



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y CENTRO
DE QUÍMICA-INSTITUTO DE CIENCIAS**

BUAP

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GALECTINA- 9 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CÉRVIX”

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO
DE: MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS EN EL
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

PRESENTA:

Q.F.B. DANIEL MÁXIMO SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. JOSE GUSTAVO LÓPEZ Y LÓPEZ

ASESOR DE TESIS:

Dra. VERONICA VALLEJO RUIZ

PUEBLA, PUE.

MAYO 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (304686).



Al Instituto Mexicano del Seguro Social por la beca otorgada (98227567).

Al Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social por el espacio permitido para la realización de ésta tesis.



A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo aportado (VIEP/0248/2016) para la conclusión de ésta tesis.



Esta tesis contó con apoyo financiero de:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SALUD-2012-C01-180219 y el Instituto Mexicano del Seguro Social No. FIS/IMSS/PROT/G15/1447

A mi familia:

Por haber confiado en mí y por todo el apoyo que me brindaron.

A mi novia:

Por estar conmigo y motivarme para seguir adelante.

Con amor y agradecimientos infinitos.

Daniel

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Generalidades de Cáncer Cérvicouterino.....	1
1.1. Epidemiología.....	1
1.2. Diagnóstico.....	1
1.3. Estadificación.....	2
2. Glicosilación.....	4
2.1 Alteraciones de la glicosilación.....	6
2.2 Ácido siálico y sialiltransferasas.....	7
2.3 Galactosa.....	8
2.4 Funciones de los glicanos en cáncer y su asociación con la progresión.....	8
2.5 Alteraciones de la glicosilación en Cáncer Cérvicouterino.....	9
3. Familia de Galectinas.....	10
3.1 Estructura y propiedades bioquímicas de las galectinas.....	10
3.2 Secreción.....	13
3.3 Especificidad de galectinas a carbohidratos.....	13
3.4 Funciones intracelulares y extracelulares de galectinas.....	15
3.5 Alteraciones de galectinas en el cáncer.....	17
3.6 Funciones de galectinas en cáncer.....	18

3.6.1 Transformación tumoral.....	18
3.6.2 Apoptosis.....	19
3.6.3 Crecimiento tumoral.....	20
3.7 Galectinas en metástasis tumoral.....	20
3.7.1 Adhesión.....	21
3.7.2 Migración e invasión.....	22
3.7.3 Angiogénesis.....	23
3.7.4 Escape de la respuesta inmune.....	23
3.8. Expresión de galectinas y la prognosis.....	24
4. Galectina-9.....	24
4.1 Ligandos de unión de gal-9.....	25
4.2 Funciones de gal-9.....	26
4.3 Gen de gal-9.....	28
4.4 Variantes de ARNm de gal-9.....	29
4.5 Alteraciones de gal-9 en cáncer.....	30
4.6 Alteraciones de gal-9 en Cáncer Cérvicouterino.....	32
JUSTIFICACIÓN.....	34
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
HIPÓTESIS.....	34
OBJETIVOS.....	35
MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
RESULTADOS.....	42

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	54
CONCLUSIONES.....	59
PERSPECTIVAS.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
AS	Ácido siálico
ASC	Células escamosas atípicas
ASC-H	Células escamosas atípicas en las que el alto grado de lesión intraepitelial escamosa no puede ser excluido
ASC-US	Células escamosas atípicas de importancia incierta
Bcl-2	Linfoma de células B-2
CaCu	Cáncer Cérvicouterino
ccRCC	Carcinoma de células renales de tipo células claras
CIN	Neoplasia intraepitelial cervical
CV	Citología Cervicovaginal
DIU	Dispositivo Intrauterino
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRC	Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos
DRC-C	DRC C-terminal
DRC-N	DRC N-terminal
ECA	Quimioatrayente de eosinófilos (por sus siglas en inglés eosinophil chemo-attractant)
ETS	Enfermedades de transmisión sexual
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
Gal	Galactosa
gal-1	Galectina- 1
gal-3	Galectina-3
gal-9	Galectina-9
gal-9L	Gal-9 tamaño largo
gal-9M	Gal-9 tamaño mediano
gal-9S	Gal-9 tamaño corto
GalNAc	N-acetilgalactosamina

Glut-2	Transportador de glucosa 2
HDAC3	Histona deacetilasa 3
HRP	Peroxidasa del rábano (por sus siglas en inglés Horseradish peroxidase)
IFN- γ	Interferón gamma
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado
Lac	Lactosa
LacNAc	N-acetil-lactosamina
LGALS	Lectin, Galactoside-binding, Soluble
LIAG	Lesión intraepitelial de alto grado
LIBG	Lesión intraepitelial de bajo grado
MEC	Matriz Extracelular
Neu5Ac	Ácido N-Acetilneuramínico
NF-IL6	Factor nuclear interleucina 6
OMS	Organización Mundial de la Salud
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
poli-LacNAc	Polilactosamina
ppGalNAcT	Poli-peptidil- α GalNAc
SBF	Suero bovino fetal
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
ST	Sialiltransferasas
sTn	Sialil-Tn
Th1	Células T cooperadoras tipo 1
Th17	Células T cooperadoras tipo 17
Tim3	Mucina-inmunoglobulinas de células T 3
Tn	Thomsen-nouvelle
Tregs	Células T reguladoras
UDP-gal	Uridina difosfato-galactosa
VPH	Virus de Papiloma Humano

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de Cáncer Cérvicouterino

1.1. Epidemiología

El cáncer cérvicouterino (CaCu) en el 2012 ocupó el cuarto lugar de mortalidad por cáncer y el mismo lugar en incidencia a nivel mundial (1), mientras que en el mismo año en nuestro país el CaCu ocupó el segundo lugar de causa de muertes por cáncer en la población femenina (2).

La infección persistente con ciertos tipos de virus de papiloma humano (VPH), representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de CaCu. El ADN de estos virus ha sido identificado en más del 99% de los tumores malignos de cérvix (3). Los VPHs tipos 16 y 18 son los más frecuentemente encontrados en tumores malignos, dado su papel en la transformación maligna se les ha considerado dentro de los VPHs de alto riesgo (4). Alrededor del 90% de las mujeres infectadas con algún tipo de VPH de alto riesgo (5) logran eliminar la infección, resultado de una respuesta inmune adecuada. La infección persistente sumada a otros factores participan en el desarrollo de la enfermedad como: número de embarazos, uso de anticonceptivos orales por más de cinco años, tabaquismo, otras infecciones de transmisión sexual (ETS) y la desnutrición (6,7). La edad temprana de inicio de relaciones sexuales, el número de compañeros sexuales, los antecedentes de enfermedades de transmisión sexual (ETS) se vinculan con la probabilidad de contraer la infección con VPH. La edad avanzada, la carga viral elevada y nivel socioeconómico bajo se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en mujeres VPH positivas (8).

1.2. Diagnóstico

Hoy en día existen métodos de detección oportuna del CaCu que tienen como objetivo fundamental prevenir la morbilidad y mortalidad. En los últimos 40 años, se ha utilizado en México la citología cervicovaginal (CV) con tinción de Papanicolaou como método tradicional de detección oportuna de CaCu, que tiene una sensibilidad de 50 a 84% y una especificidad de 90 a 95%, otro método utilizado es la Colposcopia que tiene una sensibilidad del 95% y una

especificidad del 63% (9); sin embargo, estos métodos no siempre son “exactos”, ya que se pueden reportar falsos positivos y falsos negativos, debido entre otras cosas, a la evaluación e interpretación de la muestra por personal poco capacitado, lo que lleva a una interpretación errónea. Tratando de resolver esta problemática, se han desarrollado nuevas estrategias de diagnóstico, se ha observado una alta relación entre la presencia de VPH de alto riesgo y una carga viral elevada con estadios de lesiones intraepiteliales precursoras de CaCu (10,11,12). Por lo que la detección del VPH, sumado a la citología cervical incrementa la sensibilidad para la detección oportuna del CaCu; sin embargo, por su alto costo no se realizan de manera rutinaria en México. Los métodos más utilizados son Captura de Híbridos 2 (Qiagen), PCR en tiempo real (Aptima), PCR (Roche) y PCR (Cervista) (9). Un diagnóstico efectivo es resultado de los siguientes factores: un programa organizado, alta cobertura de la población, repetición del tamizaje, capacitación y el control de la calidad del personal en todas las disciplinas y la eficacia del tratamiento de las anomalías detectadas (13,14).

1.3. Estadificación

La estadificación del CaCu tiene como objetivo principal clasificar la extensión de la enfermedad puesto que el pronóstico está determinado por el tamaño tumoral, extensión de la invasión miocervical, invasión parametrial, extensión de la pared pelviana, afectación de los ganglios linfáticos y presencia de metástasis a distancia, permitiendo comparar pacientes y métodos de tratamiento entre diferentes centros y dividir a los pacientes en grupos para conocer su pronóstico (15,16).

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) divide los carcinomas cervicouterinos en tres grupos principales: carcinomas epidermoides (80-90%), adenocarcinomas y otros tumores (neuroendocrinos, adenoescamoso, de células vidriosas, indiferenciado y adenoideo) (10-20%) (7). Que a su vez, cada uno de estos grupos tiene subtipos histológicos (17). La subclasificación correcta de las neoplasias es importante para que el oncólogo pueda tomar la decisión terapéutica adecuada.

El CaCu es actualmente estadificado de acuerdo a los lineamientos de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), adoptado en 1950 en Nueva York durante

el Congreso Internacional de Ginecología y el Congreso Americano de Obstetricia y Ginecología, estableciendo cuatro estadios de la enfermedad. Los cambios más recientes son del 2009 y se establecieron en consenso entre diferentes sociedades y agencias internacionales (18). En México, la Secretaría de Salud implementó desde hace doce años el reporte citológico mediante el sistema Bethesda (modificado en 2001). El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los trabajadores del Estado (ISSSTE) actualmente utilizan un sistema de clasificación que es la combinación de otros sistemas anteriores (9).

El sistema Bethesda incluye tres grandes categorías (19):

Calidad de la muestra

- Adecuada para evaluación (presencia o ausencia de células de la zona de transformación)
- Inadecuada para evaluación (se debe especificar la razón: ausencia de células de la zona de transformación u otros indicadores de calidad)
- Si se observan anomalías celulares, automáticamente deberá considerarse adecuada para evaluación

Negativa para lesión intraepitelial o malignidad

- Casos que no tienen evidencia de lesión (epitelio normal)
- Presencia de microorganismos específicos: *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp.*, flora sugestiva de vaginosis bacteriana, bacterias consistentes con *Actinomyces sp.*, cambios celulares consistentes con herpes simple
- Cambios celulares reactivos asociados a inflamación, radioterapia, dispositivo intrauterino (DIU), células glandulares en pacientes post-histerectomizadas y atrofia

Anormalidad en células epiteliales

- Células escamosas atípicas (ASC): con dos subcategorías ASC-US a favor de un proceso reactivo y ASC-H donde no es posible descartar una lesión intraepitelial de alto grado
- Lesión intraepitelial de bajo grado (LIBG), abarcando: displasia leve/CIN 1 (por sus siglas en inglés de cervical intraepitelial neoplasia)

- Lesión intraepitelial de alto grado (LIAG), abarcando: displasia moderada y severa, carcinoma in situ; CIN 2 y CIN 3
- Carcinoma epidermoide

Tanto en el CaCu como en otros tipos de cáncer, durante el proceso de la transformación maligna existen numerosas alteraciones genéticas en las células que resulta en la alteración de protooncogenes y genes supresores de tumores, que como resultado generan clonas tumorales con diferentes propiedades (20). Por lo tanto las células malignas adquieren características que les permiten la separación del tumor, degradación de la matriz extracelular, invasión, adhesión y metástasis a órganos distantes (21). Las alteraciones en la glicosilación de los glicoconjugados de la superficie de las células cancerosas afectan las funciones celulares normales que eventualmente conducen a su comportamiento metastásico e invasivo, que es un rasgo característico de las células con mayor grado de malignidad (22).

2. Glicosilación

Los glicanos constituyen el más complejo y abundante grupo de moléculas en los organismos vivos. Además de jugar un papel importante en el almacenamiento y suministro de energía, a menudo sirven como precursores biosintéticos o como elementos estructurales.

Los glicanos complejos están frecuentemente unidos a proteínas, formando glicoproteínas, o a lípidos, formando glicolípidos. Los glicanos unidos a proteínas están involucrados en numerosos procesos biológicos esenciales incluyendo proliferación celular, diferenciación y migración, integridad y reconocimiento célula-célula, interacciones célula-matriz extracelular y patógeno-huésped, inmunomodulación y transducción de señales (23). Los glicanos se pueden unir de dos maneras a las proteínas: (i) a través de un residuo GlcNAc que es añadido a un residuo de asparagina (Asn) dentro de una secuencia peptídica consenso de Asn-X-Ser/Thr (donde X puede ser cualquier amino ácido excepto prolina) y son denominados N-glicanos o (ii) a través del grupo hidroxilo de un residuo GalNAc a un residuo de serina (Ser) o treonina (Thr) sobre el polipéptido dando origen a los O-glicanos (22).

Los N-glicanos son inicialmente ensamblados en el retículo endoplásmico y transferidos a un acarreador lipídico llamado dolicol-fosfato, para formar un donador de azúcar; Glc3Man9GlcNAc2-PP-dolicol, este gran oligosacárido es transferido del dolicol-fosfato a un residuo de asparagina en la secuencia antes mencionada. Todas la N-glicoproteínas comparten una estructura nuclear común constituida por el pentasacárido $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3) \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta\text{-Asp}$, al que se le adiciona una cantidad variable de monosacáridos para extender el pentasacárido original.

Los O-glicanos son ensamblados en el aparato de Golgi y comienza con el glicano O-GalNAc. Posteriormente es modificado por varias glicosiltransferasas, añadiendo los residuos de GlcNAc, galactosa, fucosa, o ácido siálico uno a uno de manera secuencial con diferentes tipos de enlace, resultando por ello en diferentes O-glicanos con estructura ramificada, compuestos por pocos residuos de monosacáridos.

La glicosilación es uno de los procesos más frecuentes que ocurre en las modificaciones co- o post-traduccionales hechas a proteínas y lípidos, resultando en la adición de cadenas de carbohidratos que tienen una secuencia oligosacárida compleja y una diversidad estructural. La apropiada y correcta síntesis de las estructuras glicánicas depende de la acción de enzimas altamente específicas conocidas como glicosiltransferasas y glicosidasas, las cuales son expresadas diferencialmente en los tejidos y células. La estructura glicana estará determinada no sólo por la naturaleza de la proteína a la que se une, sino también por el tejido o célula donde se realiza la modificación (24).

Las proteínas que son destinadas a la superficie celular o al medio extracelular para ser incorporadas a la matriz extracelular típicamente se someten a la glicosilación por la vía del retículo endoplásmico-aparato de Golgi, donde una secuencia de eventos tanto catabólicos como anabólicos ocurren, participando las glicosidasas y glicosiltransferasas para crear estructuras de glicanos altamente complejos (25). La glicosilación es una modificación predominante que regula muchas funciones celulares (26). Con el programa SWISS-PROT se estimó que más del 50% de todas las proteínas y lípidos conocidos que son sintetizados por eucariotas son glicosilados (27,28).

2.1 Alteraciones de la glicosilación

La glicosilación aberrante es una característica de la transformación maligna y progresión tumoral (29,30,31,32), posiblemente resultado de la desregulación de la transcripción de genes que codifican para las enzimas de la maquinaria de glicosilación.

Las alteraciones en los patrones de glicosilación asociados a cáncer son resultados de cambios en la expresión de genes que codifican para enzimas que participan en la glicosilación, alteraciones en la localización de las enzimas dentro de los compartimientos celulares, disponibilidad de substrato donador y aceptor, competición entre estructuras asociadas a cáncer y normales, así como el enmascaramiento de epítomos de azúcar por grupos sustituyentes (33).

Dentro del microambiente tumoral algunos de los cambios en la glicosilación favorecen la movilidad de las células malignas, modifica la adhesión celular e incluso en algunos casos activa receptores de membrana, contribuyendo al fenotipo invasivo (34,35,36).

Algunos de los cambios característicos de la transformación maligna son: la expresión de antígenos oncofetales, epítomos que están presentes en tejido embrionario y células tumorales, pero que están generalmente ausentes en células de adultos sanos (21). Neo-síntesis o síntesis incompleta de estructuras glicánicas (37). Especialmente cambios a nivel de la sialilación, la fucosilación, ramificación y truncamiento tanto de N- y O-glicanos parecen ser un tema común entre los cambios asociados con cáncer en estructuras glicanas (22). La N-glicosilación afecta el plegamiento de proteínas, jugando un papel central en el control de calidad dentro del retículo endoplásmico, en el potencial metastásico y la propagación de tumores (32).

La sobreexpresión de antígenos sialilados, incluyendo los sialil-Tn, sialil-Le^a y sialil-Le^x, en la superficie de las células cancerígenas ha sido reportado (38). La alteración de O-glicanos es una característica universal de células cancerígenas.

En muchos tipos de cáncer, se han reportado cambios en la localización de las enzimas de la familia de transferasas poli-peptidil- α GalNAc (ppGalNAcT), pasando de estar restringidas al cis-Golgi a identificarse en todo el aparato de Golgi. Las ppGalNAcT catalizan la

transferencia de una α -GalNAc de UDP-GalNAc a residuos de Ser o Thr de una glicoproteína, produciendo el antígeno Tn (39).

Dentro de las alteraciones de glicanos comúnmente observadas en carcinomas son las siguientes: incremento de ramificaciones β 1,6, incremento de sialilación α 2,6, incremento de sialil-Lewis^{x/a} (sLe^x/sLe^a), disminución de di-sialil-Lewis^{x/a}, incremento de epítomos Thomsen-nouvelle (Tn), incremento de epítomos sialil-Tn (sTn), incremento de antígeno T y sialil-T (21). Entre los glicanos, una de las moléculas importantes es el ácido siálico (AS) (40), el incremento general en la sialilación ha sido detectado tanto en modelos experimentales como en los tumores malignos y se asocia con un fenotipo celular metastásico (33,41,42).

2.2 Ácido siálico y sialiltransferasas

Los AS son un grupo de azúcares derivados del ácido neuramínico (Ácido 5-amino-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-nono-2-ulosónico) y ampliamente distribuidos en la naturaleza como un azúcar terminal de los oligosacáridos unidos a proteínas o lípidos. Los miembros incluyen al azúcar de nueve carbonos, ácido N-Acetilneuramínico (Neu5Ac), y sus derivados. El Neu5Ac es el AS más ubicuo y es el precursor biosintético de todos los otros ASs. Los ASs pueden estar unidos a un residuo galactosa (Gal) vía unión α 2,6 o α 2,3 o unidos a galactosamina o N-acetilgalactosamina (GalNAc) vía unión α 2,6, además, el AS puede también estar unido al carbono 8 de otro residuo de AS vía unión α 2,8, en proteínas y glicolípidos, siendo su transferencia catalizada por una familia de enzimas denominadas sialiltransferasas (ST) (43).

Los niveles de AS en la superficie celular dependen de los niveles de ARNm de los genes de ST (44,45). En seres humanos se expresa en muchos tejidos a diferentes niveles (46). Además, los niveles de expresión de ST cambian dramáticamente durante la transformación maligna y la alteración de su expresión puede ser resultado de alteraciones en los niveles de AS. La regulación de estos genes es muy compleja, ya que algunos de ellos pueden tener diferentes promotores cuya actividad es regulada de manera específica dependiendo del tipo celular o del tejido, dando como resultado la producción de especies de ARNm que divergen en la región 5' sin traducir (46).

2.3 Galactosa

La galactosa es un monosacárido formado por seis átomos de carbono (hexosa), que se convierte en glucosa en el hígado como aporte energético. Además, forma parte de los glicolípidos y las glicoproteínas de las membranas celulares, sobre todo de las neuronas. La galactosa es sintetizada por las glándulas mamarias para producir lactosa, que es un disacárido formado por la unión de glucosa y galactosa, por tanto el mayor aporte de galactosa en la nutrición proviene de la ingesta de lactosa de la leche, donde el 20% es utilizado para la glicosilación (47). La transferencia de galactosa a las glicoproteínas es catalizada por las galactosiltransferasas, las cuales se dividen de acuerdo al tipo de enlace que catalizan. Las β -1,3-galactosiltransferasas transfieren un residuo de galactosa del nucleótido uridina difosfato-galactosa (UDP-gal) al carbono 3 de un residuo aceptor de N-acetilgalactosamina. Las β 1,4-galactosiltransferasas transfieren galactosa al carbono 4 de un residuo N-acetilglucosamina. Estas transferencias se realizan en la cisterna del trans-Golgi (48).

Las estructuras glicánicas pueden actuar como un sistema codificante, ya que son capaces de interactuar con alta especificidad y selectividad con proteínas de unión a carbohidratos incluyendo lectinas, anticuerpos, receptores y enzimas (49). Estas moléculas también están involucradas en la comunicación como célula-célula e interacciones célula-matriz extracelular y de reconocimiento molecular durante el desarrollo tumoral, diferenciación y progresión (50,43,51).

2.4 Funciones de los glicanos en cáncer y su asociación con la progresión

La metástasis de los tumores es el proceso más importante para la extensión del tumor, que involucra una serie escalonada de eventos de adhesión y de señalización (52).

Cambios en los oligosacáridos de las estructuras N-glicánicas han sido descritos en cáncer de mama, colon, próstata, pulmón, células renales, carcinoma hepatocelular, pancreático y gástrico (39). La inhibición de la vía biosintética de N-glicanos se está convirtiendo en un blanco interesante para inhibir la progresión de cáncer (39).

El aumento en la expresión de AS ha sido implicado en el proceso metastásico (53). La inhibición de sialilación y extensión de O-glicanos reduce el potencial metastásico de células cancerígenas (54). El AS puede también estar implicado en la regulación del crecimiento (55). Dado que algunos glicoconjugados sialilados regulan la adhesión y promueven la motilidad, pueden ser importantes para la colonización y potencial metastásico de células tumorales (56,57,58). El AS unido en posición terminal de las cadenas de los oligosacáridos, impide la elongación de ésta.

Mientras que el antígeno sialil-Le^x unido a O-glicanos puede promover adhesión celular e invasividad, otras estructuras de O-glicanos pueden también jugar un papel importante en el fenotipo maligno de las células cancerígenas (59). Comparado a tumores primarios, la expresión de los antígenos Tn y T disminuye en tumores metastásicos de células de cáncer de colon, con un correspondiente incremento en sialil-Tn, sialil-T, sialil-Le^a y sialil-Le^x (60). El sialil-Tn es un antígeno importante sobreexpresado en varios cánceres epiteliales (gástrico, pancreático, colorrectal, ovario y mama) y es usualmente asociado con mal pronóstico (61).

