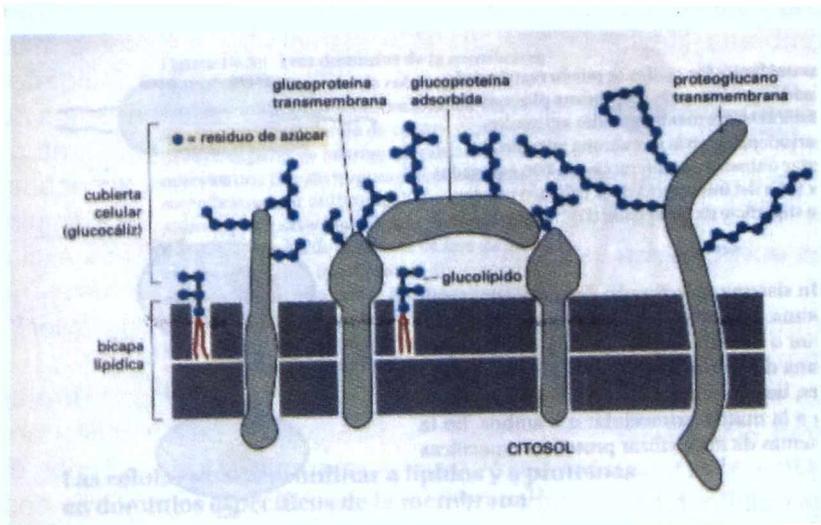


Fig. 7. Se presenta la disposición de los glicoconjugados en la membrana celular y la composición del glicocalix.

Los carbohidratos no sólo intervienen en los procesos de adhesión entre las células en los tejidos, sino también participan en la unión entre sustancias circulantes y permiten que ciertos compuestos sean captados y eliminados (Taylor y Drickamer 2003). Algunos ejemplos específicos de la importancia de los glúcidos en el reconocimiento y la adhesión celular se encuentran en los procesos inflamatorios y en la fecundación. Las características funcionales de los carbohidratos en los procesos inflamatorios se discuten en el capítulo sobre lectinas. En cuanto a las funciones en la fecundación, a partir de los trabajos desarrollados por Wassarman en la década de 1980

(Wassarman 1989) se estableció que la membrana o zona pélucida del ovocito está constituida por 3 glicoproteínas: ZP1, ZP2 y ZP3. La porción oligosacárida de esta última es el receptor espermático primario, que tiene especificidad de especie, siendo además el desencadenante de la reacción acrosómica. Las hembras con mutaciones en ciertas glicosiltransferasas pueden ser estériles por las modificaciones en las mencionadas glicoproteínas; por otra parte el tratamiento con ciertas glicosidasas impide la fecundación (Gahmber et al. 1992, Wassarman 1989, Wassarman et al. 2001).

En la membrana, la carga negativa que otorgan los ácidos

siálicos, interviene en los procesos de repulsión y adhesión entre las células. Por ejemplo, la proteína de adhesión N-CAM, característica de las células nerviosas, se carga de ácidos siálicos en el momento en que las células migran (con lo que repele a otras células) y luego pierde ácidos siálicos cuando se establece el sistema de conexiones.

La glicosilación de lípidos confiere rigidez a la membrana y regula la función y la actividad de las proteínas.

Los proteoglicanos de membrana pueden secuestrar factores de crecimiento como el factor de crecimiento para fibroblastos (FGF) que se une a cadenas de heparan sulfato del sindecan que actúa como co-receptor. Por lo tanto, las mutaciones que afectan el patrón de sulfatación de estos proteoglicanos pueden tener consecuencias biológicas muy importantes. Los gangliósidos también pueden modular la acción de los factores de crecimiento, por ejemplo el gangliósido GM3 modula la actividad del receptor para el factor de crecimiento epidérmico inhibiendo su activación por asociarse con la porción transmembrana, bloqueando la dimerización y en consecuencia la activación del mismo.

La porción glicosídica de algunas hormonas es fundamental para su actividad, por ejemplo la remoción del sacárido N-ligado de las gonadotropinas aumenta la afinidad por el receptor, pero inhibe la activación del mismo. Por su parte, la eritropoyetina requiere de la porción glucídica tanto para su actividad como para su estabilidad.

La glicosilación puede ser un mecanismo para modificar la estabilidad y la vida media de las proteínas, por ejemplo la ribonucleasa B posee

un solo sacárido N-ligado rico en manosa que hace que la enzima sea termoinstablemente más estable que la forma A no glicosilada y por lo tanto tenga una vida media más elevada. En el activador del plasminógeno, los carbohidratos recubren a la porción proteica protegiéndola de la acción enzimática (Taylor y Drickamer 2003). Durante el desarrollo ontogénico las funciones de los sacáridos dentro de los glicocomplejos, son múltiples, interviniendo ya en procesos tan tempranos como la implantación. El patrón de carbohidratos de los gliconjugados va cambiando durante la embriogénesis y la organogénesis, por ejemplo ciertos gangliósidos son necesarios para el crecimiento de las neuritas (Plendl y Sinowatz 1998).

Introducción a la glicopatología

La amplia variedad de funciones de los glúcidos permite inferir la complejidad de los procesos en los que estas sustancias se alteran.

Por ejemplo, la ausencia de GPI en los glóbulos rojos humanos genera la hemoglobinuria paroxística. En esta entidad, los eritrocitos sin GPI carecen en su membrana de las proteínas CD55 y CD59, las mismas previenen de la activación del complemento, por lo que en su ausencia hay hemólisis generada por el complemento.

En enfermedades intestinales, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa del hombre, cambian los patrones de glicosilación, por ejemplo aumentan los niveles de azúcares sulfatados y disminuyen los de ácidos siálicos (Cooper et al. 1987, Gabius 1991, Itagaki et al. 1994). También se alteran los sacáridos en enteritis crónicas de los animales como la

paratuberculosis de los rumiantes (Massone et al. 1991).

En las neoplasias cambia la expresión de los genes que codifican para las glicosiltransferasas, lo que genera modificaciones en la estructura de las cadenas de glúcidos. Algunas glicosiltransferasas se estimulan por la activación de oncogenes como Ras. La ausencia de la N-acetilglucosiltransferasa V en las células tumorales reduce en un 95% del potencial metastásico, además de disminuir el crecimiento del tumor primario. La ausencia de galactosas, tanto en O como en N-ligados, disminuye el número de metástasis; en algunos melanomas, la ausencia de fucosa tiene un efecto semejante. En las neoplasias los cambios en las glicoproteínas son múltiples, por ejemplo algunas mucinas de transmembrana se convierten en secretorias en las células tumorales. Muchas glicoproteínas retoman en la carcinogénesis el patrón de glicosilación que caracteriza a las células embrionarias. También cambian las características de los glicolípidos en las neoplasias, el incremento de ciertos tipos de gangliósidos podría inhibir a las células asesinas. En cambio, al disminuir la concentración de otros gangliósidos desaparece la inhibición por contacto. Un factor de mucha importancia en el potencial metastásico de una célula neoplásica es la cantidad de ácidos siálicos de sus sacáridos; se debe recordar que el ácido siálico otorga cargas negativas que intervienen en la repulsión celular (Brockhause 1999, Dennis et al. 1999a, Dennis et al. 1999b).