La adición de residuos de galactosa y GlcNAc, produce estructuras ramificadas de polilactosamina (poli-LacNAc). El origen de ramificaciones de poli-LacNAc se ha correlacionado con el desarrollo tumoral, la invasión, la metástasis, y mal pronóstico (62).

2.5 Alteraciones de la glicosilación en Cáncer Cérvicouterino

Se ha observado que en el suero de los pacientes con adenocarcinoma cervical presentan una mayor incidencia de niveles altos de antígeno sialil-Tn, incrementando la incidencia progresivamente con la etapa de la enfermedad (59).

La regulación de los cambios en la expresión de sialiltransferasas (ST) observados en tejido de cérvix maligno, se realiza principalmente a nivel transcripcional. En el CaCu los niveles de ARNm de las sialiltransferasas (ST3Gal I, ST3Gal III, ST3Gal IV y ST6Gal I), presentan un aumento del ARNm del gen de la ST6Gal I y una disminución del ARNm de las ST3Gal III, ST3GalIV y ST3Gal I en carcinoma escamoso de cérvix comparado con tejido de cérvix normal; sin embargo, los pacientes con metástasis en ganglios linfático presentan un

aumento del ARNm de las ST3Gal III y ST6Gal I comparado con pacientes sin metástasis a ganglios linfáticos, donde la alta expresión de ST6Gal I fue asociada con invasión profunda del estroma, invasión al espacio linfático vascular y poca diferenciación (63,64).

Un incremento de la expresión de ácido siálico vía unión α 2,3 y α 2,6 ha sido reportado en lesiones premalignas de cérvix, incrementando su expresión conforme el grado de la neoplasia cervical (65). Se han reportado un incremento en la expresión del antígeno sialil-Le^x en células de raspado cervical, en relación al grado de la neoplasia cervical (66). A pesar de que existe evidencia de la importancia de la alteración de glicanos en CaCu, no existe mucha información al respecto hoy en día de las alteraciones específicas de glicosilación en CaCu, por lo que es importante determinar glicanos alterados en este tipo de cáncer.

Las proteínas de unión a carbohidratos (lectinas, galectinas y siglecs), juegan un papel importante en eventos mediados por estas interacciones, tales como reconocimiento, anti reconocimiento, adhesión, transducción de señales, endocitosis, liberación de vesículas, y migración entre los organelos y las células, tanto a nivel molecular y celular (67). Los cambios de glicanos en las estructuras terminales expuestas sobre la superficie de células tumorales pueden ser reconocidas a través de lectinas endógenas y por lo tanto modular la progresión del cáncer (21). Para investigar las alteraciones de glicanos se han utilizado lectinas que reconocen motivos específicos de glicanos, demostrando claramente su habilidad para identificar cambios de glicanos específicos de cáncer.

3. Familia de Galectinas

3.1 Estructura y propiedades bioquímicas de las galectinas

Las galectinas forman parte de la familia de lectinas que ejercen su principal función por unión a glicoconjugados, es decir, estructuras de carbohidratos unidos a proteínas, péptidos y lípidos. Las galectinas descifran la información codificada por la maquinaria de glicosilación y la traducen en funciones celulares. El término de galectinas fue introducido en 1994, resultado de su capacidad de unión a galactosa (68), inicialmente fue usado para proteínas que se unen a carbohidratos en presencia de tioles y fueron consideradas como proteínas S (por tiol/sulfhidrilo

dependientes). El descubrimiento de nuevas galectinas con especificidad independiente de tiol, amplió el grupo (69). Los miembros de esta familia presentan dos propiedades que las caracterizan: La afinidad por β -galactósidos y una secuencia aminoacídica conservada, denominada dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) (68). El dominio DRC es el principal dominio funcional de las galectinas, está compuesto por aproximadamente 130 aminoácidos formando dos láminas β antiparalelas plegadas que forman un sándwich- β que es ligeramente flexible dando como resultado una estructura con un lado cóncavo y un lado convexo. El lado convexo consiste de cinco cadenas anti paralelas (F1-F5), y el lado cóncavo de seis cadenas anti paralelas (S1-S6). El sitio de unión a β -galactósidos formando disacáridos como la lactosa ocurre en el lado cóncavo en las cadenas S4-S6 (70).

Las galectinas de mamíferos son nombradas por numeración consecutiva siguiendo el orden en que son descubiertas, actualmente la familia está integrada por 15 miembros. Los genes que codifican para galectinas son denominado LGALS (lectin, galactoside-binding, soluble), y la numeración del gen se mantiene consistente con la numeración de la proteína.

Sobre la base de las características estructurales de la proteína y el número de DRC, las galectinas se dividen en tres tipos: prototipo, quimera y repetición en tándem (Figura 1) (71,72). Las galectinas prototipo tienen un solo dominio DRC con una pequeña secuencia N-terminal, pueden estar como monómeros, o formar dímeros unidos de forma no covalente u homodímeros, esto a través de interacciones hidrofóbicas entre los residuos de aminoácidos de su N- terminal (73,74). La dimerización ocurre de acuerdo a la concentración de la proteína, pero independientemente de sus ligandos solubles disponibles (75). Las galectinas que pertenecen a este grupo son: -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 y -15. Las galectinas tipo repetición en tándem se caracterizan por la presencia de dos dominios DRC homólogos, pero no idénticos en la secuencia de aminoácidos; estos DRC están conectados por un pequeño péptido de enlace siendo las galectinas -4, -6, -8, -9 y -12 las que componen este grupo. Su oligomerización permite formar agregados de orden superior, mejorando su función (76,77). Las galectinas tipo quimera comprenden proteínas con un DRC y un dominio regulatorio con regiones repetidas parecidas a colágeno (8-13) de un consenso de nueve residuos aminoacídicos ricos en prolina, tirosina y glicina, este grupo solo está compuesto por la galectina-3 (69). En contraste, la galectina-3 (gal-3) forma oligómeros (trímeros o pentámeros) en solución o en la superficie celular vía su

extensión N- terminal parecida al colágeno después de su unión a oligosacáridos multivalentes (78,79,80).




Tipo	Estructura	Galectinas
Prototipo		1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15
Quimera		3
Repetición en Tándem		4, 6, 8, 9, 12

Fig. 1. Hasta el día de hoy se han identificado 15 galectinas de mamíferos. Se dividen en tres grupos de acuerdo a su estructura: Prototipo, quimera y repetición en tándem. “Elaboración propia”.

Algunas galectinas se distribuyen en una amplia variedad de tejidos, mientras que otras son más específicas. La expresión de galectinas es modulada durante la diferenciación de células individuales y durante el desarrollo de organismos y tejidos, cambiando bajo diferentes condiciones fisiológicas y patológicas (81). La concentración intracelular de galectinas en condiciones normales es equivalente a 0.01 mM, mientras que en condiciones patológicas o de estrés, éstas tienden a incrementar su concentración hasta rangos de 0.1 mM (82).

Las propiedades de unión y las funciones biológicas de las galectinas en el medio extracelular oxidativo, podría depender de la inmediata unión a su ligando, lo que previene la oxidación de los residuos de cisteína presentes en el DRC y de la susceptibilidad a la proteólisis (74,83). En el medio intracelular reductor las galectinas permanecen estables, pero después de su secreción al medio extracelular principalmente oxidativo, la oxidación de las cisteínas libres compromete no solo su actividad de unión, sino que también la oligomerización de las subunidades de la galectina (84).

Las galectinas están implicadas en varios procesos fisiopatológicos requiriendo el reconocimiento de carbohidratos, tales como adhesión, regulación del crecimiento celular, inmunomodulación, apoptosis, inflamación, embriogénesis, reproducción, extensión del tumor,

metástasis, proliferación y splicing (82,85). La mayoría de estas funciones, han sido asignadas a gal-1 y gal-3.

3.2 Secreción

Las galectinas son solubles en agua, la mayoría de ellas no están glicosiladas. La clonación de sus ADNc permitió identificar que éstas son sintetizadas sin una secuencia señal, lo que sugiere que son proteínas de ubicación intracelular (86); sin embargo, aunque carecen de un péptido señal estas proteínas no solo se encuentran en núcleo y citoplasma, sino también en el espacio extracelular (87), actuando tanto intracelularmente como extracelularmente. La cantidad de galectina secretada va a depender del tipo celular, del estado de diferenciación, pudiendo también ser regulada por factores externos (87,88). Las galectinas son secretadas a través de una vía no clásica que no está totalmente esclarecida, se propone que un mecanismo podría ser por translocación directa a través de la membrana. Se sabe que la secreción de galectina- 1 (gal-1) depende de la unión a una molécula contrarreceptor y no involucra la formación de invaginaciones en la membrana plasmática (89,90). La secreción de gal-3 parece ser regulada por la unión a otras proteínas tales como chaperonas con subsecuente secreción vesicular (87,91). El dominio N- terminal de gal-3 es importante para la translocación subcelular y secreción de la proteína (92).

3.3 Especificidad de galectinas a carbohidratos

Actualmente hay una creciente evidencia de que la propiedad de formar multímeros y la unión a glicoconjugados es importante para las funciones biológicas de las galectinas (93). Una actividad común de unión entre las galectinas es su multivalencia, lo que conduce al entrecruzamiento y agregación de sus receptores glicoproteicos y glicolípidicos de la superficie celular (94). En general, existen dos tipos de complejos multivalentes, designados como tipo I y tipo II (Figura 2). En complejos tipo I, el entrecruzamiento ocurre entre un carbohidrato bivalente y una lectina bivalente, que podría resultar en la formación de un entrecruzamiento lineal (unidimensional), estos complejos a menudo son solubles (95,96) teniendo un alto grado

de polimorfismo debido a su flexibilidad (Fig. 2A). En complejos tipo II, el entrecruzamiento ocurre entre lectinas y carbohidratos en el que una de las dos moléculas posee una valencia >2 , un ejemplo es el entrecruzamiento entre una lectina tetravalente y un carbohidrato bivalente, tal interacción permite la formación de entrecruzamiento de dos o tres dimensiones, que pueden ser insolubles (97,98) y precipitar en solución, estos complejos pueden existir como redes ordenadas (Fig. 2B) (93).

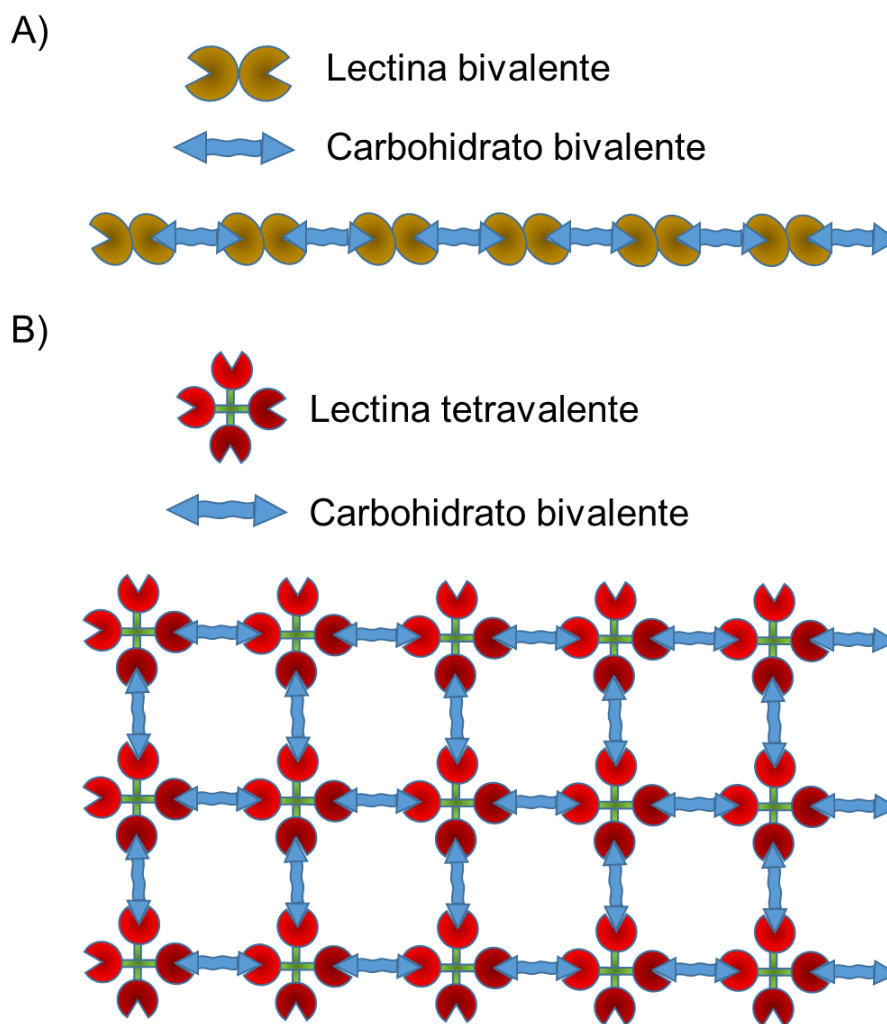


Fig. 2. A) Diagrama de un complejo multivalente tipo 1, el entrecruzamiento ocurre entre una lectina bivalente y un carbohidrato bivalente. B) Diagrama de un complejo tipo 2, el entrecruzamiento ocurre entre una lectina tetravalente y un carbohidrato bivalente. “Elaboración propia”.

Las galectinas son específicas para diferentes oligosacáridos, difiriendo en su habilidad para acomodar ciertos sacáridos unidos a galactosa en el sitio de unión a carbohidratos (99). Las

galectinas se unen preferentemente a N-acetil-lactosamina (LacNAc; Gal β 1,4GlcNAc) y disacáridos relacionados, incluyendo lactosa (Lac), disacáridos T (Gal β 1,3GalNAc) y oligosacáridos del grupo sanguíneo ABO humano, frecuentemente muestran preferencia por una de estas estructuras y con una alta afinidad a cadenas de polilactosamina. Sin embargo, la extensión de unidades de disacáridos en el extremo no reducido con subunidades NeuNAc α 2,3 o con Gal(NAc) α 1,3 y Fuc α 1,2 mejora la afinidad de algunas galectinas, pero tienen afinidades menores o reduce la unión de otras (100). Por lo tanto, glicanos que contienen N-acetil-lactosamina y cadenas polilactosamina [(Gal β 1,4GlcNAc) $_n$], tal como laminina, fibronectina, proteínas de membrana asociadas a lisosomas y mucinas, son los glicanos endógenos preferentes reconocidos por las galectinas (101,102).

3.4 Funciones intracelulares y extracelulares de galectinas

Las galectinas pueden actuar en los medios intracelular y extracelular, con funciones reguladas por las interacciones proteína-proteína o proteína-glicano. En el espacio extracelular pueden interactuar con diferentes glicoproteínas en los eventos de adhesión, señalización y proliferación. Los complejos formados por la unión de galectinas con glicolípidos y glicoproteínas que contienen azúcares β -galactósidos, pueden conducir a la formación de redes que agrupan ligandos de un microdominio de balsas lipídicas requeridos para la óptima transmisión de señales para la función celular (103,104,105), sugiriendo que estas interacciones ocurren preferencialmente en estos microdominios. La formación de redes por galectinas requiere oligomerización multivalente para alcanzar la estabilidad y funcionalidad biológica (103). La formación de redes después de la unión con complejos N-glicanos a galectinas atrapa eficazmente receptores tipo glicoconjugados en la superficie celular, previniendo su endocitosis.

Las glicoproteínas a menudo tienen múltiples copias de los ligandos de sacáridos que son reconocidos por las galectinas (106), mientras que la unión de una galectina a un sacárido simple tiene interacciones de baja afinidad (constantes de asociación $\sim 10^4 \text{ M}^{-1}$), la naturaleza multivalente entre interacciones galectina-sacárido resulta en una gran avidéz global (constantes de asociación $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$) (103,107).

Las galectinas pueden unirse a algunas glicoproteínas de la matriz extracelular (MEC), como laminina, fibronectina y elastina (100,108). La unión de glicoconjugados de la superficie celular a las galectinas desencadena una cascada de eventos de señalización transmembranal y de esta manera se logra modular la mitosis, la apoptosis y la progresión del ciclo celular. También las propiedades bivalentes y multivalentes de las galectinas les permiten hacer puente entre dos células del mismo o diferente tipo; esto permite la agregación homo o heterotípica, así como la formación de puentes entre las células y las proteínas de la MEC. Las diferentes proteínas de la MEC que estén unidas por galectinas pueden interactuar con otras glicoproteínas y/o integrinas (109,110,111,112).

Las galectinas pueden tener función pro- o antiadherente en diferentes tipos celulares. Y pueden actuar facilitando o reduciendo la adhesión de otras células dependiendo de diferentes factores. La adhesión celular mejora si las galectinas entrecruzan estructuras glicosiladas de una célula con glicanos de otra célula o de la matriz extracelular. En contraste, la adhesión es reducida si galectinas solubles bloquean receptores disponibles para otras interacciones de unión de forma dependiente de la concentración. En altas concentraciones de galectinas se pueden bloquear algunos receptores disponibles impidiendo que interactúen con otros componentes para el entrecruzamiento y por lo tanto para la adhesión (113). Adicionalmente, el estado de oligomerización tiene un papel importante en el bloqueo de receptores (100), por ejemplo: la unión de las galectinas de forma monovalente a un ligando de unión de la matriz extracelular (común en muchas galectinas prototipo) impide la unión a integrinas de la superficie celular por impedimento estérico. Una galectina bivalente a baja concentración comparada con la concentración del ligando, podría estimular la adhesión por entrecruzamiento entre moléculas de la matriz extracelular y la superficie celular (100).

Intracelularmente, las galectinas que están tanto en núcleo como en citoplasma, participan en procesos que son esenciales para las funciones básicas de la célula, como splicing del pre-ARNm, regulación del crecimiento celular, apoptosis y progresión del ciclo celular (114). A la fecha el mecanismo completo por el que las galectinas regulan estos procesos es desconocido; sin embargo, se sabe que las galectinas interactúan con ciertas proteínas intracelulares que están involucradas en la regulación de estos procesos (115). La interacción proteína-proteína, se presenta en la mayoría de los casos con respecto a las interacciones

glectina-carbohidrato. Las proteínas que interaccionan con glectinas y que se han identificado hasta el momento no están estructuralmente relacionados entre sí y no parecen compartir dominios o motivos comunes (114).

3.5 Alteraciones de glectinas en el cáncer

Puesto que las glectinas tienen diversas funciones, su disfunción o expresión alterada con frecuencia ha sido asociada con enfermedades, incluyendo el cáncer (116,117,118). En las dos últimas décadas se ha demostrado que las glectinas contribuyen a muchas características del cáncer (20), incluyendo la sostenida señalización proliferativa, la resistencia a las señales de muerte celular, la evasión de la vigilancia inmune, la inducción de la angiogénesis y la activación del potencial metastásico (70,72,114,119,120).

Una gran cantidad de datos reportados acerca de la expresión de las glectinas en cáncer están disponibles en la literatura; sin embargo, los resultados presentan contradicciones, se ha demostrado que la expresión de las glectinas puede estar aumentada o disminuida en tumores de diferente origen; sin embargo, estudios en el mismo tipo celular pueden presentar resultados contradictorios. La razón de esta contrariedad puede ser debido al uso de anticuerpos dirigidos a distintos dominios de las glectinas. También puede estar relacionado al tipo de líneas celulares y al uso de diferentes técnicas utilizadas que ofrecen ventajas y desventajas.

El tejido canceroso con frecuencia se caracteriza por la expresión alterada de glectinas, por lo que se ha previsto que cambios en los niveles de expresión de glectinas circulantes pueden revelar la presencia de tejido maligno (121). Mientras la mayoría de estudios sugieren que el incremento de los niveles de glectinas extracelulares y de sus ligandos circulantes podría estar asociados con la expresión en tejido maligno. También hay reportes que muestran diferencias entre los niveles séricos de glectinas con respecto a los niveles en tejido (121). Una posible explicación a esta discrepancia podría estar relacionada con la secreción alterada de glectinas, sabiendo que las glectinas son secretadas por una vía no clásica poco entendida y que además modificaciones de las proteínas por escisión proteolítica, splicing o fosforilación afectan la localización y tráfico de las mismas (92,122), probablemente la actividad anormal de las vías celulares que regulan estos procesos en células tumorales causen desajustes entre la

expresión en tejido y su secreción. Una explicación adicional podría involucrar los cambios en la composición de glicanos reconocidos por las galectinas en tejido tumoral, lo que podría afectar la disponibilidad de glicoconjugados a los que se unen las galectinas, sumado a una secreción alterada, lo que podría provocar una mayor acumulación en tejido que podría resultar en las discrepancias observadas al vincular la expresión tisular y los niveles séricos de galectina en algunos tipos de cáncer (121).

Aunque muchas de las galectinas se expresan en varios tejidos humanos, en la mayoría de cánceres las galectinas disminuyen o aumentan su expresión comparado al tejido normal (123). Por ejemplo, gal-1 aumenta su expresión en cáncer de tiroides y sarcoma uterino (124,125), pero su expresión disminuye en cáncer de cabeza y cuello comparado al tejido normal (126). Similarmente, la expresión de gal-3 aumenta en cáncer gástrico (127), cáncer de hígado (128) y cáncer de tiroides (124), pero su expresión disminuye en cáncer de cabeza y cuello (126) y sarcoma uterino (125) comparado a tejido normal. La alteración de su expresión se correlaciona con la agresividad del tumor y la adquisición del fenotipo metastásico, sugiriendo que las galectinas están involucradas en la progresión del cáncer y metástasis (114). También se han observado cambios en la localización subcelular de galectinas (por ejemplo, de núcleo a citosol) que ocurren durante la transición de células normales a células cancerígenas, por lo que este cambio podría estar relacionado al fenotipo canceroso (123).

3.6 Funciones de galectinas en cáncer

3.6.1 Transformación tumoral

Usando diferentes modelos celulares se encontró una correlación entre la transformación maligna y la expresión de gal-1 y gal-3, aunque los mecanismos no están completamente claros, potencialmente involucra interacciones con H-Ras y K-Ras unidos a membrana. Tumores humanos frecuentemente expresan proteínas Ras con mutaciones puntuales que las hacen constitutivamente activas, las proteínas Ras más comúnmente afectadas son H-Ras, K-Ras y N-Ras. Las proteínas Ras contribuyen a diversos aspectos del fenotipo maligno y sus actividades requieren que estén ancladas a la membrana plasmática, este anclaje de membrana requiere de gal-1 para que funcione como un ligando de interacción de H-Ras (129). Después se encontró

que gal-3 también se une a proteínas Ras oncogénicas, pero preferencialmente a K-Ras (130). Como resultado, gal-3 promueve la activación de RAF1 y fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) contribuyendo a la activación selectiva de cascadas de señalización y la regulación de expresión de genes a nivel transcripcional. Por lo tanto se ha propuesto que la familia de galectinas podría tener un importante papel en el anclaje de Ras a la membrana y en la transformación celular mediada por Ras. Otra vía de transformación maligna inducida por galectinas podría ser a través de su asociación con el spliceosoma. Las gal-1 y gal-3 fueron encontradas en el complejo Gemin4 (C50)/SMN/Gemin2 pudiendo desempeñar un papel importante en el ensamble del spliceosoma (131), lo que sugiere que estas galectinas podrían regular el procesamiento del pre-ARNm durante la transformación maligna.

3.6.2 Apoptosis

La apoptosis es la función más estudiada de las galectinas y es la más relevante para la progresión tumoral. Varios estudios han mostrado que las galectinas regulan la apoptosis ya sea positivamente o negativamente en varios modelos de células cancerígenas. La gal-1, incrementa la apoptosis de células de cáncer de próstata LnCap, células de cáncer de colon CoLo201, células tumorales Leydig y linfoma de células B y por otra parte reduce la apoptosis en gliomas, cáncer cervical y de pulmón (132). El mecanismo de regulación de apoptosis por galectinas todavía es poco entendido, sin embargo varios ligandos de unión implicados en el destino celular han sido identificados. En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha encontrado que las gal-3 y -7 interactúan con la proteína anti-apoptótica de linfoma de células B-2 (Bcl-2) (133,134,135). Se desconoce el dominio de la proteína gal-7 implicado en esta unión, sin embargo el motivo NWGR (Asp-Trp-Gly-Arg) que está presente en el extremo N-terminal de la proteína gal-3 muestra una fuerte homología con el motivo BH1 de Bcl-2, que parece ser esencial para sus funciones anti-apoptóticas (135). Por la homología que existe entre los miembros pro y anti-apoptóticos de la familia Bcl2, las galectinas también podrían ser capaces de interactuar con otros miembros de la familia (132). Una proteína intracelular que podría también estar involucrada en la actividad anti-apoptótica de gal-3 es la sinexina (también llamada anexina VII), es necesaria para la translocación de gal-3 a las membranas perinucleares en células tratadas con estimulantes

apoptóticos (136). Hay evidencias que señalan que dependiendo de la localización celular de gal-3 puede ejercer efectos contrarios, en citosol protege a las células de la apoptosis, pero localizada en núcleo tiene el efecto opuesto (137). Por lo que, algunas galectinas inducen apoptosis por unión a glicoproteínas de la superficie celular y otras regulan la apoptosis a través de interacciones con proteínas intracelulares.

3.6.3 Crecimiento tumoral

Las galectinas también podrían desempeñar un papel central en la proliferación tumoral. Se ha determinado que gal-1 reduce la proliferación celular de linfomas de células B, neuroblastoma y de cáncer de próstata LnCap, mientras que incrementa la división celular de células cancerígenas de glioma, cervical, ovario y páncreas (132). Otra galectina que presenta dualidad en su función sobre la proliferación celular es la gal-3, ya que incrementa la proliferación de tumores de mama, próstata, páncreas y carcinoma celular escamoso oral de lengua (132). Este mecanismo es atribuido a la interacción de gal-3 con el complejo β -catenina/Axina/APC en el núcleo, incrementando la actividad transcripcional del factor de transcripción Tcf-4 y subsecuentemente elevando la expresión de c-myc y ciclina D1 (138). En contraste, gal-3 citoplasmática, junto con gal-1, se unen a protocadherina-24, permitiendo la localización citoplasmática de β -catenina, mientras que disminuye la señalización de Wnt (139). También se ha encontrado que la gal-7 aumenta la actividad proliferativa en células de cáncer de ovario, mientras que reduce la tasa de proliferación de células cancerígenas de neuroblastoma, colon y gástrico (140,141,142). Por otra parte, gal-8 y gal-9 han mostrado reducir el crecimiento tumoral de colon y mieloma, respectivamente (143,144), mientras que gal-12 reduce la proliferación de células de cáncer de cérvix y leucemia de células T (145).

3.7 Galectinas en metástasis tumoral

La metástasis del tumor implica una serie de pasos que inician con la invasión de la célula tumoral a tejido circundante, la difusión a través de los vasos sanguíneos o linfáticos, evasión de la respuesta inmune y finalmente la formación de un nuevo foco tumoral en sitios

distantes. Los factores involucrados incluyen cambios en la adhesión celular, incremento de migración o motilidad e invasividad, angiogénesis y evasión de la respuesta inmune (114). Se ha demostrado que diferentes galectinas pueden contribuir a todos estos procesos, indicando que la familia de galectinas podría ejercer un papel importante para la metástasis tumoral, como se muestra a continuación.

3.7.1 Adhesión

Los carbohidratos juegan un papel importante en la adhesión de las células tumorales a las células endoteliales, estas interacciones son mediadas por proteínas de unión a carbohidratos (lectinas) que se unen a estructuras de oligosacáridos específicos que están sobre la superficie celular o glicoconjugados presentes en la matriz extracelular (29,146,147,148). Las galectinas expresadas sobre la superficie celular de células tumorales pueden estar involucradas en la adhesión celular y metástasis (146,147). Sin embargo, las galectinas están también presentes sobre la superficie celular de células normales, donde pueden participar en la adhesión de células tumorales (146). El posible papel de las galectinas en la adhesión de células tumorales, se ha propuesto previamente con base en pruebas menos directas. Primero, la expresión de galactosa sobre la superficie de células tumorales se ha correlacionado con el grado de metástasis de cáncer colorrectal a hígado (149); segundo, la metástasis experimental fue prevenida por D-galactosa (150,151); tercero, la modificación de las propiedades de los glicoconjugados de células tumorales por los inhibidores de la glicosilación sugirió la existencia de lectinas endógenas (152,153) y cuarto, la indicación más fuerte de que las galectinas participan en la adhesión de células tumorales fue que una mutante deficiente de glicosilación carente de ácido siálico y galactosa derivadas de un tumor linforreticular se adherían poco a monocapas de células endoteliales microvasculares, mientras que las células parentales correctamente glicosiladas se adhirieron fuertemente a células endoteliales. Además, la galactosilación de glicoconjugados de la superficie celular de las células tumorales por galactosiltransferasas y el aumento de UDP-galactosa incrementa la habilidad de las células a adherirse a células endoteliales *in vitro* y por otra parte forma metástasis a hígado tras administración intravenosa

(29,147). Se ha demostrado que las gal-1 y gal-3 son expresadas en varias células endoteliales y que gal-1 puede contribuir a la adhesión de células tumorales a células endoteliales (147).

3.7.2 Migración e invasión

Las galectinas afectan la motilidad de las células tumorales e influyen en su capacidad de invasión; esto ha sido mostrado en ensayos *in vitro* mediante la adición de galectinas exógenas a las células o por sobreexpresión de éstas en células tumorales. La adición de gal-3 a células de carcinoma de mama incrementó la migración de las células a través de una barrera Matrigel (154), probablemente debido a la unión de gal-3 a los receptores de la superficie celular que están implicados en la migración celular (114). Por otra parte, en las líneas celulares de cáncer de colon, la adición exógena de gal-3 reduce la migración (155), mientras que en líneas celulares de cáncer de pulmón la sobreexpresión de gal-3 mejoró la motilidad e invasividad (156). La gal-1 estimula la migración de células de cáncer de pulmón y hepático, mientras que reduce la migración de células de cáncer de colon, favoreciendo la capacidad de invasión de células de cáncer cervical, pancreático, hepático, ovarico, de gliomas y de pulmón (132). La galectina-7 reduce la migración de células de cáncer gástrico y la invasión de células de cáncer urotelial y gástrico, mientras que se ha asociado con un incremento en la capacidad de invasión de células provenientes de otros tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama y linfoma de células T (132).

La manera en que las galectinas modulan positivamente o negativamente el comportamiento invasivo de las células cancerosas es desconocido; sin embargo, podría explicarse por diferencias en los receptores de la superficie celular reconocidos por las galectinas y por los efectos de estos receptores en la migración celular. Extracelularmente, involucran proteínas de la superficie celular implicadas en la migración celular, mientras que intracelularmente, podrían afectar la movilidad intrínseca de las células a través de mecanismos aun no identificados (114,132).

3.7.3 Angiogénesis

La angiogénesis es necesaria para el crecimiento tumoral invasivo y la metástasis, constituyendo un proceso importante en la progresión del cáncer (157), siendo también uno de los eventos asociados con la actividad de galectinas. La gal-3 tiene actividad angiogénica *in vitro*, mientras que en ratones inoculados con células tumorales de cáncer de mama que sobreexpresaban gal-3 presentaron un incremento en la densidad capilar que rodea el tumor (158). La gal-3 aumenta la vascularización de tumores de próstata y melanomas, mientras que la gal-7 reduce la angiogénesis en tumores de colon (137,159,160). La gal-1 aumenta la vascularización en tumores de glioma, próstata y de mama (161,162,163). El incremento de la expresión de galectina-9 (gal-9) en células endoteliales (164), de la vasculatura de diferentes tejidos tumorales, sugiere un posible papel de gal-9 en la angiogénesis (165).

3.7.4 Escape de la respuesta inmune

Las galectinas participan en el escape de la respuesta inmune de la célula tumoral. De hecho, gal-1 promueve inmunoevasión de células cancerígenas de neuroblastoma, próstata, mama y páncreas (166,167,168). La gal-3 también incrementa el escape de la respuesta inmune en células de cáncer colorrectal y de pulmón (156,169,170). Las gal-1, gal-3 y gal-9 han sido consideradas como biomarcadores de mal pronóstico para una variedad de tipos de cáncer, y su influencia por promover la evasión de la respuesta inmune del tumor. La unión de gal-1, gal-3 y gal-9 a ligandos contrareceptores sobre células T efectoras puede alterar la composición del subconjunto de células T, favoreciendo un ambiente inmune tolerogénico para el crecimiento y progresión tumoral (171). Estas interacciones de unión están implicadas críticamente en las vías de inducción de la muerte celular, la estimulación de la síntesis de citocinas inmunoreguladoras y/o el establecimiento de un fenotipo exhausto en células T CD8⁺ específicas de tumor (171). Más estudios sugieren que las galectinas extracelulares son responsables de estas funciones, la participación de células intracelulares en este proceso permanece desconocido.

3.8. Expresión de galectinas y la prognosis

Además de comparar la expresión de galectinas entre tejido normal y maligno, varios estudios han explorado el valor pronóstico de la expresión de galectinas en cáncer, haciendo evidente que las galectinas pueden estar vinculadas con la evolución de la enfermedad. Por ejemplo, la expresión de gal-1 se ha asociado con mal pronóstico para supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE), independientemente del tipo de cáncer. Lo contrario sucede con gal-9, que depende del tipo de cáncer, aunque tan solo un número limitado de diferentes tipos celulares han sido evaluados. El valor pronóstico de gal-3, que ha sido ampliamente evaluado, es menos claro y parece depender del tipo de cáncer. Por ejemplo, en cáncer de colon, cerebro, leucemia mieloide aguda, la alta expresión de gal-3 se asocia con mal SG (172,173,174), mientras que en cáncer gástrico la alta expresión de gal-3 parece ser favorable (175,176). Las alteraciones en la expresión de galectinas se asocian frecuentemente con marcadores de pronóstico clásicos como el grado del tumor, estadio y el estado ganglionar. Por ejemplo, estudios en cáncer de cerebro describen una correlación positiva entre el grado tumoral y los niveles de expresión de gal-3, mientras que en cáncer de colon, la expresión de gal-3 a menudo correlaciona con el estadio tumoral (121). Las asociaciones sugieren que galectinas solo tiene un limitado valor añadido sobre los parámetros pronósticos clásicos, contrariamente se ha demostrado en varios estudios que las galectinas fueron identificadas como factores pronóstico independiente para el resultado de la enfermedad (121). Las galectinas pueden tener un valor pronóstico adicional, considerando que este difiere entre diferentes subtipos de tumores (121). Se demuestra que la gal-1 en cáncer gástrico, se identifica como un factor pronóstico independiente solo en el tipo intestinal y no en el tipo difuso (177). El valor pronóstico también parece estar relacionado a la distribución del tejido dentro del tumor, es decir, estromal o epitelial, así como a la localización celular (121).

4. Galectina-9

La gal-9 pertenece al tipo de galectinas de repetición en tándem y el gen fue clonado por primera vez de células tumorales de la enfermedad de Hodgkin, una condición caracterizada por eosinofilia en tejido y sangre (178). La gal-9 tiene un tamaño de aproximadamente 39.5 kD,

contiene un DRC N-terminal (DRC-N) de 148 aa y un DRC C-terminal (DRC-C) de 149 aa conectados por un dominio de unión. La cristalografía de rayos X revela que el DRC-N de la gal-9 humana está compuesto de dos láminas β , una de seis cadenas (S1-S6) y la otra de seis cadenas (F0-F5), que forman un dominio β -sándwich (179,180). La estructura general del DRC-C de la gal-9 humana es similar al DRC-N, con dos láminas β antiparalelas compuestas de cadenas β S1-S6 y F1-F5, además de una pequeña α -hélice (181). El sitio de unión a carbohidratos de ambos dominios está compuesto por las cadenas β S4, S5 y S6, donde las diferencias de aminoácidos determinan la especificidad de unión a carbohidratos.

La gal-9 se expresa en diversos tejidos, como hígado, intestino delgado, timo, riñón, bazo, pulmón, músculo cardíaco y esquelético, siendo más abundante en hígado (182). Gal-9 participa en adhesión celular (183), agregación (184) y apoptosis (184,185).

4.1 Ligandos de unión de gal-9

Varios receptores y ligandos de unión de la gal-9 han sido reportados, se incluyen el transportador de glucosa 2 (Glut-2) (186), la mucina-inmunoglobulinas de células T 3 (Tim3, por sus siglas en inglés de T-cell immunoglobulin mucin-3) (187), CD44 (188), la proteína disulfuro isomerasa (189), el glicosfingolípido Forssman (190), la IgE (191) y NF-IL6 como un ligando de unión intracelular (192). La gal-9 también puede interactuar con ella misma o con otros miembros de las galectinas como las gal-3 y gal-8, a través del DRC (193). La variación en el tamaño del péptido de unión puede afectar la valencia de gal-9 al disminuir su capacidad de multimerización.

Los DRC-C y DRC-N son diferentes presentando 39% de identidad en la secuencia de sus aminoácidos. Análisis de las propiedades de unión a carbohidratos de los DRC individuales de gal-9 demostraron que sus afinidades tienen tanto características en común como distintas (Figura 3): tanto el DRC-N y el DRC-C tienen una mayor afinidad a estructuras repetitivas de residuos N-acetil-lactosamina enlace β 1-3 (poli-N-Acetil-lactosamina) altamente ramificada o extendida (pero es más prominente para DRC-N), mientras que solo el DRC-N reconoce el pentasacárido Forssman con una alta afinidad (99), además de que análisis *in silico* muestran preferencia a N-glicanos no sialilados (194).

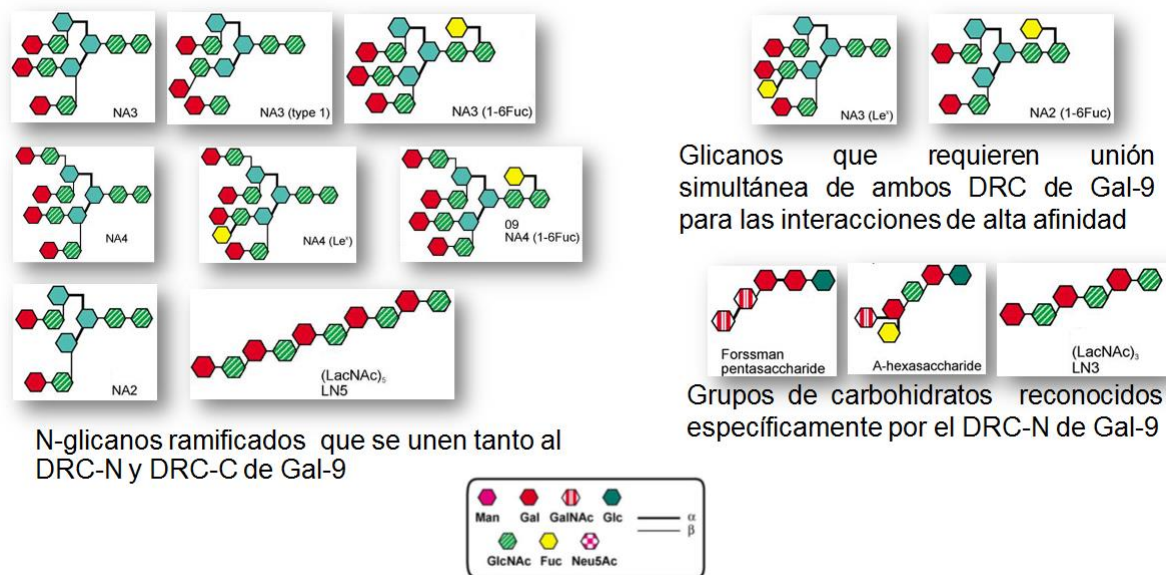


Fig. 3. Estructuras de glicanos que son reconocidos en común por ambos DRC de gal-9 y estructuras específicas del DRC-N. Modificado de Wiersma V. et al, 2013.

La diferencia que los DRC-N y DRC-C tienen respecto a la afinidad de su unión a carbohidratos hace que participen en diferentes funciones (178). El DRC-N contribuye principalmente en la regulación de la inmunidad innata, activando células inmunes innatas, el DRC-C está involucrado principalmente en la inmunidad adaptativa por tener una mayor actividad en inducir muerte de células T que el DRC-N.

4.2 Funciones de gal-9

La gal-9 fue originalmente descrita como quimioatrayente de eosinófilos, su actividad quimioatrayente (ECA por sus siglas en inglés eosinophil chemo-attractant) podría ser ejercida vía entrecruzamiento de glicoconjugados que contengan galactósidos localizados sobre la superficie de eosinófilos. Hay tres posibles interacciones entre los dos DRC y los glicoconjugados de la superficie celular: 1) los dos dominios se unen a dos glicoconjugados distintos; 2) los dos dominios se unen a dos glicoconjugados idénticos, por lo tanto la gal-9 puede inducir formación de homodímeros y multímeros de las moléculas; y 3) los dos dominios

se unen a dos diferentes motivos de oligosacáridos sobre los mismos glicoconjugados (195). Para la actividad quimioatrayente de la gal-9 ambos DRC son esenciales (Figura 4) (196).

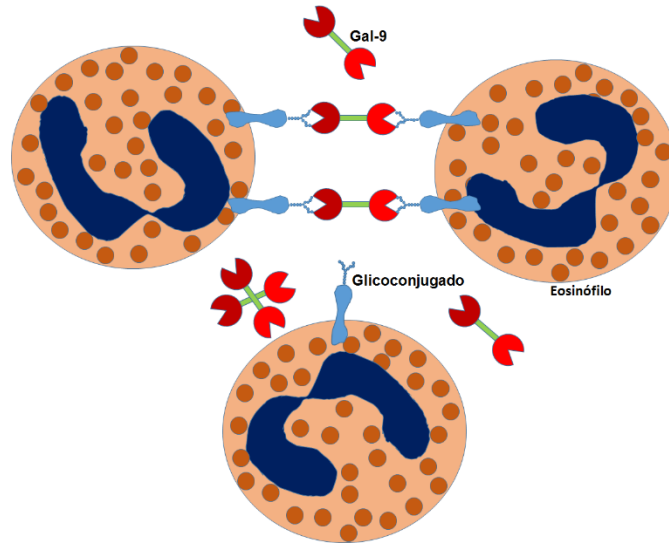


Fig. 4. La actividad quimioatrayente de gal-9 requiere de la unión de los DRC a los glicoconjugados de la superficie celular de eosinófilos. "Elaboración propia".

Extracelularmente, la gal-9 puede regular la adhesión celular y la formación de redes de glicoconjugados a través de sus DRC. Gal-9 funciona como una señal de comunicación entre la microglía y los astrocitos promoviendo la producción de citocinas de la microglía de una manera independiente de Tim-3 (197).

La interacción con IgE inhibe la formación del complejo antígeno-IgE suprimiendo la desgranulación de células RBL-2H3 (mastocitos) (191), sugiriendo que la gal-9 se une a IgE a través de estructuras glicánicas inhibiendo la formación del complejo a través de un mecanismo de impedimento estérico. La eliminación del péptido de unión de la gal-9 mejora en gran medida su estabilidad frente a la proteólisis, sin afectar sus actividades biológicas, por lo que podría ser usada para evaluar su potencial terapéutico (198). La gal-9 se une a Glut-2, reduciendo la tasa de endocitosis y con ello aumenta la vida media del receptor (186).

Diversos estudios sugieren que la gal-9 es un modulador de las funciones inmunes y que actúa principalmente regulando la homeostasis, desarrollo y diferenciación de células T (199).

La gal-9 puede promover inflamación al desencadenar la producción de citocinas proinflamatorias de monocitos (200) e inducir la maduración de macrófagos (201) y células dendríticas derivadas de monocitos (202). La gal-9 promueve y reprime la diferenciación de células T naive, en células T reguladoras (Tregs) y células T cooperadoras 17 (Th17), respectivamente (203). Además, la gal-9 induce la muerte de células T cooperadoras 1 (Th1) y Th17 diferenciadas (185,204). Cuando la gal-9 se une a Tim-3 se puede inducir la apoptosis de células T (205) y la respuesta de las células T puede ser inhibida (206). La vía Tim-3-gal-9 se considera un regulador negativo de la respuesta inmune mediada por células T (207). La gal-9 intracelular puede también activar citocinas inflamatorias en monocitos a través de su interacción con el factor nuclear interleucina 6 (NF-IL6) (192).