Numerosos agentes patógenos utilizan los glúcidos para adherirse y entrar a las células. Por ejemplo el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, productor del SIDA, posee 2

glicoproteínas que median la adhesión al CD4 de los linfocitos (Hansen et al. 1991, Taylor y Drickamer 2003). Los rinovirus cuando ingresan a los epitelios, se unen a la glicoproteína I-CAM.

También en algunos protozoarios es importante la relación con los carbohidratos para la patogenia de las enfermedades que producen. Por ejemplo, los merozoitos del plasmodio reconocen a los ácidos siálicos. Algunos protozoos del género *Tritrichomona* producen glico-sidasas, como neuraminidasas, esto generaría los cambios observados en los azúcares terminales de los epitelios genitales, con los que se facilitaría la entrada de los parásitos al organismo (Padilla-Vaca y Anaya-Velázquez 1997, Cobo et al. 2004). También producen neuraminidasa algunos virus, en estos casos la acción de la enzima no sólo favorece la adhesión sino también la liberación de nuevos virus. Ciertas toxinas como la del cólera y la del tétanos ingresan uniéndose a gangliósidos celulares (Taylor y Drickamer 2003).

La bacteria *Helicobacter pylori* tiene gran afinidad por la fucosa, lo que hace que los individuos del grupo O, que tienen el antígeno H rico en fucosa expuesto, sean más sensibles a la infección con este microorganismo que aquellos pertenecientes a los grupos A o B (Taylor y Drickamer 2003).

Las alteraciones de la glicosilación intervienen en la patogenia de algunas enfermedades autoinmunes, por ejemplo en la artritis reumatoidea humana se modifica la secuencia de azúcares en el autoantígeno involucrado (Delbes, 1998).

En la diabetes mellitus pueden unirse glúcidos a las proteínas por

un proceso que no incluye uniones glicosídicas; este proceso se denomina glicación (Taylor y Drickamer 2003).

Las lectinas

Las lectinas son proteínas con capacidad de unirse con cierta especificidad a los glúcidos, en forma semejante a como las inmuno-globulinas se unen a los antígenos, pero sin que medie para ello una reacción antígeno-anticuerpo. Si bien las lectinas pueden ser glicoproteínas, la porción que se une al carbohidrato es siempre la peptídica. Su descubridor fue Stillmark, quien, en 1888, encontró una sustancia de origen vegetal capaz de aglutinar los glóbulos rojos, a la que denominó fitohemoaglutinina. Posteriormente Boyd les otorgó a estas sustancias el nombre de lectinas, palabra que proviene del latín *legere* (discernir, seleccionar).

En un primer momento las lectinas fueron definidas como proteínas capaces de aglutinar células y de unirse a carbohidratos con alta afinidad y especificidad. En 1954, Boyd y Shapleigh consideraron que podrían utilizarse para seleccionar glóbulos rojos humanos según su grupo (Goldstein

y Hayes 1978, Goldstein et al. 1980, Balding 1981, Rüdiger 1981, Barondes 1984, Danguy et al. 1988).

Las lectinas contienen dominios especiales llamados CRD (dominio de reconocimiento de carbohidratos) que poseen la capacidad de unirse a ciertos azúcares mediante interacciones moleculares no covalentes como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. La unión entre la lectina y el carbohidrato ocurre en, por lo menos, dos puntos y es fundamental la disposición espacial del CRD, que forma una especie de bolsillo en el que ingresa el carbohidrato (Sharon 1993) (Figura 8). Cada lectina reconoce uno o unos pocos monosacáridos terminales. Sin embargo en algunos casos la afinidad depende de los azúcares vecinos a estos. En muchos casos, lectinas con características muy diferentes reconocen al mismo carbohidrato, mientras que, por el contrario, algunas lectinas semejantes se unen a distintos azúcares. Todas las lectinas tienen una afinidad primaria pero, además, pueden poseer menor afinidad por otros residuos (Spicer y Schulte 1992). Por ejemplo, la WGA se une a la N-acetil glucosamina y, además, al ácido siálico (Monsigny et al. 1980).

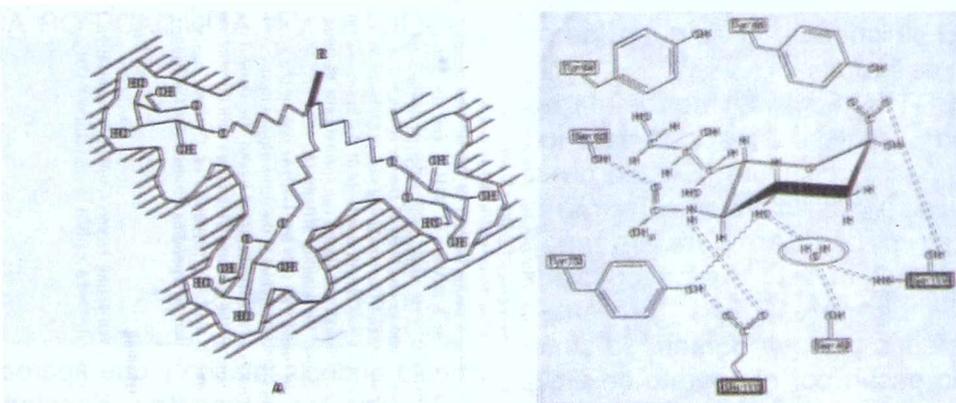


Fig. 8. a) Se observa la interacción espacial entre la lectina (líneas oblicuas) y los carbohidratos. b) Se observa la interacción mediante uniones no covalentes entre algunos aminoácidos de la lectina WGA y una molécula de ácido siálico.

Nomenclatura y clasificación

Algunas lectinas recibieron su nombre por sus características biológicas. Así por ejemplo, la calreticulina es una lectina que se localiza en el retículo endoplasmático y la proteína sérica fijadora de manosa indica con su denominación su afinidad y su localización (Taylor y Drickamer 2003).

Para denominar a muchas lectinas se utilizan 3 letras, las dos primeras derivan del nombre científico o del vulgar en inglés del organismo de origen. La tercera es una A que proviene del término "aglutinin". Si de un mismo organismo se aislaron varias lectinas, se discriminarán agregando letras o números romanos. Como ejemplos podemos citar: RCA-I, primera lectina aislada del *Ricinus communis* y WGA, lectina aislada del "wheat germ" (germen de trigo) (Stoward et al. 1980, Walker 1988).