La gal-9 presenta isoformas proteicas, tres de las cuales han sido mejor caracterizadas, estas difieren entre sí por el tamaño del péptido de unión y son llamadas: gal-9 tamaño largo de 355 aa (gal-9L), gal-9 tamaño mediano (también llamada ecalectina) de 323 aa (gal-9M) y gal-9 tamaño corto de 311 aa (gal-9S) (208). Aunque estas isoformas muestran actividad ECA comparable (195), presentan diferencias en otro tipo de funciones. En células de cáncer de colon LoVo, la sobreexpresión de gal-9L disminuyó los niveles de ARNm de E-selectina, mientras que la sobreexpresión de gal-9M y gal-9S incrementaron los niveles de ARNm de E-selectina, con un concomitante incremento de adhesión de estas células a células endoteliales (209). Además, la estructura y tamaño del péptido de unión pueden influir en la formación de redes multivalentes, que afectan la habilidad de unión a sus ligandos glicanos (210).

4.3 Gen de gal-9

El gen que codifica para la gal-9, se denomina *LGALS9*, se localiza en el cromosoma 17 en la región 1711.2 y se compone de 11 exones que codifican una proteína de 355 aa de aproximadamente 39.5 kD (211). El interferón gamma (IFN- γ) favorece la expresión de gal-9 en fibroblastos dérmicos primarios de humanos, fibroblastos nasales primarios de humanos y células endoteliales (212,213,214). En células endoteliales bajo el tratamiento con IFN- γ , la histona deacetilasa 3 (HDAC3) es activada, regulando la expresión de gal-9 a través de la vía de señalización PI3K-IRF3 (215). La expresión inducida por el IFN- γ en fibroblastos puede ser

resultado del efecto en las vías de las MAPK, PI3K y JAK/STAT (213). También se ha mostrado que IL-1 β (216) e IL-5 (217) aumentan la expresión de gal-9 en astrocitos y eosinófilos respectivamente. Hasta el día de hoy, las vías de señalización implicadas en la modulación de la expresión de gal-9, la estructura del promotor y los factores de transcripción que controlan la transcripción del gen *LGALS9* aún no se han dilucidado. Además, los factores que controlan la expresión de las variantes de gal-9 no se han encontrado.

4.4 Variantes de ARNm de gal-9

La gal-9 presenta isoformas proteicas que son codificadas por diferentes variantes de ARNm que son resultado del proceso de splicing, en las que puede haber exclusión de los exones 5, 6 y 10 del transcripto de ARNm de longitud completa (LC) (Figura 5). Tres variantes de ARNm son las más frecuentemente descritas en la literatura: las gal-9LC (gal-9L), gal-9D5 (gal-9M) y gal-9D5/6 (gal-9S). Otros grupos han reportado variantes del ARNm donde hay exclusión del exón 10, estas han sido denominadas: gal-9D10, gal-9D5/10 y gal-9D5/6/10 (164,218). La exclusión del exón 10 genera un prematuro codón de paro dentro del exón 11, resultando en el truncamiento del DRC-C. La exclusión del exón 5, sólo o en combinación con el exón 6, origina variación en el tamaño de la secuencia que codifica para el péptido de unión entre los dos DRC. En células endoteliales las variantes del ARNm de gal-9 sólo se expresan cinco variantes, gal-9LC, gal-9D5, gal-9D5/6, gal-9D5/10 y gal-9D5/6/10, siendo la más abundante la variante gal-9D5 (208).

El péptido de unión influye en la libre rotación de los DRC, además de mediar la formación de multímeros de mayor orden que aumenta la valencia de gal-9 (189,210). Las isoformas proteicas que varían en el tamaño del péptido de unión probablemente tienen diferentes especificidades y/o afinidades por glicoconjugados. Las diferentes isoformas proteicas pueden presentar diferente localización celular. La proteína ha sido encontrada tanto intracelularmente como extracelularmente, dentro de la célula puede estar tanto en el núcleo como en el citoplasma (219,220). Las isoformas proteicas que tienen truncado el DRC- C aparentemente no son secretadas (221), la función de las isoformas de la gal-9 con el extremo C-terminal truncado es aún desconocido; pero se sugiere que puedan tener un papel intracelular.

El mecanismo por el cual es secretada la gal-9 es todavía desconocido; sin embargo, se sugiere que las metaloproteinasas de matriz y proteína cinasa C están involucradas en la liberación de gal-9 en las células T (208).

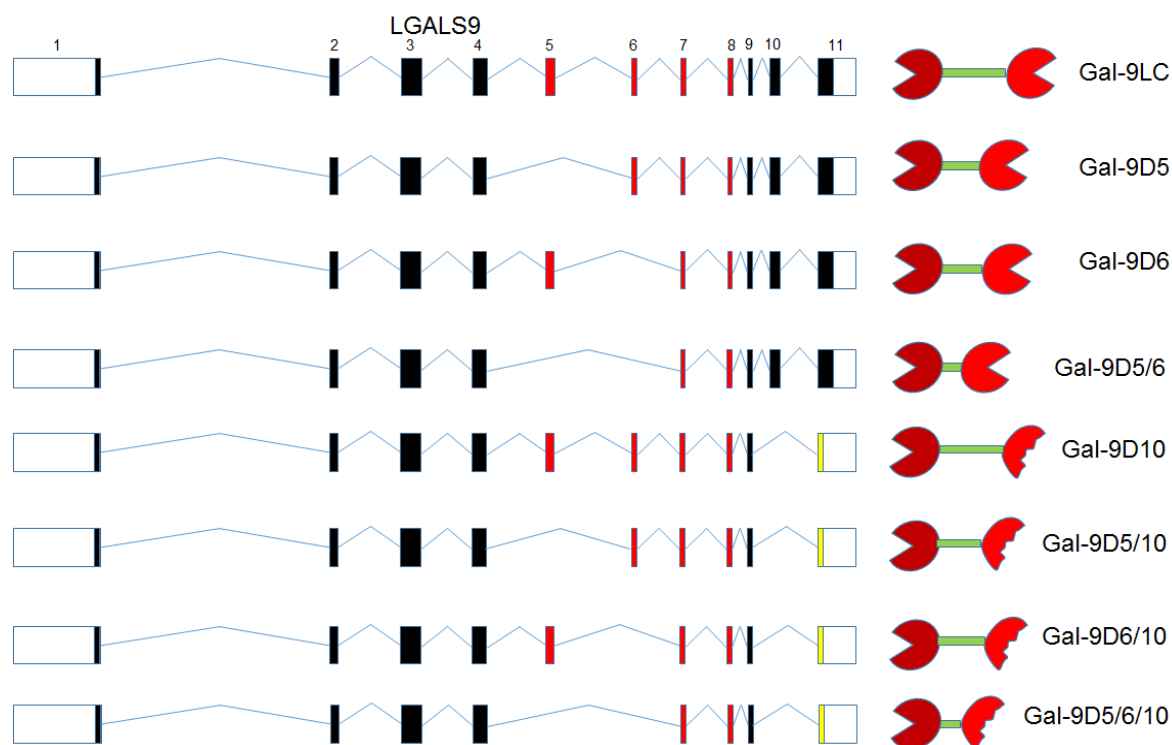


Figura 5. Estructura del gen LGALS9 que codifica para gal-9 y sus variantes del ARNm por splicing. Las cajas representan los exones (blanco: región no traducible, negro: región codificante, rojo: codificación del péptido de unión, amarillo: corrimiento del marco de lectura de la región codificante). Hasta ahora 8 variantes han sido identificadas que difieren en la exclusión de los exón 5, 6 y 10. Como resultado, el tamaño del péptido de unión y truncamiento del DRC-C difieren entre las variantes del ARNm. Modificado de Heusschen R. et al, 2013.

4.5 Alteraciones de gal-9 en cáncer

Uno de los grupos que clonó por primera vez el gen de la gal-9, la identificó como un antígeno tumoral en linfoma de Hodgkin (178), sugiriendo un papel en la biología tumoral. Varios grupos han mostrado que los niveles de gal-9 varían cuando comparan tejido tumoral con tejido normal, pero la mayor parte de estudios muestran una disminución de la expresión de gal-9 en células tumorales. Por ejemplo, Lahm y colaboradores realizaron un perfil de ARNm en un amplio panel de líneas celulares tumorales humanas (222). En líneas celulares de cáncer

de mama, pulmón, melanoma, renal, adrenal y próstata se mostró una expresión baja o ausente de gal-9. Para líneas celulares derivadas de tumores del sistema nervioso y ovarios, la expresión de gal-9 varía dependiendo del subtipo de las líneas celulares tumorales (222). En carcinoma de células renales de tipo células claras (ccRCC), la expresión de gal-9 fue mayor en tejido maligno y se correlacionó de manera significativa con mal pronóstico de los pacientes (223). Por otra parte, una alta expresión de gal-9 ha sido solo reportada en leucemia y cáncer de colon (222).

Gal-9 está localizada en el citoplasma y en la superficie celular de células tumorales (185) y al parecer es secretada por éstas mismas células (224). En tumores sólidos, estudios disponibles sugieren que gal-9 tiene una función supresora de tumor, la pérdida de gal-9 está estrechamente relacionada con el aumento de metástasis y alta recurrencia (183,184,225,226). Sin embargo, permanece desconocido que formas proteicas de gal-9 están involucradas en el proceso de metástasis de células tumorales. Un estudio en cáncer de pulmón de células no pequeñas, mostró que la baja expresión de gal-9D5 está asociada con mala supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad en pacientes con etapas tempranas de cáncer de pulmón de células no pequeñas (227).

En cáncer gástrico, una mayor expresión de gal-9 fue encontrada en pacientes sin invasión linfovascular, metástasis en ganglios linfáticos y metástasis a distancia, por lo que una mayor expresión de gal-9 está estrechamente asociada con una mejor supervivencia. En lesiones de cáncer gástrico fue significativamente mayor la expresión de gal-9 que en los tejidos adyacentes normales, proponiendo que la actividad de gal-9 exhibe actividad anti tumoral en los tejidos portadores del tumor a través del aumento de la agregación de las células tumorales (228). Además, la expresión del ARNm de gal-9 fue baja en pacientes con cáncer gástrico (229). Sugiriendo que está involucrada en la tumorigénesis de cáncer gástrico. La expresión positiva de gal-9 en células tumorales indica una mejor prognosis para pacientes con cáncer de mama o melanoma (183,184).

En melanoma, la pérdida de gal-9 se correlacionó significativamente con la progresión de melanoma (184), además de que la alta expresión en melanoma primario fue asociada con un mejor pronóstico, ya que pacientes con alta expresión de gal-9 mostraron significativamente menos metástasis a ganglios linfáticos, recurrencia y muerte que con respecto a los de baja

expresión. Por otra parte, la alta expresión de gal-9 en lesiones primarias se asoció significativamente con el tiempo libre de enfermedad y supervivencia (184). Por lo que, gal-9 podría estar involucrada en la supresión de metástasis de células tumorales, sugiriendo que gal-9 inhibe la adhesión e invasión de células cancerígenas al endotelio vascular y componentes de la MEC a través de la unión con integrinas expresadas en la superficie de células cancerígenas (230).

En cáncer de mama una mayor expresión de gal-9 está asociada con la reducción de metástasis y baja recurrencia en pacientes (183). Resultados similares fueron obtenidos en melanoma (184), carcinoma escamoso de cuello uterino (226) y carcinoma hepatocelular (231). En células MCF-7 y de melanoma, gal-9 induce su agregación tanto *in vitro* como *in vivo* y reduce la adhesión de las células MCF-7 a la MEC (225). En células endoteliales se reporta un mayor nivel de la proteína gal-9 en el microambiente tumoral, pudiendo tener un papel en la angiogénesis (165). En tejidos de glioma se observa una alta expresión de gal-9 y tim-3, asociándolo con la malignidad del tumor (232).

La mayoría de datos sugieren una relación inversa entre la expresión de gal-9 y la progresión del cáncer en la mayoría de los tumores sólidos; sin embargo, es importante notar que la mayoría de los estudios no toman en cuenta las variantes e isoformas de gal-9. Lahm y colaboradores, hacen una distinción entre las variantes gal-9LC y gal-9D5, indicando que para la minoría de los casos, estas variantes son diferencialmente expresadas en líneas celulares tumorales (222). Además Schulkens y colaboradores en cáncer de pulmón de células no pequeñas, determinaron la expresión de las variantes gal-9LC, gal-9D5 y gal-9D5/6 demostrando la presencia de las tres variantes, siendo gal-9D5 la variante de mayor expresión, confirmando también la expresión proteica de las isoformas por western blot (227).

4.6 Alteraciones de gal-9 en Cáncer Cérvicouterino

La expresión de gal-9 en CaCu ha sido poco estudiada, existen solo dos estudios donde reportan la expresión de gal-9, su probable asociación con el nivel del potencial maligno o diferenciación en la neoplasia cervical y la asociación con parámetros clínico-patológicos. Liang y colaboradores reportan que en tejido cervical de pacientes con CaCu y lesiones pre-malignas,

la expresión de gal-9 se ve disminuida en relación al grado de la neoplasia (226). Por lo que la disminución de gal-9 puede estar asociada con cambios tempranos en la carcinogénesis cervical de células epiteliales normales a neoplasia intraepitelial cervical. Sin embargo, también reportan una mayor expresión de gal-9 en carcinoma escamoso cervical invasivo bien diferenciado comparado a lesión intraepitelial escamosa de alto grado (226), sugiriendo que la expresión de gal-9 está asociada con el potencial maligno del carcinoma escamoso cervical invasivo.

Punt y colaboradores reportan que una mayor expresión de gal-9 en tejido tumoral muestra tendencia hacia un mejor pronóstico (233). Además, la expresión de gal-9 en el tumor podría estar relacionada con la infección por VPH (233). La baja o nula expresión de gal-9 se correlacionó con la presencia tanto de VPH 16 o VPH 18.

Existe muy poca información acerca de la expresión de gal-9 en CaCu, los artículos reportan que la expresión de gal-9 se ve alterada en éste tipo de cáncer; sin embargo, no se determinan las funciones en las que participa la gal-9 durante la transformación maligna. Por otro lado el estudio de la expresión de las variantes de ARNm e isoformas proteicas, permitirá profundizar en el papel que ejerce esta proteína en éste tipo de cáncer.

JUSTIFICACIÓN

Las galectinas, son proteínas cuyo cambio de expresión se ha identificado en diversos tipos de cáncer, participando en actividades vitales para la célula, como regulación del ciclo celular, adhesión matriz celular-células y célula- célula, y transmisión de señales intracelulares. Se ha visto que la disminución en su expresión ejerce un efecto negativo en la prognosis de pacientes con algunos tipos de cáncer. En CaCu se ha visto que la gal-9 disminuye su expresión durante la progresión de la neoplasia cervical sugiriendo que la disminución de su actividad de unión a carbohidratos está asociada con la progresión de la neoplasia cervical. El estudio de la expresión de esta proteína, sus isoformas proteicas y variantes del ARNm generarán información importante que podría ser utilizada para determinar el pronóstico de vida de las pacientes con CaCu.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día hay poca información acerca de la relación de gal-9 con CaCu, existen solo dos estudios en muestras de pacientes donde se encontró una relación entre la disminución en su expresión con el grado de neoplasia y la expresión de gal-9 por las células tumorales con buena prognosis; sin embargo, no se analizan las variantes de ARNm, ni las isoformas proteicas que podrían jugar un papel determinante en la transformación maligna del cérvix. Por lo tanto, hay 2 preguntas que aún no tienen respuesta.

¿El gen *LGALS9* se expresa en células de cérvix?

¿Qué variantes de ARNm e isoformas de la proteína gal-9 están presentes y cuál es su nivel de expresión en líneas celulares de cáncer de cérvix?

HIPÓTESIS

En líneas tumorales de CaCu la expresión de las variantes de ARNm de gal-9 están disminuidas con respecto a la línea no tumoral.

OBJETIVOS

General

- Determinar la expresión de gal-9 en líneas celulares de cáncer cérvicouterino

Particulares

Determinar:

- La presencia del ARNm del gen *LGALS9* en líneas tumorales
- Las variantes de ARNm del gen *LGALS9* presentes en las líneas tumorales
- Los niveles de expresión de las variantes de ARNm del gen *LGALS9* identificadas en las líneas tumorales y no tumoral
- La expresión de la proteína gal-9 y sus isoformas proteicas en líneas tumorales

MATERIAL Y METODOS

Cultivo celular

Las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), adicionadas con 7.5% de suero fetal bovino (SBF), penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 10 µg/mL, se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Cuando las células llegaron a una confluencia del 80% fueron despegadas de la siguiente manera: se retiró el medio y fueron lavadas con 2 mL de PBS tres veces, se puso 0.5 mL de tripsina y con movimientos se expandió por toda la botella, se retiró la tripsina y se incubó por 5 minutos a 37 °C, pasado el tiempo se resuspendieron las células con 1.5 mL de medio DMEM, se utilizó 1.4 mL de las células resuspendidas para extracción de ARN total y el resto se dejó en la botella para mantener las líneas celulares.

Se cultivaron 4 líneas celulares de cáncer cérvicouterino y una línea control (Tabla 1).

Tabla 1. Características de las líneas celulares de cáncer cérvicouterino.

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	CARACTERISTICAS
CaSki	carcinoma epidermoide de cérvix	VPH tipo 16, 600 copias
SiHa	carcinoma epidermoide de cérvix	VPH tipo 16, 1 a 2 copias
HeLa	adenocarcinoma de cérvix	VPH tipo 18, 10 a 50 copias
C33A	carcinoma de cérvix	negativa a VPH
HaCaT	queratinocitos humanos	No tumoral

Extracción del ARN total

A partir de botellas de cultivo p25 a una confluencia de 80% se extrajo ARN total con el kit Nucleo Spin RNA II (Macherey Nagel), siguiendo las especificaciones del fabricante para cultivos celulares. Se determinó la integridad del ARN mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. La concentración y pureza del ARN fue analizado usando el nanofotómetro PEARL (IMPLEN). Después se realizó tratamiento con DNasa (Thermo Scientific), a cada 1 µg de ARN se le puso un 1 µL de DNasa I (1 U/µL), 1 µL de buffer de reacción al 10X y agua

tratada con DEPC para un volumen de reacción de 10 μ L. Se dejó incubando por 1 hr a 37 $^{\circ}$ C, para detener la reacción se adicionó 1 μ L de EDTA (50 mM) y se incubó a 65 $^{\circ}$ C por 10 minutos. Después del tratamiento con DNasa se determinó la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se volvió a medir la concentración y pureza del ARN mediante el nanofotómetro. Para asegurar la ausencia de ADN se realizó PCR de punto final con el kit PCR master mix (Promega), con 1 μ L del ARN tratado, se puso 0.5 μ L de cada primer (1 μ M) para HPRT, 5 μ L de Master Mix (2X) (Promega) y agua libre de nucleasas para un volumen de reacción de 10 μ L. La PCR se realizó con el equipo termociclador C1000 Touch (Bio-Rad) utilizando el protocolo siguiente:

Desnaturalización	95 $^{\circ}$ C-5:00 min.	} 40 Ciclos
Desnaturalización	95 $^{\circ}$ C-0:45 min.	
Alineamiento	56 $^{\circ}$ C-0:30 min.	
Elongación	72 $^{\circ}$ C-0:30 min.	
Elongación	72 $^{\circ}$ C-5:00 min.	

Los productos de la PCR se observaron en gel de agarosa al 1% para corroborar la ausencia de ADN en la muestra de ARN extraída.

Después de corroborar la ausencia de ADN se hizo la síntesis de ADNc con el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA (Thermo Scientific). Se realizó utilizando 2 μ g de ARN, 1 μ L de primers oligo (dT), 4 μ L de buffer de reacción, 1 μ L de inhibidor de nucleasas, 2 μ L de mezcla de dNTP (10mM), 1 μ L de la enzima RevertAid (1 U/ μ L) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 μ L. Se mezcló suavemente y se colocó en el termociclador C1000 Touch (Bio-Rad) siguiendo el siguiente protocolo: 60 minutos a 42 $^{\circ}$ C y para terminar la reacción, 5 minutos a 70 $^{\circ}$ C. La alícuota de ADNc se usó para los PCR punto final.

Identificación de la expresión del gen *LGALS9* en las líneas celulares por PCR punto final

Se utilizaron los siguientes primers para identificar el ARNm del gen *LGALS9*, los cuales presentan una temperatura de alineamiento de 56 °C.

Estos primers identifican 4 variantes de ARNm de *LGALS9* (Tabla 2), dando dos tamaños de productos amplificados.

Sentido: 5'-CTGTGCAGCTGTCCTACATCA-3'

Antisentido: 5'-GGATGACTGTCTGGGTAATGG-3'

Tabla 2. Variantes de ARNm de *gal-9* que se amplifican con los primers arriba descritos.

Variantes de ARNm	Producto
Gal-9LC	177 pb
Gal-9D10	177 pb
Gal-9D5	81 pb
Gal-9D5/10	81 pb

Para el PCR punto final se utilizó el kit PCR Master Mix (Promega), en cada tubo de reacción, se colocó 5 µL de Master Mix (2X) (Promega) y 0.5 µL del respectivo primer sentido (10 µM) y antisentido (10 µM), 1 µL de cDNA y agua libre de nucleasas para 10 µL de reacción.

El PCR de punto final se realizó en el equipo termociclador C1000 Touch (Bio-Rad) utilizando el protocolo siguiente:

Desnaturalización	95 °C-5:00 min.	} 40 ciclos
Desnaturalización	95 °C-0:45 min.	
Alineamiento	56 °C-0:30 min.	
Elongación	72 °C-0:30 min.	
Elongación	72 °C-5:00 min.	

Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa al 2.5%.

Identificación de la expresión de las variantes del ARNm del gen *LGALS9* en las líneas celulares por PCR punto final

Para determinar la presencia de las variantes de ARNm de gal-9, se utilizaron primers específicos (Tabla 3) de las variantes de ARNm de gal-9, previamente reportados (218), presentando una temperatura de alineamiento de 61 °C. Todos los primers fueron sintetizados por (Integrated DNA Technologies).

Tabla 3. Primers utilizados para detectar la presencia del ARNm de gal-9 y de las variantes en las líneas celulares.