Resulta difícil realizar una clasificación completa de las lectinas. Para su uso práctico se las suele clasificar en grupos de afinidad. Basándonos en la bibliografía actual (Drickamer y Taylor 1993, Danguy et al. 1998, Hauri et al. 2000, Danguy et al. 2002, Taylor y Drickamer 2003) y desde un punto de vista químico y biológico se pueden dividir en los siguientes grupos:

GALECTINAS: antes denominadas lectinas S por su capacidad para formar puentes disulfuro. Existen diversos tipos pero siempre se caracterizan por su capacidad para unirse a galactosa. Muchas son secretadas y se diferencian de otras proteínas secretadas por que durante su síntesis no pasan por el aparato de Golgi (Müller et al. 2004).

LECTINAS DE TIPO C o LECTINAS DEPENDIENTES DE CALCIO: consti-

tuyen un grupo muy diverso de lectinas animales en el que se incluyen: el receptor de manosa de macrófagos y endotelio hepático, la E-selectina y la proteína sérica de unión a manosa. Las lectinas de tipo C pueden dividirse en dos grandes grupos: las que ligan a manosa y glucosa y las que se unen a hexosas relacionadas con la galactosa. **LECTINAS DE TIPO M:** se localizan con frecuencia en los organoides y están relacionadas con la degradación proteica.

LECTINAS DE TIPO R: tienen diferentes afinidades; algunas se unen a enzimas, mientras que otras intervienen en la cinética de las hormonas y aparecen en animales y vegetales. Por lo general, reconocen N-acetil galactosamina. El grupo debe su nombre a la ricina, una lectina tóxica que ingresa a la célula y bloquea la síntesis proteica.

LECTINAS DE TIPO L: son lectinas de galactosa y manosa que en los vegetales están relacionadas con la protección de las semillas. Además, intervienen en el tránsito proteico intracelular. **LECTINAS DE TIPO P:** reconocen manosa 6 fosfato. Son exclusivas de los vertebrados.

LECTINAS DE TIPO I o LECTINAS SEMEJANTES A INMUNOGLOBULINAS CON AFINIDAD POR ACIDO SIALICO: son proteínas transmembrana exclusivas de los vertebrados que se caracterizan por poseer un CRD en la región amino-terminal. Este grupo incluye a las sialoadhesinas de macrófagos y al CD22.

CALNEXINAS Y CALRETICULINAS: son lectinas que se localizan en el retículo endoplasmático y que aparecen en todos los eucariotas. Funcionan como chaperonas, es decir como sustancias que regulan el plegado proteico.

LECTINAS DE UNIÓN A HEPARINA: constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con numerosos aminoácidos básicos. Este grupo incluye factores de crecimiento (como el factor de crecimiento para fibroblastos) y a las serpinas. Dentro de estas últimas aparecen sustancias que intervienen en la regulación de la coagulación, como la antitrombina III y el cofactor II de la heparina.

Funciones de las lectinas en la naturaleza

Las lectinas se han aislado en organismos de todo tipo: virus, eubacterias, arqueobacterias, protistas, hongos, plantas y animales (Taylor y Drickamer, 2003).

Los virus de la influenza y el poliovirus poseen lectinas que se unen a moléculas de ácido siálico de las células animales, permitiendo la

adhesión y, posteriormente, el ingreso a los tejidos (Sharon and Lis, 1989).

Muchas bacterias como *Salmonella sp.* y *Escherichia coli* poseen lectinas de superficie. Las mismas intervienen en la patogenicidad por facilitar la adhesión a los tejidos. Por ejemplo, en los pili de *E. coli* aparece una lectina de galactosa y galactosa-amina denominada Pap 6 que se une a glicolípidos de los tejidos y otra lectina denominada Fim H que reconoce manosa. También se encuentran lectinas que intervienen en el inicio de la infección en las bacterias *Bordetella bronchiseptica* y *Mycoplasma hyopneumoniae* (Doyle 1982, Slifkin y Doyle 1990, Taylor y Drickamer 2003).

El protozoo *Entamoeba histolytica* también posee lectinas que intervienen en el reconocimiento de las células de mamíferos. En el hongo *Dictyostelium discoideum* se encontró una lectina de galactosa relacionada con la diferenciación.

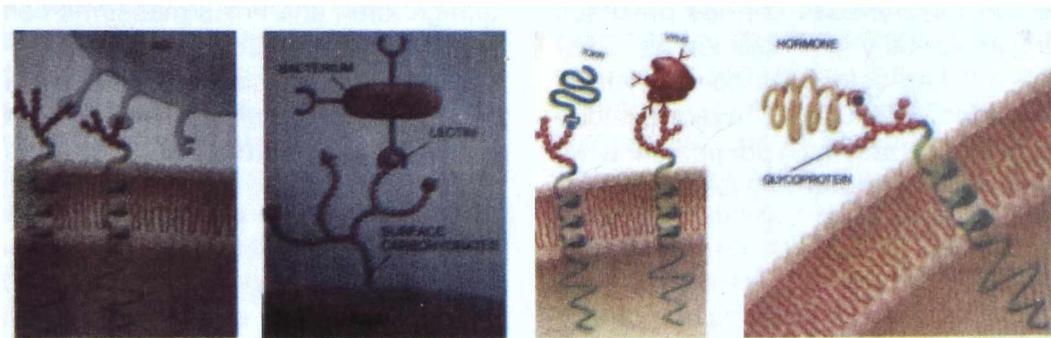


Fig. 9. La unión específica lectina-carbohidrato interviene en el reconocimiento entre células (a) y en la adherencia de bacterias (b), toxinas (c), virus (d) y hormonas (e) a la membrana plasmática.

En las plantas se han encontrado más de 200 lectinas, las que se localizan especialmente en las semillas y en los tejidos embrionarios. Algunas lectinas de las leguminosas pueden reconocer bacterias y aglutinarlas para establecer simbiosis en las raíces. En los vegetales también pueden intervenir en los mecanismos de defensa. Por ejemplo algunas lectinas ligan a la quitina, lo que puede afectar el desarrollo de insectos y hongos que poseen este polímero de N-acetil glucosamina. La WGA inhibe la germinación de las esporas y el crecimiento de las hifas de los hongos *Trichoderma viridae* y *Fusarium solani*. Se cree que algunas lectinas vegetales pueden tener una doble función, en la semilla intacta son proteínas que cumplirían funciones de reserva y cuando ésta es dañada serían tóxicas para el organismo agresor (Chrispeels y Raikhel 1991).

En las células eucariotas complejas, ciertas lectinas se localizan en el sistema de endomembranas intracelulares y su función es regular el plegado de las proteínas que realizan su tránsito por dicho sistema y distribuir las hacia el posterior destino de las mismas (Hauri et al. 2000).

Muchas lectinas animales están relacionadas con los procesos inflamatorios y la protección del organismo. Las selectinas constituyen la variedad de lectinas C mejor estudiadas y se caracterizan por permitir uniones entre el endotelio y los leucocitos.