Variantes de LGALS9	Sentido	Antisentido	Producto
LC y D10	5'-CTGTGCAGCTGTCCTACATCA-3'	5'-GGATGACTGTCTGGGTAATGG-3'	177 pb
D5 y D5/10			81 pb
LC	5'-GCAGACAAAAACCTCCCG-3'	5'-CCCAGAGCACAGGTTGATG-3'	254 pb
D5	5'-ATCAGCTTCCAGCCTCCC-3'	5'-CCCAGAGCACAGGTTGATG-3'	255 pb
D6	5'-GCAGACAAAAACCCAGACA-3'	5'-CCCAGAGCACAGGTTGATG-3'	218 pb
D10	5'-GCAGACAAAAACCTCCCG -3'	5'-TTCACACAAGATCCACACCTCT-3'	247 pb
D5/6	5'-CTACATCAGCTTCCAGACCCA-3'	5'-CCCAGAGCACAGGTTGATG-3'	223 pb
D5/10	5'-ATCAGCTTCCAGCCTCCC-3'	5'-TTCACACAAGATCCACACCTCT-3'	248 pb
D6/10	5'-GCAGACAAAAACCCAGACA -3'	5'-TTCACACAAGATCCACACCTCT-3'	211 pb
D5/6/10	5'-CTACATCAGCTTCCAGACCCA-3'	5'-TTCACACAAGATCCACACCTCT-3'	216 pb
HPRT	5'-CCTGGCGTCGTGATTAGTGATGAT-3'	5'-GAGCAAGACGTTTCAGTCCTGTC-3'	147 pb

Para el PCR punto final se utilizó el kit PCR Master Mix (Promega), en cada tubo de reacción, se colocó 5 µL de Master Mix (2X) (Promega) y 0.5 µL del respectivo primer sentido (10 µM) y antisentido (10 µM), 1 µL de cDNA y agua libre de nucleasas para 10 µL de reacción.

El PCR de punto final se realizó en el equipo termociclador C1000 Touch (Bio-Rad) utilizando el protocolo siguiente:

Desnaturalización	95 °C-5:00 min.	} 40ciclos
Desnaturalización	95 °C-0:45 min.	
Alineamiento	61 °C-0:30 min.	
Elongación	72 °C-0:30 min.	
Elongación	72 °C-5:00 min.	

Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa al 2.5%.

Cuantificación de las variantes de ARNm del gen *LGALS9* por PCR tiempo real

Para cuantificar las variantes gal-9LC y gal-9D5 se validó el método de $\Delta\Delta C_t$. Para lo cual se utilizaron 4 diluciones a 1/10 con un rango dinámico de 20 ng/ μ L a 0.02 ng/ μ L de ADNc, como gen endógeno se utilizó HPRT. Para ambas validaciones se utilizó cDNA de la línea control HaCaT y se realizaron duplicados de cada punto de dilución. La validación se realizó en el sistema de PCR tiempo real StepOne (Thermo Scientific) utilizando un protocolo de amplificación de dos etapas estándar ($T_{\text{alineamiento}}$ 61 °C) seguido por un análisis de curva de melting.

Posteriormente a la validación, se cuantificaron las variantes con la técnica de PCR en tiempo real, con el sistema de PCR tiempo real StepOne (Thermo Scientific) utilizando un protocolo de amplificación de dos etapas estándar ($T_{\text{alineamiento}}$ 61 °C), seguido por un análisis de curva de melting. Para cada tubo de reacción fue un total de 10 μ L, conteniendo 5 μ L de SYBER GREEN (2X) y 0.5 μ L del respectivo primer sentido (10 mM) y antisentido (10 mM), 20 ng de ADNc y agua libre de nucleasas para 10 μ L. Los primers utilizados son los mismos de la tabla 3.

Identificación de la proteína gal-9 por Western Blot

De una botella p25 a una confluencia del 80%, las células fueron despegadas de la siguiente manera: se retiró el medio y fueron lavadas con 2 mL de PBS por tres veces, se puso 0.5 mL de tripsina, se retiró la tripsina y se incubó por 5 minutos a 37 °C, pasado el tiempo se

resuspendieron las células con 1.5 mL de medio DMEM, se utilizó 1.4 mL de las células resuspendidas para extracción de proteínas. Las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X, pH 7.4 y posteriormente se agregaron 100 µL de PBS + 1 µL de inhibidor de proteasas (General Electric Healthcare), manteniéndolas a 4 °C. Se lisaron mecánicamente con jeringas de calibre 27G y 21G pasando 30 veces la muestra. La concentración de proteína fue determinada usando el nanofotómetro PEARL (IMPLEN). Las muestras se manejaron a la misma cantidad de proteína (80 µg), colocando el mismo volumen de buffer de carga, se mezcló y fueron calentadas por 5 minutos, se dejaron enfriar y posteriormente se cargaron en el pozo (80 µg de proteína/pozo) e inmediatamente separadas por gel de electroforesis de poliacrilamida al 12.5% en condiciones desnaturalizantes (SDS al 10%) con buffer de corrida al 1X a 100V por 1 hr. Terminada la electroforesis se hizo la transferencia de las proteínas a la membrana PVDF (Millipore) previamente activada con metanol, usando buffer de transferencia 1X. La membrana fue bloqueada con albúmina (5% de albúmina disuelta en PBS/0.1% tween) por 1 hora, se lavó tres veces la membrana con PBS/0.1% tween por 5 minutos con PBS/0.1% tween y luego fue incubada toda la noche a 4 °C con anticuerpo anti-galectina-9 de conejo (1:1500, Abcam ab69630), que reconoce el N-terminal de gal-9. La membrana fue lavada tres veces con PBS/0.1% tween por 5 minutos y después se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo (anti-IgG) unido a la enzima HRP (Peroxidasa del rábano, por sus siglas en inglés horseradish peroxidase) (1:2000, Gibco) por una hora a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana fue lavada tres veces con PBS/0.1% tween y revelada con DAB por 5 minutos, para detener la reacción se sumergió la membrana en agua destilada.

Análisis estadístico

Los datos de tiempo real fueron mostrados como la media de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se utilizó el análisis de ANOVA de una vía post Tukey para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ARNm entre las líneas celulares tumorales y la control. Valores $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos y para todos los cálculos se utilizó el software SPSS 22 (IBM).

RESULTADOS

Presencia del ARNm del gen *LGALS9* en líneas celulares de cáncer cérvicouterino

Para determinar la presencia del ARNm de la gal-9 en líneas celulares de CaCu, se hizo un ensayo de PCR de punto final, en el cual se utilizó un par de primers diseñados con el programa Universal ProbeLibrary (Roche), para ensayos de PCR en tiempo real empleando sondas Taqman. Los primers fueron verificados en el BLAST para confirmar su especificidad.

Las líneas celulares de CaCu y la línea control HaCaT expresan el transcrito que corresponde al tamaño esperado de 177 pb, además se observó una banda inesperada de menor tamaño (81 pb) (Figura 6). Por lo cual se realizó el alineamiento de los primers con las variantes de gal-9 para determinar si el producto amplificado correspondía a una variante del ARNm.

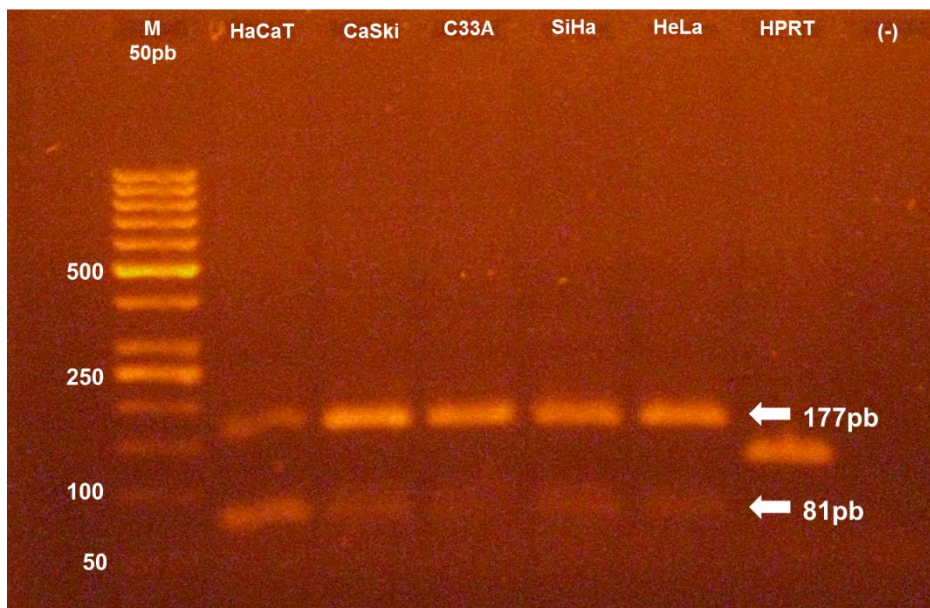


Fig. 6. Productos amplificados de transcritos del gen de la gal-9 en las líneas celulares de cáncer de cérvix y HaCaT por PCR punto final. La banda de 177 pb puede corresponder al transcrito de la variante LC, D10 o a ambas, la banda de 81 pb puede corresponder al transcrito de la variante D5, D5/10 o a ambas. Gel de agarosa al 2.5%, marcador de peso molecular de 50 pb.

En la figura (Figura 7) se muestra la secuencia nucleotídica de las variantes de ARNm del gen de la gal-9. Se muestran alineados los oligos utilizados en el PCR de punto final. El primer sentido alineó en todas las variantes, el primer antisentido sólo se alineó a 4 variantes de gal-9: gal-9LC, gal-9D5, gal-9D10 y gal-9D5/10. Con este par de primers se pudieron identificar

dos de las tres variantes más frecuentemente descritas, la de tamaño completo (gal-9LC) y la variante con eliminación del exón 5 (gal-9D5) además de dos variantes que tienen eliminado el exón 10 (gal-9D10 y gal-9D5/10). La eliminación del exón 10 del transcrito maduro causa un desplazamiento del marco de lectura, resultando en un codón de paro prematuro en el exón 11 generando un DRC-C truncado. Por lo cual, se pueden estar identificando de dos a cuatro variantes en el gel.

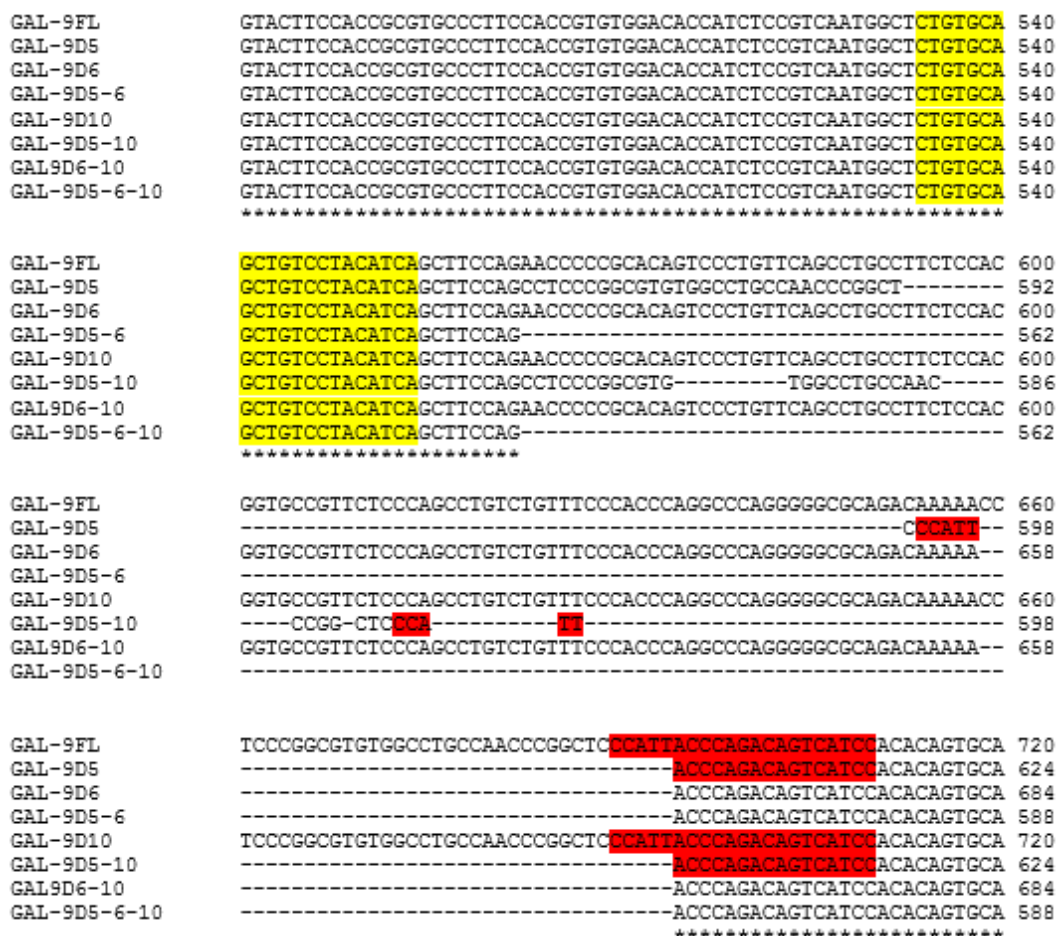
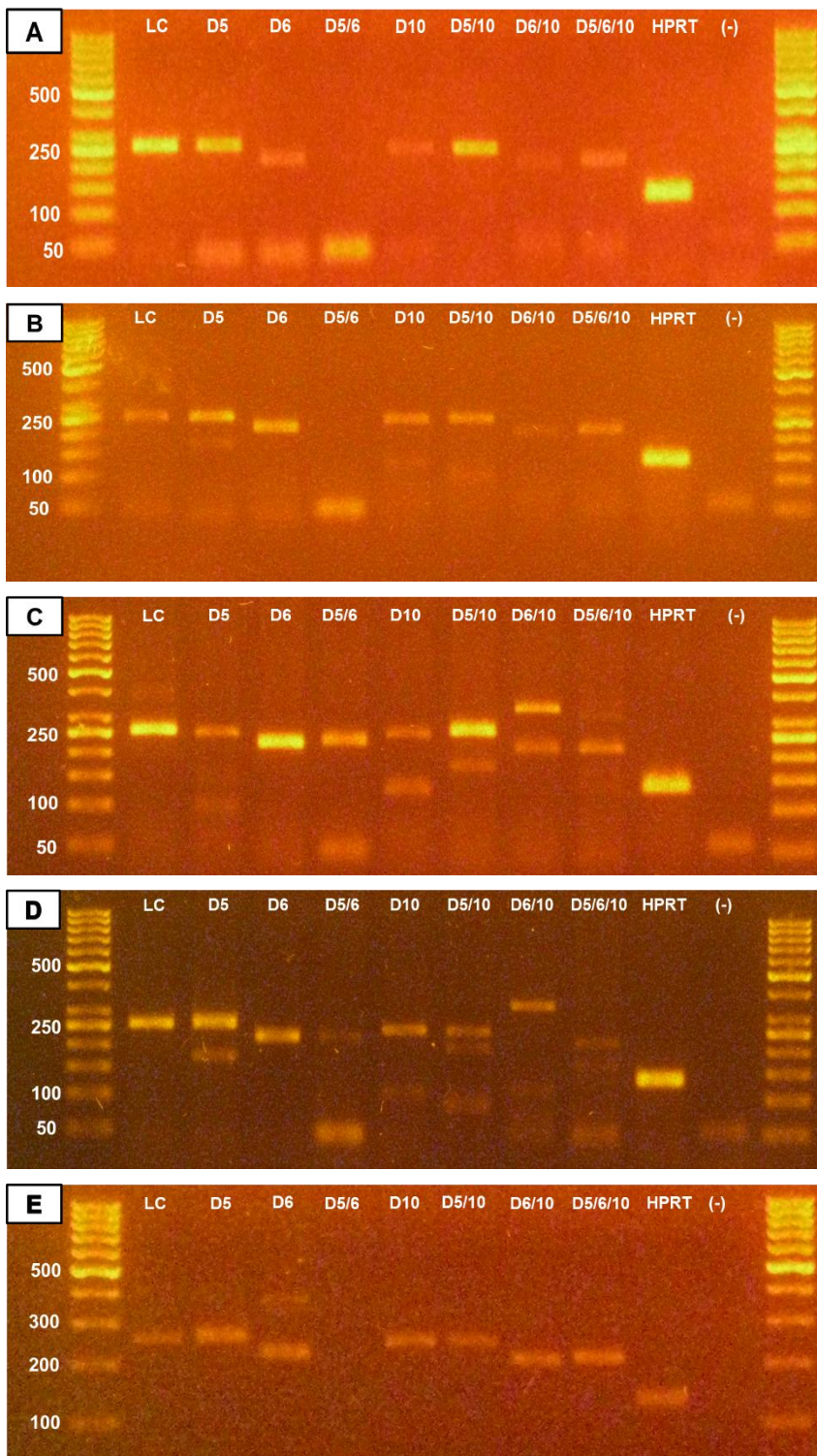


Fig. 7. Alineamiento de los primers utilizados para identificar gal-9. Se identifican 4 variantes que pueden amplificar los primers. En amarillo es el alineamiento del primer sentido y en rojo el alineamiento del primer antisentido.

Identificación de las variantes de ARNm del gen *LGALS9*

El ARNm del gen *LGALS9* está sujeto a un amplio proceso de splicing, por lo que se propuso determinar la presencia de todas las variantes en las líneas celulares en estudio. El proceso de splicing de gal-9 en humanos ocurre en los exones 5, 6 y 10, por lo que se buscó la presencia de todas las variantes (exón eliminado (D)5, D6, D10, D5/6, D5/10, D6/10 y D5/6/10) así como la variante de longitud completa (LC). Con ese fin, se realizó la técnica de PCR de punto final a partir del ADNc de las líneas celulares de CaCu y la línea HaCaT, utilizando primers específicos para cada variante de gal-9. Los productos de amplificación se muestran en la Figura 8. En la línea celular HaCaT (Fig. 8A), se detectaron siete variantes de la gal-9, con una mayor intensidad de señal en las variantes gal-9LC, D5 y D5/10, no se identificó la variante gal-9D5/6 bajo estas condiciones. En la línea celular CaSki (Fig. 8B) se detectaron las 7 variantes de gal-9 que se detectaron en la línea celular HaCaT; sin embargo, no hubo diferencias importantes en la intensidad de señal de alguna variante y la variante gal-9D5/6 de igual manera no se detectó. En la línea celular C33A (Fig. 8C) se identificaron las 8 variantes de gal-9, observando una mayor intensidad de señal para las variantes gal-9LC, D6 y D5/10. En la línea celular SiHa (Fig. 8D) se observaron 7 variantes de gal-9, pero en esta línea no se detectó la variante gal-9D6/10; sin embargo, detectamos un amplificado no esperado de un peso aproximado de 350 pb. En la línea celular HeLa (Fig. 8E) se identificaron 7 variantes de gal-9, los productos de amplificación fueron muy tenues y no se detectó la variante gal-9D5/6 bajo estas condiciones.



Variante	Producto
LC	254 pb
D5	255 pb
D6	218 pb
D5/6	223 pb
D10	247 pb
D5/10	248 pb
D6/10	211 pb
D5/6/10	216 pb

Fig. 8. Detección de las variantes de ARNm de Gal-9 en líneas celulares de cáncer de cérvix y HaCaT por PCR de punto final. (A) Línea celular HaCaT. (B) Línea celular CaSki. (C) Línea celular C33A. (D) Línea celular SiHa. (E) Línea celular HeLa. Geles de agarosa al 2.5%. Carril 1 y 12 marcador de peso molecular de 50 pb.

Dado que la variante gal-9D5/6 fue detectada en la línea celular C33A se procedió a aumentar la concentración de ADNc para ver si se lograba identificar en las células HaCaT, CaSki y HeLa. Se logró amplificar el producto en las líneas celulares HaCaT y CaSki, siendo en la última tenue (Figura 9). En la línea celular HeLa no se obtuvo producto de amplificación.

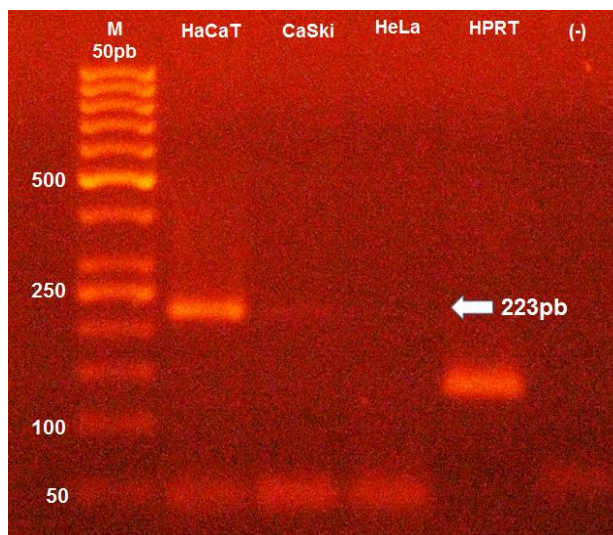


Fig. 9. Detección del transcrito específico de gal-9D5/6 en líneas celulares de cáncer de cérvix por PCR punto final. Banda esperada de 223 pb. Gel de agarosa al 2.5%, carril 1 marcador de peso molecular de 50 pb. Carril 5, se muestra el control positivo del ensayo que corresponde al producto del gen HPRT con una banda esperada de 147 pb.

Para la línea celular SiHa donde no se observó la banda perteneciente a la variante gal-9D6/10, se decidió aumentar la concentración del ADNc. Se detectó la banda esperada de la variante (211 pb), aunque se amplificó un producto de mayor tamaño, no esperado (Figura 10).

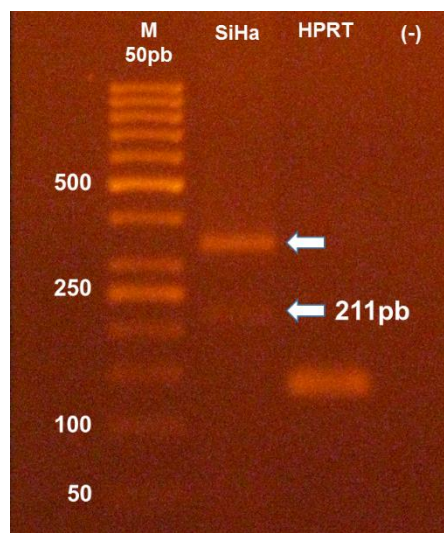


Fig. 10. Detección del transcrito específico de gal-9D6/10 en la línea celular SiHa por PCR de punto final. Banda esperada de 211 pb. Gel de agarosa al 2.5%. Carril 1 marcador de peso molecular de 50 pb.

A través de un análisis densitométrico usando el programa ImageJ se determinó la intensidad de las bandas, posteriormente se normalizó cada variante con la banda del gen endógeno (HPRT). Los resultados obtenidos, sobre la expresión de las variantes de gal-9 en las líneas tumorales y la línea no tumoral se resumen en la Tabla 4. Como se observa en la tabla, las variantes gal-9LC, gal-9D5 y gal-9 D5/10 son las que mayor intensidad de banda tuvieron en la línea no tumoral (HaCaT). En las líneas tumorales, la línea celular SiHa tuvo una mayor intensidad de banda en las variantes gal-9LC, gal-9 D5 y gal-9D6. Y la línea celular C33A presentó una mayor intensidad de banda en las variantes gal-9LC, gal-9D6 y gal-9D5/10.

Tabla 4. Variantes de ARNm de gal-9 en líneas celulares de cáncer cérvicouterino.

	LC	D5	D6	D5/6	D10	D5/10	D6/10	D5/6/10
HaCaT	0.925717	0.808475	0.663465	*	0.641041	0.813215	0.600452	0.697462
SiHa	0.844339	0.856831	0.743527	0.475171	0.631284	0.521518	*	0.501987
C33A	1.070774	0.725852	1.061774	0.83436	0.699814	1.022817	0.700529	0.739381
CaSki	0.698645	0.788998	0.792752	*	0.716839	0.722295	0.614016	0.708784
HeLa	0.86922215	1.061719	1.010976	**	0.974657	0.877000	0.981847	1.062337

Los asteriscos representan: (*) no se identificó la variante bajo estas condiciones; sin embargo, se identificó en otras condiciones experimentales, por tal motivo no se reporta su nivel de expresión, (**) no se identificó la variante.

Por lo que se pensaría que el nivel de expresión podría ser diferente entre líneas tumorales y la línea no tumoral, además de que podría ser diferente entre las mismas líneas tumorales.

Cuantificación de las variantes de ARNm de LGALS9 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino

Se realizó la cuantificación de los ARNm de las variantes mejor conocidas en la literatura, que son la variante de longitud completa (gal-9LC), gal-9 con eliminación del exón 5 (gal-9D5) y gal-9 con eliminación del exón 5 y 6 (gal-9D5/6) que codifican para las isoformas proteicas gal-9L (isoforma larga), gal-9M (isoforma mediana) y gal-9S (isoforma corta) respectivamente. Estas isoformas proteicas difieren en el tamaño de su péptido de unión. Para la cuantificación se realizó primero la validación de las variantes de gal-9 por el método de $\Delta\Delta C_t$.

Se validó primero la variante gal-9LC (Figura 11), como gen endógeno se utilizó HPRT. Se utilizaron 4 diluciones de 1/10 con un rango dinámico de 20 ng/ μ L a 0.02 ng/ μ L de ADNc de la línea no tumoral (HaCaT), la eficiencia en la amplificación fue de 99.39% para gal-9LC y 97.30% para HPRT. La línea de regresión que se obtiene del procesamiento de los datos debe tener una pendiente menor a 0.1 para que se valide el gen endógeno y el rango de concentración a trabajar. La pendiente fue de -0.0518 por lo cual quedaron validadas las concentraciones y el gen endógeno. Se realizaron tres ensayos y en cada ensayo se hicieron duplicados de cada punto de dilución.

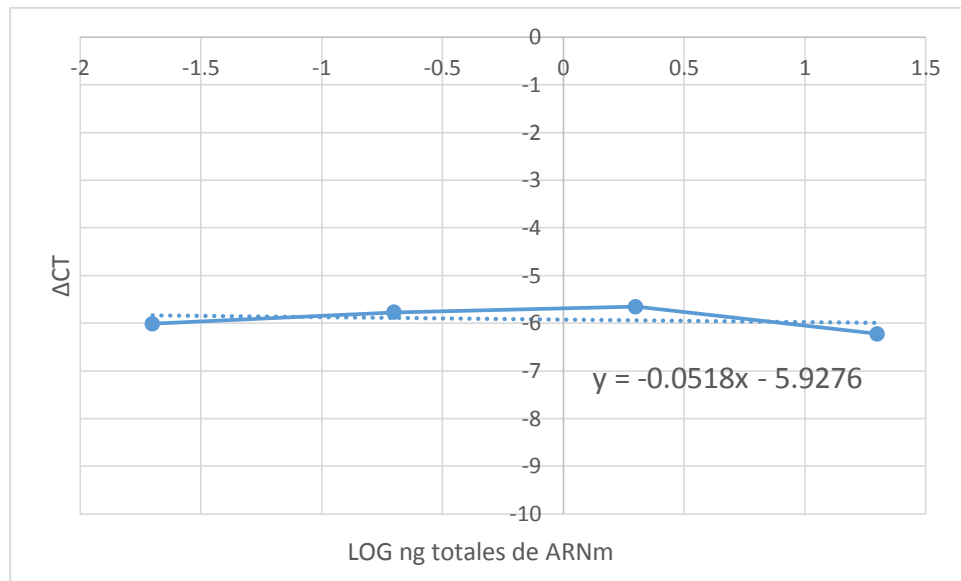


Fig. 11. Eficiencia relativa gal-9LC vs HPRT. Validación de la variante gal-9LC utilizando como gen normalizador HPRT a diferentes diluciones con ADNc de la línea celular HaCaT como control, obteniéndose eficiencias similares dentro del rango permitido 97% al 100% y con una pendiente ≤ 0.1 .

Para la validación de la variante gal-9D5 (Figura 12) se utilizó también como gen endógeno HPRT. Se utilizaron 4 diluciones de 1/10 con un rango dinámico de 20 ng/ μ L a 0.02 ng/ μ L de ADNc de la línea no tumoral (HaCaT), la eficiencia en la amplificación fue semejante en ambos genes, 97.33% para gal-9D5 y 97.30% para HPRT. La línea de regresión que se obtiene del procesamiento de los datos debe tener una pendiente menor a 0.1 para que se valide el gen endógeno y el rango de concentración a trabajar. La pendiente fue de -0.0008 por lo cual quedó validado el experimento. Se realizaron tres ensayos y en cada ensayo se hicieron duplicados de cada punto de dilución.

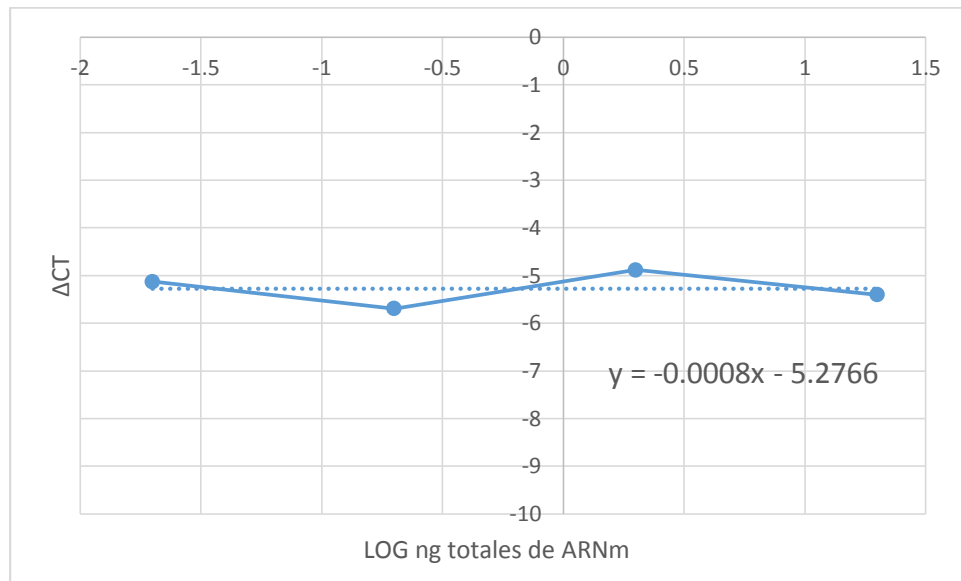


Fig. 12. Eficiencia relativa gal-9D5 vs HPRT. Validación de la variante gal-9D5 utilizando como gen normalizador HPRT a diferentes diluciones con ADNc de la línea celular HaCaT como control, obteniéndose eficiencias similares dentro del rango permitido 97% y con una pendiente ≤ 0.1 .

La variante gal-9D5/6 no fue validada ya que la detección del producto aparecía en Ct tardíos (Ct 28), además de que no se mantenía la linealidad de los Ct, por lo cual no se obtuvieron una pendiente y una eficiencia adecuadas. Se aumentó la concentración de ADNc y se modificaron las diluciones, pero de igual manera no se logró obtener una eficiencia y una pendiente adecuadas. Por lo que se concluyó que la baja expresión de gal-9D5/6 no permitió su validación.

Después de la validación de las variantes gal-9LC y gal-9D5, se hizo la cuantificación relativa en las diferentes líneas celulares. Se hizo por triplicado la cuantificación utilizando una concentración de 20 ng/ μ L. En la variante gal-9LC (Figura 13) se determinó que hay diferencias estadísticamente significativas entre las líneas tumorales y la línea no tumoral, observándose una menor expresión en las líneas tumorales de la variante gal-9LC. Haciendo un análisis independiente entre las líneas tumorales no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

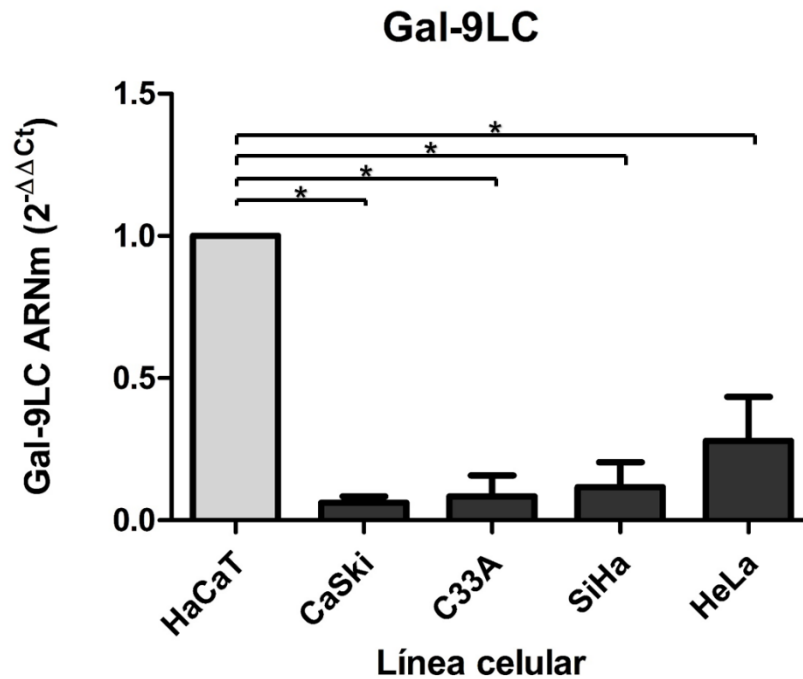


Fig. 13. Niveles de expresión de Gal-9LC en líneas celulares de cáncer de cérvix evaluados por PCR tiempo real utilizando como control a la línea celular HaCaT. Para determinar diferencias estadísticamente significativas se realizó un análisis de ANOVA de una vía, post Tukey. * $p < 0.05$ $n = 3$

En la variante gal-9D5 (Figura 14) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas tumorales y la línea no tumoral, observándose una menor expresión de ésta variante en las líneas tumorales. Además se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas tumorales, teniendo aún menor expresión en las líneas celulares CaSki y C33A, comparadas con SiHa y HeLa.

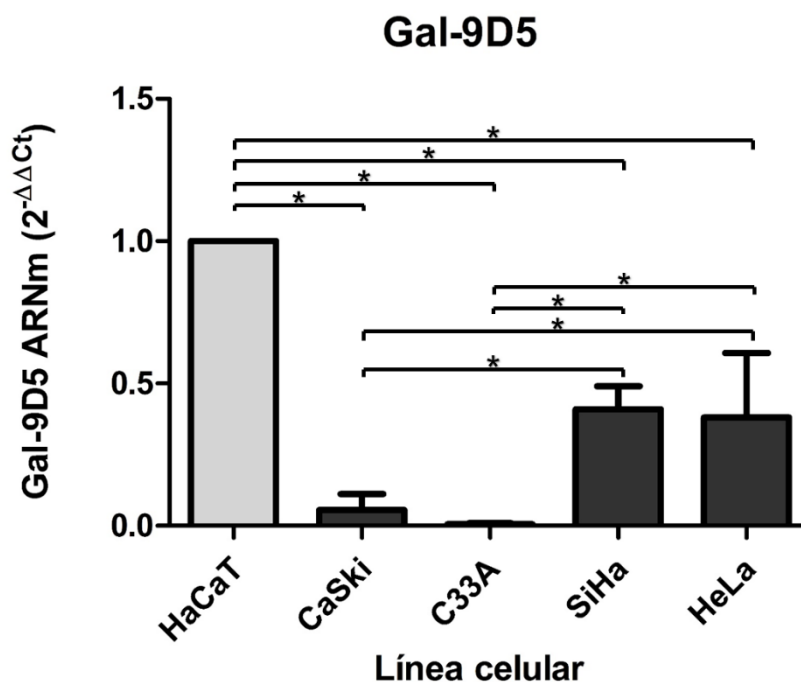


Fig. 14. Niveles de expresión de Gal-9D5 en líneas celulares de cáncer de cérvix evaluados por PCR tiempo real utilizando como control a la línea celular HaCaT. Para determinar diferencias estadísticamente significativas se realizó un análisis de ANOVA de una vía, post Tukey. * $p < 0.05$ $n = 3$

Expresión de las isoformas proteicas de gal-9

Para la determinación de la expresión de las isoformas proteicas que expresan las líneas tumorales se realizó un ensayo de western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce el dominio N-terminal presente en las 8 isoformas proteicas. En la membrana del western blot (Figura 15), se observaron 3 bandas en la línea no tumoral y en las líneas tumorales CaSki, HeLa y C33A, aunque menos intensas en éstas últimas. En la línea celular SiHa se observa muy tenuemente solo una banda. Para poder determinar que isoformas proteicas se expresaron, se realizó primero el cálculo del PM de cada isoforma proteica, a partir del número de aminoácidos que contiene cada isoforma (Tabla 5). Para estimar el PM de cada banda, se construyó primero una curva de calibración con los valores del marcador de peso molecular. Posteriormente, se obtuvo la ecuación de la recta, extrapolando los valores se obtuvieron los pesos moleculares de las bandas observadas en la membrana, siendo de 39.05 KDa, de 35.45 KDa y de 30.66 KDa que pertenecen a las isoformas LC, D5 y D10, respectivamente. Se esperaba detectar más bandas

que correspondieran a las isoformas proteicas de gal-9, por el reconocimiento del anticuerpo al N-terminal; pero solo se identificaron tres isoformas proteicas.

Tabla 5. Peso molecular de isoformas proteicas de gal-9 de acuerdo a su número de a.a. (1 a.a. \approx 110 Da)

Variante	No de a.a.	PM Aprox.
Gal-9 LC	353	39.05 KDa
Gal-9 D6	341	37.73 KDa
Gal-9 D5	321	35.53 KDa
Gal-9 D5/6	309	34.21 KDa
Gal-9 D10	277	30.69 KDa
Gal-9 D6/10	265	29.37 KDa
Gal-9 D5/10	245	27.17 KDa
Gal-9 D5/6/10	233	25.85 KDa

Las isoforma gal-9LC es la de mayor intensidad en las líneas tumorales (CaSki, HeLa y C33A) y la línea no tumoral HaCaT, siendo en ésta última más intensa la señal. De igual manera las isoformas gal-9D5 y gal-9D10 presentaron una mayor intensidad de señal en la línea no tumoral que en las líneas tumorales. En la línea SiHa solo se observó de manera tenue la isoforma gal-9LC.

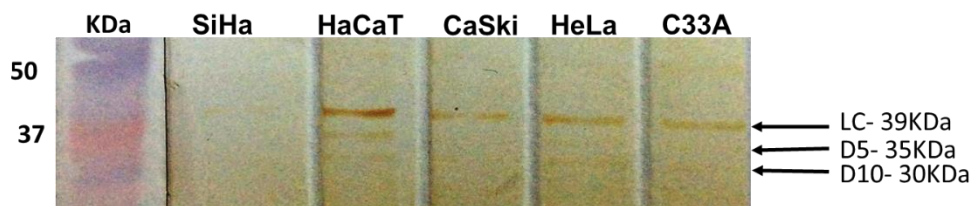


Fig. 15. Presencia de las isoformas proteicas gal-9LC, gal-9D5 y gal-9D10 en líneas celulares de cáncer de cérvix y en la línea celular HaCaT.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La expresión de gal-9 se ha demostrado en pacientes con CaCu, observándose una disminución de su expresión conforme avanza la neoplasia a cáncer (226) y la relación del VPH 16 ó 18 con la baja expresión de gal-9 (233). Sin embargo, se desconoce la función que pueda tener gal-9 en CaCu, además de que no existe información acerca de la expresión de las isoformas proteicas en líneas celulares de CaCu.

Para estudiar los cambios de expresión de proteínas en CaCu, se han utilizado cultivos de células extraídas de biopsias de pacientes con cáncer. A la fecha en líneas celulares de CaCu no se ha estudiado la expresión de las variantes de gal-9 y la función de sus isoformas proteicas, que se ha visto que pueden ejercer funciones contrarias. Por lo tanto, es necesario estudiar las modificaciones en la expresión de las variantes y las funciones que ejercen las isoformas proteicas en líneas celulares de CaCu, como CaSki, C33A, SiHa, HeLa, CALO e INBL.

Por lo anteriormente expuesto en el presente trabajo de tesis se evaluó la expresión de gal-9 en las líneas celulares CaSki, C33A, SiHa y HeLa para determinar la expresión del gen, el perfil de expresión de las variantes, los niveles de expresión de gal-9LC y gal-9D5 y la expresión de las isoformas proteicas.

Se determinó la expresión del gen *LGALS9*, donde también se identificaron variantes del transcrito de ARNm de dicho gen en las líneas celulares, por lo que el mecanismo de splicing que origina las variantes de gal-9 se lleva a cabo en las líneas celulares de cáncer de cérvix.

El splicing alternativo del ARNm del gen *LGALS9* se ha reportado en células y tejidos de diferente origen. Tres principales variantes del transcrito han sido descritas en las que hay eliminación de los exones 5 y 6 que codifican para el péptido que une a los dos DRC (164,209,219). La eliminación del exón 10 también ha sido descrita, ésta ocasiona un corrimiento del marco de lectura (234). En algunos estudios se han reportado variantes del ARNm del gen *LGALS9* en diferentes líneas celulares. En células endoteliales se reportan 5 variantes del ARNm de *LGALS9*: gal-9LC, gal-9D5, gal-9D5/6, gal-9D5/10 y gal-9D5/6/10; la variante gal-9D5 fue la más abundantemente expresada (165). En células de colon se reportan las variantes gal-9LC, gal-9D5, gal-9D10 y gal-9D5/10 (221). En tejido placentario se identificaron 6 variantes del ARNm de *LGALS9* que son: gal-9LC, gal-9D5, gal-9D6, gal-

9D5/6, gal-9D5/10 y gal-9D5/6/10, siendo las variantes gal-9LC y gal-9D5 las de mayor expresión (218). Por lo que la presencia de las variantes y su nivel de expresión depende de la línea celular.

Al conocer las variantes de ARNm de gal-9 que están presentes en las líneas celulares de CaCu, se podrían proponer estudios para evaluar la función de las isoformas proteicas. En este estudio se identificaron las 8 variantes del ARNm de gal-9 en las líneas celulares HaCaT, CaSki, C33A y SiHa; sin embargo, en la línea celular HeLa no se detectó la variante gal-9D5/6. Por lo que el mecanismo de splicing en las líneas celulares de cérvix da origen a prácticamente todas las variantes posibles, excepto en la línea celular HeLa. Además se pudo observar, por la intensidad de las bandas amplificadas, que el nivel de expresión de las variantes de ARNm de gal-9 puede variar de manera notable en cada una de las líneas celulares, es decir, cuando se analiza cada línea celular de manera independiente las intensidades de las bandas, los niveles de expresión de las variantes son muy diferentes, lo cual sugiere que la cantidad de isoformas proteicas será diferente lo que tendrá un efecto sobre la función que ejerza cada una de ellas. Sin embargo, es necesario realizar estudios cuantitativos de cada variante.

Aunque es limitada la información, estudios iniciales sugieren que el tamaño del péptido de unión de las isoformas proteicas tiene un efecto en la función de la proteína. Por ejemplo, se ha visto que pueden modificar la función que ejercen sobre la expresión de genes. En las células LoVo de carcinoma de colon el aumento de la isoforma gal-9LC disminuye la expresión del gen de la E-selectina, la sobreexpresión de gal-9D5 y gal-9D5/6 incrementan la expresión de dicho gen con un incremento en la adhesión a células endoteliales (209). También pueden ejercer efectos diferentes sobre la adhesión a moléculas de la matriz extracelular. Ensayos *in vitro* muestran que las isoformas gal-9LC y gal-9D5/6 reducen la adhesión a colágeno tipo IV, fibronectina, vitronectina y laminina de células MCF7 (183). Además la isoforma gal-9LC ejerce un mayor poder quimioatrayente de eosinófilos en comparación con la isoforma gal-9D5/6 (208). Con respecto a las demás isoformas proteicas de gal-9, se han identificado solo los transcritos. Se ha identificado la variante gal-9D5/10 en células endoteliales (165), en células epiteliales de colon y en linfocitos de sangre periférica (234). La variante gal-9D5/6/10 se identificó por primera vez en células endoteliales (165). En este estudio además de las variantes descritas hemos identificado una variante de gal-9 (gal-9D6/10) en células de cáncer de cérvix

que no había sido reportada en ningún otro tipo celular. Los diferentes niveles de expresión de los transcritos encontrados en las líneas celulares de CaCu, que originan las isoformas proteicas y lo reportado, sugiere que éstas cumplen diversas funciones tanto intracelularmente como extracelularmente, pudiendo cada isoforma tener una mayor actividad biológica o tener funciones contrarias en las que participa gal-9, basado en las diferencias en el tamaño del péptido de unión y el truncamiento del DRC-C. La isoforma gal-9D5/6 pudiera tener una función importante para evitar el desarrollo de la transformación maligna en la línea celular HeLa, debido a la ausencia en ésta. Además, este perfil de variantes junto con los datos *in silico* proporcionados por los algoritmos sugieren que el proceso de splicing de *LGALS9* es exclusivo de los exones 5, 6 y 10 (165). La regulación del proceso de splicing requiere de secuencias que distinguen las fronteras entre los exones e intrones (sitios de splicing 5' y 3'), secuencias “enhancer” o “silencer” que se localizan en intrones y exones que modulan el reconocimiento de los sitios de splicing, bien facilitando o impidiendo la unión de los componentes del spliceosoma y por último la expresión de factores de splicing dan lugar a eventos de splicing alternativo específicos (235). Los factores de splicing que controlan este proceso, así como las cascadas de señalización que dirigen este proceso necesitan todavía ser caracterizados para gal-9.