Se reconocen las selectinas L, P y E. Las L selectinas se localizan en los linfocitos e intervienen en la unión de estas células al endotelio de las venas de los linfonodos, permitiendo la circulación de los linfocitos en estos órganos. Las P y E selectinas se expresan en la membrana de los endotelios de las zonas de inflamación. Las P selectinas se encuentran en el endotelio dentro de los gránulos de Weibel-Palade, pero como consecuencia de la acción de los mediadores tempranos de la inflamación como la histamina, pasan a ubicarse en la cara de la membrana plasmática que da hacia la luz del vaso. Cuando se une el leucocito a la P selectina, se genera un mensaje en el endotelio, que lleva a cambios en el citoesqueleto y en la expresión en la membrana de la E selectina. Los leucocitos tienen sacáridos como el tetrasacárido sialil-Lewis rico en fucosa y ácido siálico al que reconoce la selectina. Estas interacciones no son muy rígidas y, por lo tanto, el leucocito se desplaza mientras se une a distintas moléculas de lectina en la pared del vaso. Esto origina el proceso de rodamiento. Las selectinas siguen generando cambios en los endotelios que entonces expresan integrinas, moléculas de adhesión que generan una unión más firme con los leucocitos, paso previo indispensable a la diapedesis y por lo tanto a la llegada de las células inflamatorias a los tejidos (Vestweber y Blanks 1999)(Fig. 10).

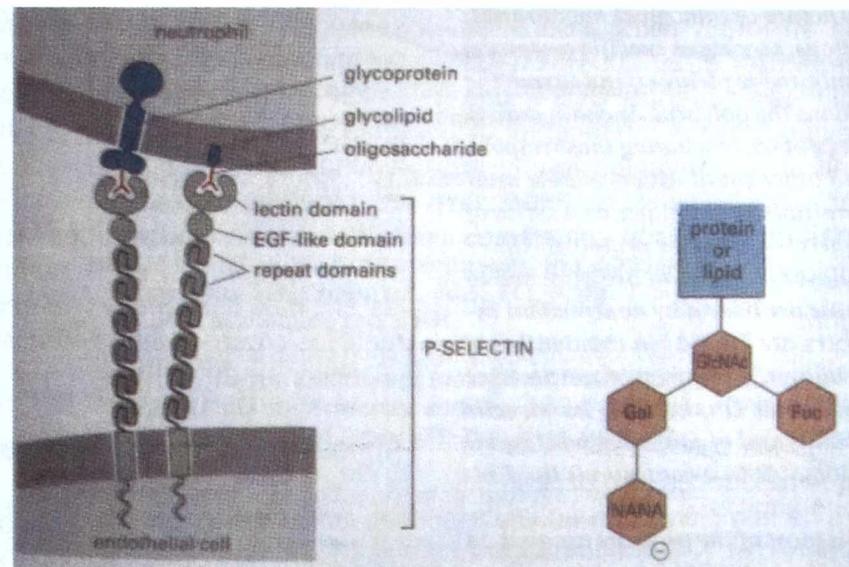


Fig. 10. Interacción leucocito-endotelio en la primera fase de la reacción inflamatoria. A la izquierda se presenta la unión entre selectinas y oligosacáridos en glicoproteínas y glicolípidos. A la derecha se observa una secuencia con afinidad por selectinas.

Algunas lectinas de tipo C están involucradas en la respuesta inmune. Por ejemplo, en las células dendríticas existe una sustancia de esta clase que reconoce al carbohidrato de la glicoproteína I-CAM 3 de los linfocitos T, permitiendo la unión entre estas células para que pueda ocurrir la presentación antigénica. Estos receptores reconocen sectores ricos en manosa, el virus del SIDA posee glicoproteínas ricas en este azúcar y de esta forma las células dendríticas pueden transportar en sus membranas al retrovirus llevándolo hasta los linfocitos. Posteriormente, el virus se

une al CD4 de los linfocitos T y es internalizado. Otro grupo de lectinas relacionadas con los sistemas de defensa del organismo es el de las colectinas, que son oligómeros de lectinas de tipo C con afinidad por manosa. Existen sustancias de este tipo en el suero y en el surfactante pulmonar. Las mismas se unen a la manosa que es muy abundante en el exterior de ciertos microorganismos. La superficie de la bacteria u hongo queda entonces recubierta de lectinas que se oligomerizan formando las colectinas. Los macrófagos poseen receptores de alta afinidad por las

colectinas y fagocitan a los microorganismos, las colectinas entonces actúan como opsoninas que favorecen la fagocitosis (Taylor y Drickamer 2003). Las ficolinas son un grupo de lectinas independientes de calcio que funcionan en forma semejante a las colectinas (Müller et al. 2004). En las células NK se encuentra CD94, una lectina de tipo C que es un receptor de membrana cuya activación inhibe la función asesina (Müller et al. 2004).

Las lectinas de tipo I, son semejantes a inmunoglobulinas y se unen a ácido siálico estas lectinas se denominan siglecs. En este grupo se incluyen a la sialoadhesinas, a la glicoproteína asociada a la mielina y al CD22. Existen también algunos casos especiales de lectina I que reconocen otro azúcar; tal es el caso de la molécula de adhesión del tejido nervioso, N-CAM, una lectina que reconoce manosa. Las sialoadhesinas ligan al ácido siálico o neuramínico unido a galactosa. No se conoce exactamente su función, aunque se cree que intervienen en los procesos de adhesión de los macrófagos. La glicoproteína asociada a mielina es indispensable para la unión de la vaina de mielina al axón. La CD22 de los linfocitos B es una lectina que al unirse a los ácidos siálicos inicia una cascada de reacciones en estas células (Crocker y Varki 2001, Taylor y Drickamer 2003).

Las galectinas son proteínas de unión a galactosa de las que existen formas celulares y formas secretadas. Estas últimas tienen, entre otras funciones, la de regular la proliferación y muerte celular. Por ejemplo, la galectina 1 se une a CD45 de los linfocitos T e induce su apoptosis (Danguy et al. 2002), mientras que la galectina 3 funciona como antiapoptótico (Müller et al. 2004).

Recientemente se demostró la importancia de esta galectina para que las células de melanomas escapen a la destrucción por parte de los linfocitos (Rubinstein et al. 2004).

Las lectinas de tipo P también se encuentran en la membrana celular, donde actúan como receptores para el IGF-II (factor de crecimiento semejante a insulina tipo II) y, además, en algunas células como las endoteliales del hígado y los macrófagos permiten la endocitosis mediada por receptores de glicoproteínas, especialmente de las enzimas lisosomales liberadas durante los procesos inflamatorios (Taylor y Drickamer 2003).

Aplicaciones de las lectinas

Dentro de las aplicaciones más comunes de las lectinas se pueden citar:

- Aglutinación de glóbulos rojos, linfocitos, células tumorales, etc.

- Estimulación de la proliferación y diferenciación linfocítica.