La identificación de todas las variantes que carecen del exón 10 fue sorprendente, debido a que no se han reportado todas las variantes que tienen truncado el DRC-C en una línea celular. A diferencia de los exones 5 y 6 éste exón codifica parte del DRC-C de gal-9. La eliminación del exón 10 resulta en un corrimiento del marco de lectura y un codón de paro prematuro en el exón 11 que da como resultado un DRC-C truncado. Un evento similar de splicing ha sido observado en gal-8, otra galectina de repetición en tándem (236) que todavía no se sabe cuál es la consecuencia final de este truncamiento. Tal truncamiento podría estar originando una gal-9 tipo prototipo, dejando de ser una galectina repetición en tándem, también queda por determinar si las variantes que tienen eliminado el exón 10 son capaces de dimerizarse.

Se ha documentado que las galectinas intracelulares podrían tener ligandos de unión y funciones independientes de su DRC. Por ejemplo, las galectinas interactúan con miembros de la familia Bcl-2 a través de una interacción independiente de su DRC, también participan en el procesamiento del ARN en el núcleo y en la regulación de la progresión del ciclo celular. Todas

estas funciones de galectinas son independientes de su unión a carbohidratos, más bien es a través de interacciones proteína-proteína (132). Por lo que, es también posible que las isoformas truncadas de gal-9 interactúen con otras proteínas intracelulares de una manera independiente de su capacidad de unión a carbohidratos, siendo una interacción proteína-proteína; pudiendo modificarse estas interacciones entre isoformas proteicas debido al tamaño de su péptido de unión, disminuyendo los sitios de unión a las proteínas intracelulares o pudieran tener una mayor actividad las isoformas que tengan el péptido de unión más largo. Se requiere de los dos DRC y el péptido de unión para la multimerización de las galectinas repetición en tándem, además la presencia de un péptido de unión más largo permite la libre rotación de los DRC promoviendo una mayor multimerización, mecanismo por el cual se logra una mayor potencia de señalización (210).

El hallazgo de que los niveles de expresión de las variantes gal-9LC y gal-9D5 en las líneas celulares tumorales son significativamente más bajos en comparación con la línea no tumoral nos lleva a pensar sobre su posible papel en el control de la progresión tumoral. Por primera vez se evaluaron los niveles de expresión de las variantes de ARNm en líneas celulares de CaCu o de algún otro tipo de cáncer. Existen reportes que relacionan en tejido de pacientes la disminución en los niveles de ARNm de *LGALS9* con los niveles de la proteína de gal-9 (226,233). La diferencia en el nivel de expresión de la variante gal-9D5 entre las líneas tumorales sugiere que podría ejercer un papel diferente, así como el hecho de no detectar la variante gal-9D5/6 en HeLa que es de origen de adenocarcinoma, podría hacernos pensar en una expresión relacionada al tipo celular, ya que las células HeLa son de origen glandular, (adenocarcinoma), como reporta Lahm y colaboradores, donde el patrón de expresión de dos variantes de gal-9 varía dependiendo del origen celular y de su subtipo (222). Además, se ha reportado que la expresión de gal-9 en células tumorales de CaCu podría verse influenciada por la presencia del VPH 16 y/o 18 en los tumores, ya que la baja o ausente expresión de gal-9 se relacionó con la presencia de VPH 16 y/o 18 en tejidos de pacientes (233). Todo ello nos hace pensar que los niveles de los transcritos esta relacionado al tipo celular y al VPH, modificándose la expresión de éstas; sin embargo, analizando la variante gal-9D5 no se encontró diferencias entre el origen celular, la presencia ó ausencia de VPH ó el tipo de VPH presente en las líneas

celulares con respecto al nivel de expresión de gal-9D5. La relevancia funcional de los cambios de expresión de las variantes de gal-9 permanece aún sin determinar.

El análisis por western blot nos permitió identificar la expresión de la proteína gal-9 y de sus isoformas proteicas intracelulares. La gal-9 es una proteína que se localiza tanto intracelularmente como extracelularmente y la secreción de gal-9 ha sido reportada en varios tipos celulares como linfocitos T (208) y fibroblastos (212). Aquí se reporta la expresión intracelular de 3 isoformas proteicas, gal-9LC, gal-9D5 y gal-9D10, sí bien el análisis es un ensayo semicuantitativo, se identificó una menor expresión en las células tumorales, siendo la isoforma proteica gal-9LC la que se expresa en niveles más altos.

Se ha sugerido que las isoformas proteicas con el DRC-C truncado no salen de la célula, por lo que se esperaba identificar más isoformas en el ensayo de western blot, por el reconocimiento del N- terminal de gal-9 por el anticuerpo; sin embargo, ya que no es un método tan sensible podrían estar presentes y no ser detectadas. Haciendo una relación con los niveles de expresión de los transcritos, donde se observaron variantes con menor expresión, nos hace pensar que la baja expresión de los transcritos pudiera ocasionar una baja expresión de las isoformas proteicas y por lo tanto, que no se detecten en el western blot.

Las galectinas carecen de un péptido señal y el preciso mecanismo por el que gal-9 es secretada no es claro, aunque parecen estar involucradas metaloproteinasas específicas de la matriz y la proteína cinasa C (208). Por lo tanto, aunque gal-9 se ha encontrado intracelularmente es muy limitado el conocimiento acerca de la función de gal-9 en este contexto. Hasta ahora, solo NF-IL6 ha sido identificado como una molécula de unión intracelular de gal-9. Aunque no es claro todavía sí la localización subcelular de gal-9 difiere entre las diferentes isoformas proteicas, se encontraron isoformas intracelulares que ya han sido reportadas extracelularmente (gal-9D5) en otros tipos celulares como células endoteliales (165), de igual manera las isoformas que tienen truncado el DRC-C terminal también se han reportado intracelularmente (gal-9D10) (221). La baja expresión de las isoformas proteicas se correlacionó con la disminución de la expresión de los ARNm de las variantes LC y D5. Aun no se sabe cómo se regula la expresión de gal-9, en células endoteliales se ha mostrado que gal-9 parece estar regulada por IFN- γ (214) y HDAC3 (215). Considerando que los niveles generales de gal-

9 parecen disminuir después de la transformación maligna en varios tipos de cáncer (183,184,222,226), gal-9 parece ejercer un papel de múltiples facetas en la biología tumoral similar a gal-1 y gal-3 (114). Una mayor expresión de gal-9 en células tumorales de pacientes se correlaciona con un mejor pronóstico en pacientes con CaCu (233). Aunque se ha reportado la relevancia de detectar las variantes de gal-9 en este estudio y en otros (218) sus funciones permanecen poco claras. La generación de anticuerpos que permitan detectar isoformas proteicas específicas de gal-9 permitirá explorar aún más la expresión de cada isoforma en líneas celulares y tejido de pacientes.

CONCLUSIONES

1. Las líneas celulares de CaCu presentan variantes de *LGALS9* debido al splicing alternativo del gen de gal-9 (*LGALS9*).
2. Se identificó la presencia de todas las variantes de ARNm en las líneas celulares de carcinoma escamoso de cérvix, una de ellas no había sido reportada en ningún otro tipo celular (gal-9D6/10).
3. Las variantes gal-9LC y gal-9D5 tienen un nivel de expresión menor en las células tumorales.
4. Se identificó la expresión intracelular de 3 isoformas proteicas de gal-9.

PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta tesis, las perspectivas de trabajos futuros se orientan hacia dos direcciones.

En una primera instancia estarían los trabajos destinados a determinar los niveles de expresión de las variantes de ARNm de *LGALS9* en tejido de cérvix maligno.

Realizar estudios sobre el papel individual de las isoformas proteicas de gal-9 en la adhesión, invasión y agregación celular. En primer lugar, a través de la sobreexpresión de las variantes de ARNm de *LGALS9* por medio de la transfección estable del ADNc que codifica

para las isoformas proteicas, se obtendrían clonas para sobreexpresar alguna variante de *LGALS9* específica y posteriormente evaluar su papel sobre la adhesión a la MEC, invasión y agregación celular. Verificando a través de silenciamientos si tales funciones se ven afectadas.

Posteriormente se determinaría experimentalmente la regulación de la expresión del gen *LGALS9* en células de CaCu, determinando sus factores de transcripción que regulan su expresión, por medio de ensayos de cambio de movilidad electroforética. Con lo cual se tendría una información importante para conocer la regulación del gen de gal-9, y con ello abrir nuevas líneas de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J.; Soerjomataram I.; Ervik M.; Dikshit R.; et al. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. [En línea] 2014. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
2. INEGI. [En línea] 2014. <http://www3.inegi.org.mx/>.
3. Walboomers, J.M.; Jacobs, M.V.; Manos, M.M.; Bosch, F.X.; Kummer, J.A.; Shah, K.V.; Snijders, P.J.; Peto, J.; Meijer, C.J.; Muñoz, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Patol.* 1999, 189, 12-19.
4. Muñoz, N.; Bosch, F.X.; de Sanjosé, S.; Herrero, R.; Castellsagué, X.; Shah, K.V.; Snijders, P.J.; Meijer, C.J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003, 348, 518-527.
5. Lee, S.L.; Tameru, A.M. A mathematical model of human papillomavirus (HPV) in the United States and its impact on cervical cancer. *J Cancer.* 2012, 3, 262-268.
6. Castellsagué, X.; Muñoz, N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003, 31, 20-28.
7. Berrington, D.G.A.; Green, J. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer.* 2007, 120, 885-891.
8. Flores, Y.N.; Bishai, D.M.; Shah, K.V.; Lazcano-Ponce, E.; Lörincz, A.; Hernández, M.; Ferris, D.; Salmerón, J. Factores de riesgo de cáncer cervical en mujeres VPH positivas en México. *Salud pública Mex.* 2008, 50, 49-58.
9. Espinosa, R.R.; Arreola, R.R.L.; Velázquez, H.N.; Rodríguez, R.E.R. Métodos de detección oportuna del cáncer cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología.* 2014, 13, 48-52.

10. Abba, M.C.; Mouron, S.A.; Gomez, M.A.; Dulout, F.N.; Golijow, C.D. Association of human papillomavirus viral load with HPV16 and high-grade intraepithelial lesion. *Int J Gynecol Cancer*. 2003, 13, 154-158.
11. Castle, P.E.; Wacholder, S.; Sherman, M.E.; Lorincz, A.T.; Glass, A.G.; Scott, D.R.; Schiffman, M. Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. *Cancer* 2002, 95, 2145-2151.
12. Aguilar-Lemarroy, A.; Vallejo-Ruiz, V.; Cortés-Gutiérrez, E.I.; Salgado-Bernabé, M.E.; Ramos-González, N.P.; Ortega-Cervantes, L.; Piña-Sánchez, P. Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: Type-specific prevalence and HPV coinfections. *J Med Virol*. 2015, 87, 871-884.
13. Wright, T.C.; Massad, L.S.; Dunton, C.J.; Spitzer, M.; Wilkinson, E.J.; Solomon, D. 2006 Consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol*. 2007, 197, 346-355.
14. Saslow, D.; Solomon, D.; Lawson, H.W.; Killackey, M.; Kulasingam, S.; Cain J, Garcia FA, Moriarty AT, Waxman AG, Wilbur DC, Wentzensen, N.; Downs, L.S. Jr.; Spitzer, M.; Moscicki, A.B.; Franco, E.L.; Stoler, M.H.; Schiffman, M.; Castle, P.E.; Myers, E.R. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin*. 2012, 62, 147-172.
15. Machado-Reyes, M.; Jiménez-Lima, R.; Blanco-Salazar, A.; Chavaro-Vicuña, N. Estadificación y evaluación inicial del cáncer cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2014, 13, 53-58.
16. Son, H.; Kositwattanarek, A. PET/CT Evaluation of cervical cancer: Spectrum of Disease. *RadioGraphics*. 2010, 30, 1251-1268.
17. Tavassoli, F.A.; Devilee, P. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumor of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press. 2006.

18. Pecorelli, S.; Zigliani, L.; Odicino, F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009, 105, 107-108.
19. Solomon, D.; Davey, D.; Kurman, R.; Moriarty, A.; O'Connor, D.; Prey, M.; Raab, S.; Sherman, M.; Wilbur, D.; Wright, T. Jr.; Young, N. Forum group members; Bethesda 2001 workshop, the 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002, 287, 2114-2119.
20. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011, 144, 646-674.
21. Hauselmann, I.; Borsig, L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Front Oncol.* 2014, 4, 3389.
22. Christiansen, M.N.; Chik, J.; Lee, L.; Anugraham, M.; Abrahams, J.L.; Packer, N.H. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics.* 2014, 14, 525-546.
23. Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* 1993, 3, 97-130.
24. Marchal, I.; Golfier, G.; Dugas, O.; Majed, M. Bioinformatics in glycobiology. *Biochimie.* 2003, 85, 75-81.
25. Potapenko, I.O.; Haakensen, V.D.; Luders, T.; Helland, A.; Bukholm, I.; Sørli, T.; Kristensen, V.N.; Lingjaerde, O.C.; Børresen-Dale, A.L. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol Oncol.* 2010, 4, 98-118.
26. Hart, G.W.; Slawson, C.; Ramirez-Correa, G.; Lagerlof, O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem.* 2011, 80, 825–858.
27. Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta.* 1999, 1473, 4-8.

28. Wells, L.; Hart, G.W. O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett.* 2003, 546, 154-158.
29. Cornil, I.; Kerbel, R.S.; Dennis, J.W. Tumor cell surface beta 1-4-linked galactose binds to lectin(s) on microvascular endothelial cells and contributes to organ colonization. *J Cell Biol.* 1990, 111, 773-781.
30. Iozzo, R.V.; Cohen, I. Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma. *Experientia.* 1993, 49, 447-455.
31. Dennis, J.W.; Granovsky, M.; Warren, C.E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gen Subj.* 1999, 1473, 21-34.
32. Hakomori, S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002, 99, 10231-10233.
33. Dall'Olio, F.; Malagolini, N.; Trinchera, M.; Chiricolo, M. Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. *Front Biosci.* 2012, 17, 670-699.
34. Kannagi, R. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj J.* 1997, 14, 577-584.
35. Kim, Y.J.; Varki, A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J.* 1997, 14, 569-576.
36. Fuster, M.M.; Esko, J.D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer.* 2005, 5, 526-542.
37. Hakomori, S.I. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res.* 1985, 45, 2405-2414.
38. Dabelsteen, E. Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. *J Pathol.* 1996, 179, 358-369.

39. Vasconcelos-dos-Santos, A.; Oliveira, I.A.; Lucena, M.C.; Mantuano, N.R.; Whelan, S.A.; Dias, W.B.; Todeschini, A.R. Biosynthetic machinery involved in aberrant glycosylation: promising targets for developing of drugs against cancer. *Front Oncol.* 2015, 5, 1-24.
40. Wang, P.H. Altered sialylation and sialyltransferase expression in gynecologic cancers. *Taiwanese J Obstet Gynecol.* 2004, 43, 53-63.
41. Schultz, M.J.; Swindall, A.F.; Bellis, S.L. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer Metastasis Rev.* 2012, 31, 501-518.
42. Varki, N.M.; Varki, A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest.* 2007, 87, 851-857.
43. Schauer, R. Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem Sci.* 1985, 10, 357-360.
44. Taniguchi, A.; Hioki, M.; Matsumoto, K. Transcriptional regulation of human Gal β 1, 3GalNAc/Gal β 1, 4GlcNAc α 2, 3-sialyltransferase (hST3Gal IV) gene in testis and ovary cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 301, 764-768.
45. Kitagawa, H.; Paulson, J.C. Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *J Biol Chem.* 1994, 269.
46. Wang, P.H. Altered glycosylation in cancer: sialic acids and sialyltransferases. *J Cancer Mol.* 2005, 1, 73-81.
47. Cornejo, E.; Raimann, B. Alteración del metabolismo de la galactosa. *Revista chilena de nutrición.* 2004, 31, 170-176.
48. Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. Protein glycosylation in the ER and Golgi complex. 2000.
49. Thomas, P. Cell surface sialic acid as a mediator of metastatic potential in colorectal cancer. *Cancer J.* 1996, 9, 32-36.

50. Halliday, J.A.; Franks, A.H.; Ramsdale, T.E.; Martin, R.; Palant, E. A rapid, semi-automated method for detection of Gal β 1-4GlcNAc α 2, 6-sialyltransferase (EC 2.4. 99.1) activity using the lectin Sambucus nigra agglutinin. *Glycobiology*. 2001, 11, 557-564.
51. Kim, Y.J.; Kim, K.S.; Kim, S.H.; Kim, C.H.; Ko, J.H.; Choe, I.S.; Lee, Y.C. Molecular cloning and expression of human Gal β 1, 3GalNAc α 2, 3-sialyltransferase (hST3Gal II). *Biochim Biophys Res Commun*. 1996, 228, 324-327.
52. Zhang, Y.; Zhang, X.Y.; Liu, F.; Qi, H.L.; Chen, H.L. The roles of terminal sugar residues of surface glycans in the metastatic potential of human hepatocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2002, 128, 617-620.
53. Yogeewaran, G.; Salk, P.L. Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines. *Science*. 1981, 212, 1514-1516.
54. Bresalier, R.S.; Niv, Y.; Byrd, J.C.; Duh, Q.Y.; Toribara, N.W.; Rockwell, R.W.; Kim, Y.S. Mucin production by human colonic carcinoma cells correlates with their metastatic potential in animal models of colon cancer metastasis. *J Clin Invest*. 1991, 87, 1037-1045.
55. Carraway, K.L.; Fregien, N.; Carraway, C.A. Tumor sialomucin complexes as tumor antigens and modulators of cellular interactions and proliferation. *J Cell Sci*. 1992, 103, 299-307.
56. Dennis, J.W.; Waller, C.A.; Schirmacher, V. Identification of asparagine-linked oligosaccharides involved in tumor cell adhesion to laminin and type IV collagen. *J Cell Biol*. 1984, 99, 1416-1423.
57. Dennis, J.W.; Laferte, S.; Yagel, S.; Breitman, M.L. Asparagine-linked oligosaccharides associated with metastatic cancer. *Cancer cells*. 1989, 1, 87-92.
58. Dennis, J.W.; Laferte, S.; Waghorne, C.; Breitman, M.L.; Kerbel, R.S. Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science*. 1987, 236, 582-585.
59. Inoue, M.; Ogawa, H.; Nakanishi, K.; Tanizawa, O.; Karino, K.; Endo, J. Clinical value of sialyl Tn antigen in patients with gynecologic. *Obstet Gynecol*. 1990, 75, 1032-1036.

60. Ogawa, H.; Inoue, M.; Tanizawa, O.; Miyamoto, M.; Sakurai, M. Altered expression of sialyl-Tn, Lewis antigens and carcinoembryonic antigen between primary and metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Histochemistry*. 1992, 97, 311-317.
61. Julien, S.; Adriaenssens, E.; Ottenberg, K.; Furlan, A.; Courtand, G.; Vercoutter-Edouart, A.S.; Le Bourhis, X. ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology*. 2006, 16, 54-64.
62. Seto, K.; Uchida, F.; Baba, O.; Yamatoji, M.; Karube, R.; Warabi, E.; Onizawa, K. Negative expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis. *SpringerPlus*. 2013, 2, 1-6.
63. Wang, P.H.; Li, Y.F.; Juang, C.M.; Lee, Y.R.; Chao, H.T.; Tsai, Y.C.; Yuan, C.C. Altered mRNA expression of sialyltransferase in squamous cell carcinomas of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2001, 83, 121-127.
64. Wang, P.H.; Li, Y.F.; Juang, C.M.; Lee, Y.R.; Chao, H.T.; Ng, H.T.; Yuan, C.C. Expression of sialyltransferase family members in cervix squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Gynecol Oncol*. 2002, 86, 45-52.
65. López-Morales, D.; Reyes-Leyva, J.; Santos-López, G.; Zenteno, E.; Vallejo-Ruiz, V. Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. *Diagn Pathol*. 2010, 5, 74.
66. Velázquez-Márquez, N.; Santos-López, G.; Jiménez-Aranda, L.; Reyes-Leyva, J.; Vallejo-Ruiz, V. Sialyl Lewis x expression in cervical scrapes of premalignant lesions. *J Bioscience*. 2012, 37, 999-1004.
67. Karacali, S.; Izzetoğlu, S.; Deveci, R. Glycosylation changes leading to the increase in size on the common core of N-glycans, required enzymes, and related cancer-associated proteins. *Turk J Biol*. 2014, 38, 754-771.

68. Barondes, S.H.; Castronovo, V.; Cooper, D.N.; Cummings, R.D.; Drickamer, K.; Feizi, T.; Gitt, M.A.; Hirabayashi, J.; Hughes, C.; Kasai, K. Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994, 76, 597-598.
69. Rapoport, E.M.; Kurmyshkina, O.V.; Bovin, N.V. Mammalian Galectins: Structure, Carbohydrate Specificity, and Functions. *Biochemistry (Moscow)*. 2008, 73, 393-405.
70. Thijssen, V.L.; Rabinovich, G.A.; Griffioen, A.W. Vascular galectins: Regulators of tumor progression and targets for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013, 24, 547-558.
71. Barondes, S.H., Cooper, D.N.W.; Gitt, M.A.; Leffler, H. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. 1994, 269, 20807-20810.
72. Yang, R.Y.; Rabinovich, G.A.; Liu, F.T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*. 2008, 10, e17.
73. Cho, M.; Cummings, R.D. Galectin-1: oligomeric structure and interactions with polylectosamine. *Trends Glycosci Glyc*. 1997, 9, 47-56.
74. Lobsanov, Y.D.; Gitt, M.A.; Leffler, H.; Barondes, S.H.; Rini, J.M. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J Biol Chem*. 1993, 268, 27034-27038.
75. Cho, M.; Cummings, R.D. Galectin-1, a β -Galactoside-binding Lectin in Chinese Hamster Ovary Cells I. Physical and chemical characterization. *J Biol Chem*. 1995, 270, 5198-5206.
76. Liu, F.T.; Yang, R.Y.; Hsu, D.K. Galectins in acute and chronic inflammation. *Ann NY Acad Sci*. 2012, 1253, 80-91.
77. Troncoso, M.F.; Elola, M.T.; Croci, D.O.; Rabinovich, G.A. Integrating structure and function of "tandem-repeat" galectins. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011, 4, 864-887.
78. Ahmad, N.; Gabius, H.J.; André, S.; Kaltner, H.; Sabesan, S.; Roy, R.; Liu, B.; Macaluso, F.; Brewer, C.F. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent

carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem.* 2004, 279, 10841-10847.