- Caracterización de carbohidratos, en cortes de tejidos para microscopía óptica y electrónica, en frotis e improntas y en el material obtenido de Western-blot y de determinaciones cromatográficas (Coggi et al. 1983, Ponder 1983, Damjanov 1987, Jeffrey et al. 1987, Danguy et al. 1998).

Las dos primeras aplicaciones surgen de la capacidad de una misma molécula de lectina para unirse a más de una molécula de carbohidrato. Una lectina puede actuar como puente que une distintas células, lo que permite la aglutinación. Además la unión de más de una lectina permite que ciertos receptores se activen; este es el mecanismo por el cual son capaces de estimular la proliferación y diferenciación de los linfocitos.

Dentro de las aplicaciones de las lectinas resulta de especial interés su uso como marcadores tisulares.

Las lectinas pueden emplearse para identificar células que son difíciles de discriminar con técnicas convencionales. En algunos casos reemplazan procedimientos más complejos y costosos, como por ejemplo la inmunohistoquímica. La lectinhistoquímica posee un nivel de especificidad mayor que otras técnicas utilizadas para determinar carbohidratos, como el PAS o los Alcianes. Sin embargo, la especificidad de la técnica no es tan alta como la de aquellas basadas en las uniones Ag-Ac (Barbeito et al. 2003).

Con las lectinas se pueden observar cambios en la expresión de carbohidratos que ocurren con la diferenciación celular

Por ejemplo: los epitelios del útero, la vagina y las trompas uterinas modifican su patrón de unión a lectinas a lo largo del ciclo estral (Ball et al. 1997, Walter y Bavdek 1997) o menstrual y también cambian en la menopausia de la mujer (Gheri et al. 2001); las células de la placenta modifican sus carbohidratos a lo largo del desarrollo. Además los distintos tipos de células del trofoblasto poseen distinto patrón de afinidad por las lectinas (Fernández et al. 2000, Stewart et al.

2000); en el caso de los novillos tratados con anabólicos estrogénicos, el cambio en la diferenciación celular del epitelio prostático (manifestado por la aparición de metaplasia e hiperplasia) genera cambios en el patrón de unión a lectinas (Fernández et al. 2004); en la sustancia intercelular hay cambios durante la diferenciación tisular (Ohno et al. 1986); RCA-I y WGA marcan endotelio en todas las especies estudiadas, mientras que UEA-I marca endotelio sólo en el hombre (Barbeito et al. 2003).

Su empleo en patología está más relacionado con el estudio de la patogenia de las enfermedades que con el diagnóstico. Así por ejemplo, se determinó que existen cambios del patrón de unión a lectinas en: el intestino de ciertas enteritis como la enfermedad de Crohn y en la paratuberculosis (Massone et al. 1991); la epididimitis de los carneros (Paolicchi et al. 1995); el epitelio uterino de vacas infectadas con *Campylobacter* (Cipolla et al., 1998) y de vacas (Cobo et al. 2004)(Fig. 11) y ratones con *Tritrichomona foetus* (Monteavaro et al., datos no publicados); enfermedades placentarias (Fernández et al. 1998); la aorta en la que se detectan modificaciones previas a la calcificación metastática que ocurre en el entequo seco (Gimeno 1993).

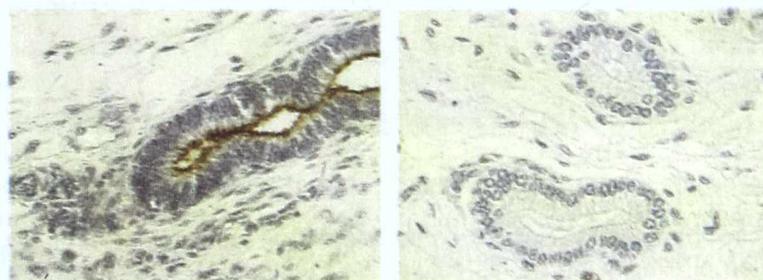


Fig. 11. Glándulas de la mucosa uterina de vacas infectadas experimentalmente con *Tritrichomona foetus*. La porción superficial del epitelio muestra clara reactividad por la lectina PNA (Peanut, *Arachis hypogaea*)(izquierda). La reacción es negativa en los animales normales (derecha).

Dentro de los casos en los que pueden utilizarse para el diagnóstico histopatológico específico se hallan las enfermedades de almacenamiento que ocurren por déficit de enzimas lisosomales (Alroy et al. 1986, Driemeier et al. 2000, Rivero et al. 2001)(Fig. 12). En cuanto a sus aplicaciones prácticas referentes a las neoplasias, hasta el momento sólo se ha extendido en patología humana el uso de PNA como marcador de malignidad en tumores de colon y de UEA-I como marcador de neoplasias vasculares. Dentro de las neoplasias

de los animales domésticos el tumor venéreo transmisible posee un patrón bien definido de marcación (Gimeno et al. 1995). Mas recientemente, en nuestro laboratorio, se utilizó para diferenciar entre linfangiosarcomas y hemangiosarcomas caninos (Diessler et al. 2003).

La expresión de galectinas en las células tumorales puede ser utilizada como pronóstico; recientemente se ha postulado el uso de anticuerpos antigalectinas para el tratamiento de las neoplasias (Rubinstein et al. 2004).

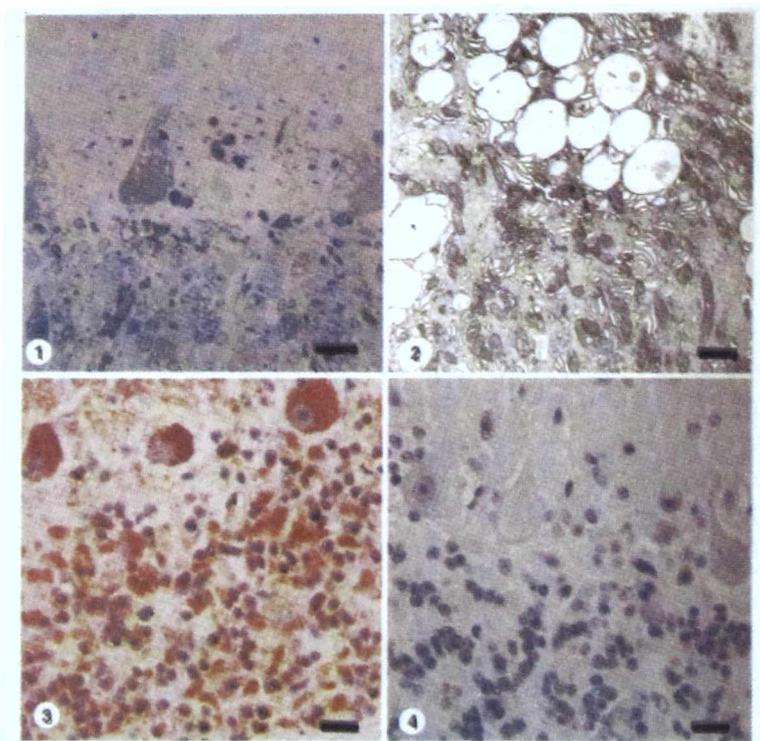


Fig. 12. Intoxicación en cabras por *Sida carpinifolia*. Con la microscopía óptica se reconocen vacuolas en el citoplasma de las células de Purkinje (1), el microscopio electrónico muestra dilatación de lisosomas (2), el material acumulado es positivo a lectinas que reconocen a-manosa (3) y es negativo a lectinas que reconocen otros carbohidratos (4). La enfermedad fue caracterizada como una a-manosidosis adquirida.

Perspectivas futuras

Resulta difícil predecir el futuro de la glicobiología. No obstante, considerando que el reconocimiento de carbohidratos está involucrado en casi todos los rincones de la biología, el desarrollo potencial de este campo de estudio es enorme (Sharon y Lis 1993). En consecuencia, no resulta sorprendente la frenética actividad científico-técnica de la glicobiología en relación con el diseño de nuevas drogas que ha llevado a la aparición de una glicoterapéutica. Compuestos que contengan carbohidratos de composi-

ción definida o moléculas similares a lectinas podrían ser utilizados para el tratamiento de diversas condiciones de importancia médica. Entre otras acciones, podrían bloquear la adherencia de virus y bacterias, modular la expresión de moléculas de adhesión en células inmunocompetentes, regular la adhesión y migración de leucocitos en la inflamación, actuar como anticonceptivos al impedir la adhesión durante el proceso de implantación, aumentar la vida media de enzimas y hormonas, prevenir la implantación de células neoplásicas (Karlsson 1991, Sharon y Lis 1993).

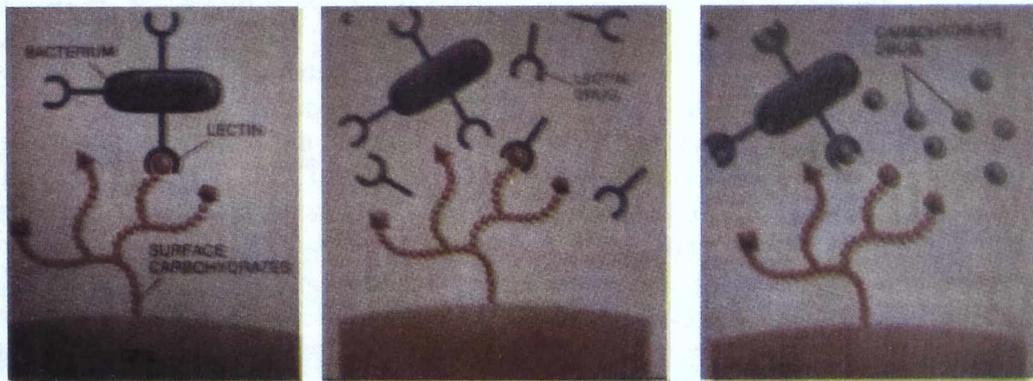


Fig. 13. La adherencia bacteriana (izquierda), y consecuentemente su patogenicidad, podrían bloquearse mediante lectinas (centro) o carbohidratos (derecha) específicos

Otro aspecto importante en la farmacología es la glicosilación de proteínas creadas por ingeniería genética. Ya se comentó que las bacterias tienen un patrón de glicosilación diferente a los eucariotas, por lo tanto las proteínas humanas que sintetizan los microorganismos transgénicos no tienen una adecuada glicosilación, lo que puede alterar su función biológica; el incremento en el conocimiento

de los mecanismos de glicosilación permitirá corregir estos problemas (Karlsson 1991, Taylor y Drickamer 2003).

El análisis concomitante de las dos partes del sistema de codificación glicobiológica, de gran potencial regulatorio, permitirá una mejor identificación de células y la predicción de su comportamiento biológico (Gabiús et al. 1991). La lectinhistoquímica

permite, según ya fue explicado, la detección fácil de carbohidratos celulares. Se han desarrollado distintas técnicas con el objetivo de demostrar **lectinas endógenas**. El camino más obvio para detectar receptores, consiste en emplear el ligando natural como sonda marcada. Una de las herramientas diseñadas con esa finalidad, ha consistido en la selección de un ligando específico y conjugarlo con una molécula de soporte. Ese compuesto, que permite detectar sitios de adherencia de carbohidratos se denomina «neoligandoproteína». Otro método consiste en modificar proteínas inertes por glicosilación química, esos productos cumplen con los requerimientos para identificar eficientemente receptores de glúcidos. Ya que la glicosilación se realiza artificialmente, la molécula así diseñada se denomina neoglicoproteína (Gabiús 1991). La combinación de la glicohistoquímica con neoglicoproteínas marcadas, inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para lectinas endógenas y la lectinhistoquímica abren una gama prácticamente infinita para estudiar las interacciones entre proteínas y carbohidratos en condiciones norma-

les y patológicas. Resulta posible avizorar que los estudios sobre lectinhistoquímica solamente son el primer paso en un campo de importancia creciente en patología básica y aplicada (Danguy 1995, Brockhausen et al. 1998).

La bioquímica y la biología celular han alcanzado un nuevo nivel de complejidad. Una vez conocido el genoma humano, la determinación del proteoma (totalidad de proteínas de un individuo, su localización y sus variaciones) parecía ser una meta final. Sin embargo, hoy al ser considerados los glúcidos como elementos fundamentales en el reconocimiento celular y la transmisión de mensajes, se debe pensar en un nuevo objetivo para la biología celular y molecular: el desciframiento del último resultado de la expresión génica, la totalidad de los sacáridos expresados en el organismo, lo que se ha denominado el glicoma (Feizi 2000, Khersonsky et al. 2003). Vale la pena finalizar con una frase de Montreuil (1995): "Junto con los ácidos nucleicos y con las proteínas, los carbohidratos representan la tercera dimensión de la Biología Molecular".

Bibliografía

1. Alberts B, Dennis B, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. Molecular biology of the cell. 3 ed. Garland Publishing. New York. 1994.
2. Alroy J, Ucci AA, Goyal V and Woods W. Lectin histochemistry of glycolipid storage diseases on frozen and paraffin-embedded tissue sections. J. Histochem. Cytochem. 34, 501-505, 1986.
3. Balding P. Lectins: Sugar-specific or receptor-specific proteins? In: Bog-Hansen TC and Freed DLJ; Lectins: Biology, Biochemistry Clinical Biochemistry, vol 1 p. 11-16, Ed. Walter de Gruyter Berlín, 1981.
4. Ball BA, Dobrinski I, Fagnan MS and Thomas PGA. Distribution of glycoconjugates in the uterine tube (oviduct) of horses. Am. J. Vet. Res. 58, 816-822, 1997.
5. Barbeito, C, Massone AR y Quiroga MA. Introducción a las Técnicas de Lectinhistoquímica. Aplicaciones en Patología Veterinaria. En Manual del Decimoquinto Curso Internacional de posgrado en Técnicas de Inmunohistoquímica, Lectinhistoquímica y Microscopía Electrónica. Editado por el Instituto de Patología y el Servicio Central de Microscopía Electrónica de la FCV UNLP. Pág.. 37-49, 2003.
6. Barondes SH. Soluble lectins: A new class of extracellular proteins. Science 223, 1259-1264, 1984.
7. Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. Biochem. Bioph. Acta 1473, 67-95, 1999.
8. Brockhausen I, Schutzbach J, Kuhns W. Glycoproteins and their relationship to human disease. Acta Anat. (Basel) 161, 36-78, 1998.
9. Castagnaro M and Canese MG. Lectin histochemistry on squamous metaplasia in different epithelial tumors of dogs. Vet. Pathol. 28, 8-15, 1991.
10. Chrispeels MJ and Raikhel NV. Lectins, lectins genes, and their role in plant defense. Plant Cell 3, 1-9, 1991.
11. Cipolla AL, Paolicchi FA, Casaro AP, Massone AR and Gimeno EJ. Lectin binding sites in uterus and oviduct of normal and *Campylobacter fetus* -subspecies *venerealis*-infected heifers. Eur. J. Histochem. 42, 63-70, 1998.
12. Clausen H, Bennet E and Dabelsteen E. Carbohydrates of the cell surface: molecular aspects of glycosyltransferases and their genes. APMIS (Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.) (suppl 27) 100, 9-17, 1992.
13. Coggi G, Dell'Orto P, Bonoldi E, Doi P and Viale G. Lectins in diagnostic pathology.

In: Bog-Hansen TC and Spengler GA; Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, p. 87-103, Ed. W. de Gruyter, Berlin and New York, 1983.

14. Cobo ER, Campero CM, Gimeno EJ and Barbeito CG. Lectin binding and immunohistochemical antigen detection in genitalia of *Tritrichomonas foetus*-infected heifers. J. Comp. Pathol. (In press).

15. Cooper HS, Farano P and Copman RA. Peanut lectin binding sites in colon of patients with ulcerative colitis. Arch. Pathol. Lab. Med. 111, 270-275, 1987.

16. Crocker, P. and Varki, A. Siglecs in the immune system. Immunol. 103, 137-145, 2001.

17. Damjanov I. Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab. Inv. 57, 5-20, 1987

18. Danguy A, Camby Y and Kiss R. Galectins and cancer. Biochem. Bioph. Acta 1572, 285-293, 2002

19. Danguy A, Decaestecker C, Genten F, Salmon I and Kiss R. Application of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology. Acta Anat. 161, 206-218, 1998.

20. Danguy A, Genten F and Gabius H. Histochemical evaluation of biotinylated neoglycoproteins for the detection of endogenous sugar receptors in fish skin. Eur. J. Bas. Appl. Histochem. 35, 341-357, 1991.

21. Danguy A, Kiss R and Pasteels JL. Lectins in histochemistry. A survey. Biol. Struct. Morph. 1, 93-106, 1988.

22. Delbes, PJ. The role of glycosilation in autoimmune disease. Autoimmunity 27:239-253, 1998.

23. Dennis JW, Granovsky M. and Warren C.E. Glycoprotein, glycosilation and cancer progression. Biochem. Bioph. Acta 1473, 21-34, 1999.

24. Dennis JW, Granovsky M and Warren CE Protein Glycosilation in development and disease. Bioassays 21, 412-421, 1999.

25. Diessler ME, Castellano MC, Massone AR, Allende MG, Idiart JR and Gimeno EJ. Cutaneous lymphangiosarcoma in a young dog: clinical, anatomopathological and lectin histochemical description. J. Vet. Med. A 50, 452-456, 2003.

26. Doyle RJ. Lectins in diagnostic microbiology. Biotech.1, 5-9, 1982.

27. Drickamer K and Taylor M. Biology of animal lectins. Ann. Rev. Cell. Biol. 9, 237-264, 1993.

28. Drickamer K and Taylor ME. Evolving views of protein glycosylation. Trends Biochem. Sci. 23, 321-324, 1998.
29. Driemeier D., Colodel EM, Gimeno, E.J and Barros SS. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. Vet. Pathol. 37, 153-159, 2000.
30. Farnum CE and Wilsman NJ. In situ localization of lectin-binding glycoconjugates in the matrix of growth-plate cartilage. Am. J. Anat. 176, 65, 1986.
31. Fernández PE, Barbeito CG, Portiansky EL and Gimeno EJ. Intermediate filament proteins expression and sugar moieties of the normal canine placenta. Histol. Histopathol. 15, 1-6, 2000.
32. Fernández PE, Portiansky EL Barbeito CG and Gimeno EJ. Characterization of cytotrophoblastic-like cells present in subinvolutioned placental sites of the bitch. Histol. Histopathol. 13, 995-1000, 1998.
33. Fernández PE, Barbeito CG, Portiansky EL, and Gimeno EJ. Lectin binding pattern in hyperplastic and metaplastic bullock prostatic tissues after diethylstilbestrol (DES) administration. Vet. Rec. 154:298-303. 2004.
34. Fiezi T. Progress in deciphering the information content of the 'glycome'- a crescendo in the closing years of the millennium. Glycoconj. J. 17, 553-565, 2000.
35. Gabius HJ. Detection and functions of mammalian lectins with emphasis on membrane lectins. Biochem. Bioph. Acta 1071, 1-18, 1991.
36. Gahmber C, Kotovori P and Tontii E. Cell surface carbohydrate in cell adhesion. Sperm cells and leukocytes bind to their target cells through profile oligosaccharide ligands. APMIS. Suppl 27. 100, 39-52, 1992.
37. Gheri G, Noci I, Sgambati E, Borri P, Taddei G and Gheri Bryk S. Ageing of the human oviduct: lectin histochemistry. Histol Histopathol. 16:21-28, 2001.
38. Gimeno EJ. Estudio lectinohistoquímico en aortas de bovinos intoxicados con *Solanum glaucophyllum*. I Congr. Intern., Fac. C. Vet., Univ. Nac. de La Plata y VII Jornadas Intern. Veter. Therios y Pet's Ciencia. La Plata, 5-11-1993.
39. Gimeno EJ, Massone, AR, Marino FP and Idiart JR. Intermediate filament expression and lectin histochemical features of canine transmissible venereal tumour - APMIS (Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.) 103, 645-650, 1995.
40. Goldstein IJ and Hayes CE. The lectins: carbohydrate binding proteins of plants and animals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35, 127-340, 1978.
41. Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T and Sharon N. What should be called a lectin?. Nature 285, 66, 1980.

42. Hakomori S. Aberrant glycosilation in cancer cell membranes on focused on glycolipids. Overview and perspectives. *Cancer Res.* 45, 2405-2414, 1995.
43. Hansen JE, Nielsen C and Vestergaard H. Inhibition of human immunodeficiency virus 1 and Herpes simplex virus 1 infectivity with a broad range lectins. *Scand. J. Infect. Dis.* 23, 425-430, 1991.
44. Hauri HP, Appenzeller C, Kuhn F and Nufer O. Lectins and traffic in the secretory pathway. *FEBS Letters* 476, 32-37, 2000.
45. Hold GD. Identifying glycoconjugate-binding domains. Building in the past. *Glycobiology* 1, 329-336, 1991.
46. Itagaki S, Perfumo CJ, Petruccelli MA and Doi K. Lectin histochemical changes of colon goblet cell mucin in rabbit mucoid enteropathy. *Lab. Anim. Sci.* 44, 82-84, 1994.
47. Jeffrey IJM, Mosley SM, Jones CP and Stoddart RW. Proteolysis and lectin histochemistry. *Histochem. J.* 19, 269-275, 1987.
48. Karlsson KA *Glycobiology: a growing field for drug design.* *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 265-272, 1991.
49. Khersonsky SM, Ho CM, Garcia MA and Chang YT. Recent advances in glycomics and glycogenetics. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 617-643, 2003.
50. Lodish H, Berk A, Sipurski SL, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell J. *Biología celular y molecular. Cuarta Edición.* Editorial Panamericana. Buenos Aires, 2002.
51. Lutzig AD, Zerbino DD and Panasjuk EN. Histochemical investigation of dissecting aortic aneurism by means of lectins with different carbohydrate specificity. In: *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.* Vol. 7, pg. 379-383. *Proc. Tenth Lectin Meet., Prague, 1988.* Ed. Sigma Co., St.Louis, Mo., 1990.
52. Massone AR, Itagaki S, Doi K and Gimeno EJ. Lectin histochemical study in normal and Paratuberculosis affected bovine ileum. *J. Vet. Med. Sci.* 53, 761-763, 1991.
53. Monsigny M, Roche AC, Maget-Dana R and Delmotte F. Sugar - lectin interactions: How does Wheat-Germ Agglutinin bind sialoglycoconjugates?. *Eur. J. Biochem.* 104, 147-153, 1980.
54. Montreuil J. The history of glycoprotein research, a personal view. In: *Glycoproteins* (J. Montreuil, F.J. Vliegthart and H. Schachter, eds). Amsterdam: Elsevier, pp 1-12, 1995.
55. Müller I, Jenner J, Handgretinger R, Riberdy J and Kerst G. Glycosilation and

lectins-examples of immunosurveillance and immune evasion. *Histol and Histochem.* 19, 527-533. 2004.

56. Ohno J, Tajima Y and Utsumi N. Binding of wheat germ agglutinin in the matrix of rat tracheal cartilage. *Histochem. J.* 18, 537, 1986.

57. Opdenakker G, Rudd PM, Ponting C and Dwek R. Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J.* 7, 1330-1337, 1993.

58. Oriol R, Mollicone R, Coullin P, Dalix, A. and Candelier, J. Genetic Regulation of ABH and Lewis antigens in tissues. *APMIS (Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.) (Suppl 27)* 100, 28-38, 1992.

59. Padilla-Vaca, F. and Anaya-Velázquez, F. Biochemical properties of a neuraminidase of *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* 83, 1001-1006, 1997.

60. Paolicchi FA, Cipolla AL, Casaro A, Massone AR, Itagaki S and Gimeno EJ. Lectin binding pattern in genital tissues of normal and *Brucella ovis* infected rams. *J. Veter. Med. Sci.* 57, 935-938, 1995.

61. Plendl J and Sinowatz F. Glycobiology of the olfactory system. *Acta Anat* 161, 234-253, 1998.

62. Ponder BAJ. Lectin Histochemistry. In Polack M and Van Noorden S, Eds. *Immunocytochemistry. Practical applications in pathology and biology.* London, PSG Wright, 1983.

63. Rivero R, Kautz S, Gomar MS, Barros SS and Gimeno EJ.. Enfermedad de almacenamiento lisosomal en terneros del norte del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 36, 5-9, 2001.

64. Roth J. Cellular sialoglycoconjugates: a histochemical perspective. *Histochem. J.* 25, 687-710, 1993.

65. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL and Rabinovich GA. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell.* 5, 241-251. 2004.

66. Rüdiger H Lectins-an introduction In: Bog-Hansen TC and Freed DLJ; *Lectins: Biology, Biochemistry Clinical Biochemistry*, vol 1 p. 3-10, Ed. Walter de Gruyter Berlín, 1981.

67. Shapiro RG *Glycoproteins: their biochemistry, biology and role in human disease.* *New England J. Med.* 281, 1043-1056, 1969.

68. Sharon N and Lis H. Carbohydrates in Cell Recognition. *Sci. Am.* 68, 74-81, 1993.
69. Sharon N and Lis H Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246, 227-234, 1989.
70. Sharon N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends Biochem. Sci.* 18, 221-226, 1993.
71. Slifkin M and Doyle RJ. Lectins and their application to clinical Microbiology. *Clin. Microb. Rev.* 3, 197-217, 1990.
72. Spicer SS and Schulte BA. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: A perspective. *J. Hist. Cytochem.* 40, 1-38, 1992.
73. Spicer SS, Leppi TJ and Stoward PJ. Suggestions for a histochemical terminology of carbohydrate-rich tissue components. *J. Histochem. Cytochem.* 13, 599-603, 1965.
74. Stewart IJ, Bebington CR and Mukhtar DDY. Lectin binding characteristics of mouse placental cells. *J. Anat.* 196, 371-378, 2000.
75. Stoward PJ, Spicer SS and Miller RL. Histochemical reactivity of peanut lectin-horseradish peroxidase conjugate. *J. Histochem. Cytochem.* 28, 979-990, 1980.
76. Straus GJ and Dekker J. Mucin-type glycoproteins. *Critical Rev. Bioch. Mol. Biol.* 27, 57-92, 1993.
77. Stryer, L. *Bioquímica*. Cuarta edición. Editorial Reverte, 1995.
78. Taylor M.E. and Drickamer K. *Introduction to Glycobiology*. Oxford University Press. pp:207, 2003.
79. Vestweber D and Blanks J. Mechanism that regulate the function of selectins and their ligands. *Physiol. Rev.* 79, 181-213, 1999.
80. Walker RA. The use of lectins in Histology and Histopathology. A review. In: Bog-Hansen TC and Freed DLJ; *Lectins: Biology, Biochemistry Clinical Biochemistry*, p. 591-600, Ed. Sigma Chemical Co. St. Louis, 1988.
81. Walter I, and Bavdek S. Lectin binding patterns of porcine oviduct mucosa and endometrium during the oestrus cycle. *J. Anat.* 190, 299-307, 1997.
82. Wassarman PM. Role of carbohydrates in receptor-mediated fertilization in mammals. En *Carbohydrate recognition in cellular function*. Ciba Foundation Symposium 145. pp:135-155. Wiley-Interscience, 1989.
83. Wassarman PM, Jovine L and Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biol.* 3:E59-E64, 2001.