79. Birdsall, B.; Feeney, J.; Burdett, I.D.; Bawumia, S.; Barboni, E.A.; Hughes, R.C. NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains. *Biochem.* 2001, 40, 4859-4866.

80. Nieminen, J.; Kuno, A.; Hirabayashi, J.; Sato, S. Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 2007, 282, 1374-1383.

81. Chiariotti, L.; Salvatore, P.; Frunzio, R.; Bruni, C.B. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J.* 2002, 19, 441-449.

82. Rabinovich, G.A.; Rubinstein, N. Galectinas: una nueva familia de proteínas involucradas en la regulación de la respuesta inmune. Implicancias en procesos inmunopatológicos. *Medicina (Buenos Aires).* 2001, 61, 85-92.

83. Liao, D.I.; Kapadia, G.; Ahmed, H.; Vasta, G.R.; Herzberg, O. Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein. *Proc Natl Acad Sci.* 1994, 91, 1428-1432.

84. Stowell, S.R.; Cho, M.; Feasley, C.L.; Arthur, C.M.; Song, X.; Colucci, J.K.; Cummings, R.D. Ligand reduces galectin-1 sensitivity to oxidative inactivation by enhancing dimer formation. *J Biol Chem.* 2009, 284, 4989-4999.

85. Rabinovich, G.A. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ.* 1999, 6, 711-721.

86. Kasai, K.; Hirabayashi, J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J Biochem.* 1996, 119, 1-8.

87. Hughes, R.C. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *BBA-Gen subjects.* 1999, 1473, 172-185.

88. Cooper, D.N. Galectinomics: finding themes in complexity. *BBA-Gen subjects*. 2002, 1572, 209-231.
89. Seelenmeyer, C.; Wegehingel, S.; Tews, I.; Künzler, M.; Aebi, M.; Nickel, W. Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *J Cell Biol*. 2005, 171, 373-381.
90. Seelenmeyer, C.; Stegmayer, C.; Nickel, W. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 and galectin-1 does not require shedding of plasma membrane-derived vesicles. *FEBS letters*. 2008, 582, 1362-1368.
91. Mehul, B.; Hughes, R.C. Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci*. 1997, 110, 1169-1178.
92. Gong, H.C.; Honjo, Y.; Nangia-Makker, P.; Hogan, V.; Mazurak, N.; Bresalier, R.S.; Raz, A. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res*. 1999, 59, 6239-6245.
93. Sacchettini, J.C.; Baum, L.G. Brewer, C.F. Multivalent protein– carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. *Biochemistry*. 2001, 40, 3009-3015.
94. Brewer, C.F. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002, 1572, 255-262.
95. Bhattacharyya, L.; Haraldsson, M.; Brewer, C.F. Precipitation of galactose-specific lectins by complex-type oligosaccharides and glycopeptides: studies with lectins from *Ricinus communis* (Agglutinin I), *Erythrina indica*, *Erythrina arborescens*, *Abrus precatorius* (Agglutinin), and *Glycine max* (Soybean). *Biochem*. 1988, 27, 1034-1041.
96. Mandal, D.K.; Brewer, C.F. Differences in the binding affinities of dimeric concanavalin A (including acetyl and succinyl derivatives) and tetrameric concanavalin A with large oligomannose-type glycopeptides. *Biochem*. 1993, 32, 5116-5120.

97. Bhattacharyya, L.; Fant, J.; Lonn, H.; Brewer, C.F. Binding and precipitating activities of *Lotus tetragonolobus* isolectins with L-fucosyl oligosaccharides. Formation of unique homogeneous cross-linked lattices observed by electron microscopy. *Biochem.* 1990, 29, 7523-7530.
98. Mandal, D.K.; Brewer, C.F. Interactions of concanavalin A with glycoproteins: formation of homogeneous glycoprotein-lectin cross-linked complexes in mixed precipitation systems. *Biochem.* 1992, 31, 12602-12609.
99. Hirabayashi, J.; Hashidate, T.; Arata, Y.; Nishi, N.; Nakamura, T.; Hirashima, M.; Yagi, F. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1572, 232-254.
100. Hughes, R.C. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie.* 2001, 83, 667-676.
101. Fang, R.I.X.U.N.; Mantle, M.; Ceri, H. Characterization of quail intestinal mucin as a ligand for endogenous quail lectin. *Biochem J.* 1993, 293, 867-872.
102. Seetharaman, J.; Kanigsberg, A.; Slaaby, R.; Leffler, H.; Barondes, S.H.; Rini, J.M. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem.* 1998, 273, 13047-13052.
103. Brewer, C.F.; Miceli, M.C.; Baum, L.G. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 2002, 12, 616-623.
104. Partridge, E.A.; Le Roy, C.; Di Guglielmo, G.M.; Pawling, J.; Cheung, P.; Granovsky, M.; Dennis, J.W. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science.* 2004, 306, 120-124.
105. Rabinovich, G.A.; Toscano, M.A.; Jackson, S.S.; Vasta, G.R. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol.* 2007, 17, 513-520.
106. Daniels, M.A.; Hogquist, K.A.; Jameson, S.C. Sweet'n'sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat Immunol.* 2002, 3, 903-910.

107. Dam, T.K.; Gabius, H.J.; André, S.; Kaltner, H.; Lensch, M.; Brewer, C.F. Galectins bind to the multivalent glycoprotein asialofetuin with enhanced affinities and a gradient of decreasing binding constants. *Biochemistry*. 2005, 44, 12564-12571.
108. Ochieng, J.; Warfield, P.; Green-Jarvis, B.; Fenti, I. Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin. *J Cell Biochem*. 1999, 75, 505-514.
109. Adams, J.C. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001, 17, 25-51.
110. Janik, M.E.; Lityńska, A.; Vereecken, P. Cell migration—the role of integrin glycosylation. *BBA-Gen Subjects*. 2010, 1800, 545-55.
111. Kariya, Y.; Kato, R.; Itoh, S.; Fukuda, T.; Shibukawa, Y.; Sanzen, N.; Gu, J. N-Glycosylation of Laminin-332 Regulates Its Biological Functions a novel function of the bisecting GlcNAc. *J Biol Chem*. 2008, 283, 33036-33045.
112. Singh, P.; Carraher, C.; Schwarzbauer, J.E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Bi*. 2010, 26, 397-419.
113. Elola, M.T.; Wolfenstein-Todel, C.; Troncoso, M.F.; Vasta, G.R.; Rabinovich, G.A. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci*. 2007, 64, 1679-1700.
114. Liu, F.T.; Rabinovich, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005, 5, 29-41.
115. Liu, F.T.; Patterson, R.J.; Wang, J.L. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 1572, 263-273.
116. Danguy, A.; Camby, I.; Kiss, R. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 1572, 285-293.
117. Balan, V.; Nangia-Makker, P.; Raz, A. Galectins as cancer biomarkers. *Cancers (Basel)*. 2010, 2, 592-610.

118. Giordano, M.; Croci, D.O.; Rabinovich, G.A. Galectins in hematological malignancies. *Curr Opin Hematol.* 2013, 20, 327-335.
119. Liu, F.T.; Yang, R.Y.; Saegusa, J.; Chen, H.Y.; Hsu, D.K. Galectins in regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 2011, 705, 431-442.
120. Rabinovich, G.A.; Croci, D.O. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity.* 2012, 36, 322-335.
121. Thijssen, V.L.; Heusschen, R.; Caers, J.; Griffioen, A.W. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: a systematic review. *Biochim Biophys Acta.* 2015, 1855, 235-247.
122. Ideo, H.; Hoshi, I.; Yamashita, K.; Sakamoto, M. Phosphorylation and externalization of galectin-4 is controlled by Src family kinases. *Glycobiology.* 2013, 23, 1452-1462.
123. Van den Brûle, F.; Califice, S.; Castronovo, V. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J.* 2004, 19, 537-542.
124. Xu, X.C.; El-Naggar, A.K.; Lotan, R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol.* 1995, 147, 815-822.
125. Schwarz Jr, G.; Rimmeling, M.; Decaestecker, C.; Gielen, I.; Budel, V.; Burchert, M.; Kiss, R. Galectin fingerprinting in tumor diagnosis. Differential expression of galectin-3 and galectin-3 binding sites, but not galectin-1, in benign vs malignant uterine smooth muscle tumors. *Am J Clin Pathol.* 1999, 111, 623-631.
126. Choufani, G.; Nagy, N.; Saussez, S.; Marchant, H.; Bisschop, P.; Burchert, M.; Kiss, R. The levels of expression of galectin-1, galectin-3, and the Thomsen–Friedenreich antigen and their binding sites decrease as clinical aggressiveness increases in head and neck cancers. *Cancer.* 1999, 86, 2353-2363.

127. Lotan, R.; Ito, H.; Yasui, W.; Yokozaki, H.; Lotan, D.; Tahara, E. Expression of a 31-kDa lactoside-binding lectin in normal human gastric Mucosa and in primary and metastatic gastric carcinomas. *Int J Cancer*. 1994, 56, 474-480.
128. Hsu, D.K.; Dowling, C.A.; Jeng, K.C.G.; Chen, J.T.; Yang, R.Y.; Liu, F.T. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 1999, 81, 519-526.
129. Paz, A.; Haklai, R.; Elad-Sfadia, G.; Ballan, E.; Kloog, Y. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene*. 2001, 20, 7486-7493.
130. Elad-Sfadia, G.; Haklai, R.; Balan, E.; Kloog, Y. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J Biol Chem*. 2004, 279, 34922-34930.
131. Park, J.W.; Voss, P.G.; Grabski, S.; Wang, J.L.; Patterson, R.J. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res*. 2001, 29, 3595-3602.
132. Vladoiu, M.C.; Labrie, M.; St-Pierre, Y. Intracellular galectins in cancer cells: Potential new targets for therapy (Review). *Int J Oncol*. 2014, 44, 1001-1014.
133. Villeneuve, C.; Baricault, L.; Canelle, L.; Barboule, N.; Racca, C.; Monsarrat, B.; Magnaldo, T.; Larminat, F. Mitochondrial proteomic approach reveals galectin-7 as a novel BCL-2 binding protein in human cells. *Mol Biol Cell*. 2011, 22, 999-1013.
134. Yang, R.Y.; Hsu, D.K.; Liu, F.T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, 93, 6737-6742.
135. Akahani, S.; Nangia-Makker, P.; Inohara, H.; Kim, H.R.C.; Raz, A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res*. 1997, 57, 5272-5276.

136. Yu, F.; Finley, R.L.; Raz, A.; Kim, H.R.C. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem.* 2002, 277, 15819-15827.
137. Califice, S.; Castronovo, V.; Bracke, M.; van den Brûle, F. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene.* 2004, 23, 7527-7536.
138. Shimura, T.; Takenaka, Y.; Tsutsumi, S.; Hogan, V.; Kikuchi, A.; Raz, A. Galectin-3, a novel binding partner of β -catenin. *Cancer Res.* 2004, 64, 6363-6367.
139. Ose, R.; Oharaa, O.; Nagase, T. Galectin-1 and Galectin-3 mediate protocadherin-24-dependent membrane localization of β -catenin in colon cancer cell line HCT116. *Curr Chem Genomics.* 2012, 6, 18-26.
140. Kim, H.J.; Jeon, H.K.; Lee, J.K.; Sung, C.O.; Do, I.G.; Choi, C.H.; Kim, T.J.; Kim, B.G.; Bae, D.S.; Lee, J.W. Clinical significance of galectin-7 in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2013, 33, 1555-1561.
141. Kim, S.J.; Hwang, J.A.; Ro, J.Y.; Lee, Y.S.; Chun, K.H. Galectin-7 is epigenetically-regulated tumor suppressor in gastric cancer. *Oncotarget,* 2013, 4, 1461-1471.
142. Kopitz, J.; Andre, S.; Von Reitzenstein, C.; Versluis, K.; Kaltner, H.; Pieters, R.J.; Wasano, K.; Kuwabara, I.; Liu, F.T.; Cantz, M.; Heck, A.J.; Gabius, H.J. Homodimeric galectin-7 (p53-induced gene 1) is a negative growth regulator for human neuroblastoma cells. *Oncogene.* 2003, 22, 6277-6288.
143. Nagy, N.; Bronckart, Y.; Camby, I.; Legendre, H.; Lahm, H.; Kaltner, H.; Hadari, Y.; Van Ham, P.; Yeaton, P.; Pector, J.C.; Zick, Y.; Salmon, I.; Danguy, A.; Kiss, R.; Gabius, H.J. Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor. *Gut.* 2002, 50, 392-401.
144. Kobayashi, T.; Kuroda, J.; Ashihara, E.; Oomizu, S.; Terui, Y.; Taniyama, A.; Adachi, S.; Takagi, T.; Yamamoto, M.; Sasaki, N.; Horiike, S.; Hatake, K.; Yamauchi, A.;

Hirashima, M.; Taniwaki, M. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. *Leukemia*. 2010, 24, 843-850.

145. Yang, R.Y.; Hsu, D.K.; Yu, L.; Ni, J.; Liu, F.T. Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily. *J Biol Chem*. 2001, 276, 20252-20260.

146. Raz, A.; Lotan, R. Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. *Cancer Metast Rev*. 1987, 6, 433-452.

147. Lotan, R.; Belloni, P.N.; Tressler, R.J.; Lotan, D.; Xu, X.C.; Nicolson, G.L. Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. *Glycoconj J*. 1994, 11, 462-468.

148. Yeatman, T.J.; Bland, K.I.; Copeland, E.M.; Kimura, A.K. Tumor cell-surface galactose correlates with the degree of colorectal liver metastasis. *J Surg Res*. 1989, 46, 567-571.

149. Woo, H.J.; Shaw, L.M.; Messier, J.M.; Mercurio, A.M. The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *J Biol Chem*. 1990, 265, 7097-7099.

150. Uhlenbruck, G.; Beuth, J.; Oette, K.; Ko, H.L.; Pulverer, G. Prevention of experimental liver metastases by D-galactose. *Experientia*. 1987, 43, 437-438.

151. Oguchi, H.; Toyokuni, T.; Dean, B.; Ito, H.; Otsuji, E.; Jones, V.L.; Sadozai, K.K.; Hakomori, S. Effect of lactose derivatives on metastatic potential of B16 melanoma cells. *Cancer Commun*. 1990, 2, 311-316.

152. Schlepper-SchSfer, J.; Hiilsmann, D.; Kolb, H.; Kolb-Bachofen, V. A galactose-specific lectin also on endothelial cells of rat livers. *Lectins*. 1986, 5, 207-211.

153. Humphries, M.J.; Matsumoto, K.; White, S.L.; Olden, K. Oligosaccharide modification by swainsonine treatment inhibits pulmonary colonization by B16-F10 murine melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986, 83, 1752-1756.

154. Le Marer, N.; Hughes, R.C. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. *J Cell Physiol.* 1996, 168, 51-58.
155. Hittélet, A.; Legendre, H.; Nagy, N.; Bronckart, Y.; Pector, J.C.; Salmon, I.; Yeaton, P.; Gabius, H.J.; Kiss, R.; Camby, I. Upregulation of galectins-1 and-3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. *Int J Cancer.* 2003, 103, 370-379.
156. O'Driscoll, L.; Linehan, R.; Liang, Y.H.; Joyce, H.; Oglesby, I.; Clynes, M. Galectin-3 expression alters adhesion, motility and invasion in a lung cell line (DLKP), in vitro. *Anticancer Res.* 2001, 22, 3117-3125.
157. Folkman, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002, 29, 15-18.
158. Nangia-Makker, P.; Honjo, Y.; Sarvis, R.; Akahani, S.; Hogan, V.; Pienta, K.J.; Raz, A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000, 156, 899-909.
159. Ueda, S.; Kuwabara, I.; Liu, F.T. Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. *Cancer Res.* 2004, 64, 5672-5676.
160. Mourad-Zeidan, A.A.; Melnikova, V.O.; Wang, H.; Raz, A.; Bar-Eli, M. Expression profiling of Galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 2008, 173, 1839-1852.
161. Clause, N.; van den Brûle, F.; Waltregny, D.; Garnier, F.; Castronovo, V. Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. *Angiogenesis.* 1999, 3, 317-325.
162. Le Mercier, M.; Mathieu, V.; Haibe-Kains, B.; Bontempi, G.; Mijatovic, T.; Decaestecker, C.; Kiss, R.; Lefranc, F. Knocking down galectin 1 in human hs683 glioblastoma cells impairs both angiogenesis and endoplasmic reticulum stress responses. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008, 67, 456-469.
163. Ito, K.; Scott, S.A.; Cutler, S.; Dong, L.F.; Neuzil, J.; Blanchard, H.; Ralph, S.J. Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on

immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis*. 2011, 14, 293-307.

164. Spitzenberger, F.; Graessler, J.; Schroeder, H.E. Molecular and functional characterization of galectin 9 mRNA isoforms in porcine and human cells and tissues. *Biochimie*. 2001, 83, 851-862.

165. Heusschen, R.; Schulkens, I.A.; van Beijnum, J.; Griffioen, A.W.; Thijssen, V.L. Endothelial LGALS9 splice variant expression in endothelial cell biology and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1842, 284-292.

166. Daroqui, C.M.; Ilarregui, J.M.; Rubinstein, N.; Salatino, M.; Toscano, M.A.; Vazquez, P.; Bakin, A.; Puricelli, L.; Bal de Kier Joffé, E.; Rabinovich, G.A. Regulation of galectin-1 expression by transforming growth factor β 1 in metastatic mammary adenocarcinoma cells: implications for tumor-immune escape. *Cancer Immunol Immunother*. 2007, 56, 491-499.

167. He, J.; Baum, L.G. Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. *Lab Invest*. 2006, 86, 578-590.

168. Tang, D.; Yuan, Z.; Xue, X.; Lu, Z.; Zhang, Y.; Wang, H.; Chen, M.; An, Y.; Wei, J.; Zhu, Y.; Miao, Y.; Jiang, K. High expression of Galectin-1 in pancreatic stellate cells plays a role in the development and maintenance of an immunosuppressive microenvironment in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2012, 130, 2337-2348.

169. Radosavljevic, G.; Jovanovic, I.; Majstorovic, I.; Mitrovic, M.; Lisnic, V.J.; Arsenijevic, N.; Jonjic, S.; Lukic, M.L. Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis*. 2011, 28, 451-462.

170. Peng, W.; Wang, H.Y.; Miyahara, Y.; Peng, G.; Wang, R.F. Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer Res*. 2008, 68, 7228-7236.

171. Cedeno-Laurent, F.; Dimitroff, C.J. Galectins and their ligands: negative regulators of anti-tumor immunity. *Glycoconj J*. 2012, 29, 619-625.

172. Endo, K.; Kohnoe, S.; Tsujita, E.; Watanabe, A.; Nakashima, H.; Baba, H.; Maehara, Y. Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2005, 25, 3117-3121.

173. Schoeppner, H.L.; Raz, A.; Ho, S.B.; Bresalier, R.S. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. *Cancer.* 1995, 75, 2818-2826.

174. Camby, I.; Belot, N.; Rorive, S.; Lefranc, F.; Maurage, C.A.; Lahm, H.; Kaltner, H.; Hadari, Y.; Ruchoux, M.M.; Brotchi, J.; Zick, Y.; Salmon, I.; Gabius, H.J.; Kiss, R. Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathol.* 2001, 11, 12-26.

175. Kim, S.J.; Kim, D.C.; Kim, M.C.; Jung, G.J.; Kim, K.H.; Jang, J.S.; Kwon, H.C.; Kim, Y.M.; Jeong, J.S. Fascin expression is related to poor survival in gastric cancer. *Pathol Int.* 2012, 62, 777-784.

176. Okada, K.; Shimura, T.; Suehiro, T.; Mochiki, E.; Kuwano, H. Reduced galectin-3 expression is an indicator of unfavorable prognosis in gastric cancer. *Anticancer Res.* 2006, 26, 1369-1376.

177. Bektas, S.; Bahadir, B.; Ucan, B.H.; Ozdamar, S.O. CD24 and galectin-1 expressions in gastric adenocarcinoma and clinicopathologic significance. *Pathol Oncol Res.* 2010, 16, 569-577.

178. Türeci, Ö.; Schmitt, H.; Fadle, N.; Pfreundschuh, M.; Sahin, U. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J Biol Chem.* 1997, 272, 6416-6422.

179. Nagae, M.; Nishi, N.; Murata, T.; Usui, T.; Nakamura, T.; Wakatsuki, S.; Kato, R. Crystal structure of the galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain from *Mus musculus* reveals the basic mechanism of carbohydrate recognition. *J Biol Chem.* 2006, 281, 35884-35893.

180. Nagae, M.; Nishi, N.; Nakamura-Tsuruta, S.; Hirabayashi, J.; Wakatsuki, S.; Kato, R. Structural analysis of the human galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain reveals unexpected properties that differ from the mouse orthologue. *J Mol Biol.* 2008, 375, 119-135.
181. Yoshida, H.; Teraoka, M.; Nishi, N.; Nakakita, S.I.; Nakamura, T.; Hirashima, M.; Kamitori, S. X-ray structures of human galectin-9 C-terminal domain in complexes with a biantennary oligosaccharide and sialyllactose. *J Biol Chem.* 2010, 285, 36969-36976.
182. Wada, J.; Kanwar, Y.S. Identification and characterization of galectin-9, a novel β -galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem.* 1997, 272, 6078-6086.
183. Irie, A.; Yamauchi, A.; Kontani, K.; Kihara, M.; Liu, D.; Shirato, Y.; Seki, M.; Nishi, N.; Nakamura, T.; Yokomise, H.; Hirashima, M. Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005, 11, 2962-2968.
184. Kageshita, T.; Kashio, Y.; Yamauchi, A.; Seki, M.; Abedin, M.J.; Nishi, N.; Shoji, H.; Nakamura, T.; Ono, T.; Hirashima, M. Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *Int J Cancer.* 2002, 99, 809-816.
185. Kashio, Y.; Nakamura, K.; Abedin, M.J.; Seki, M.; Nishi, N.; Yoshida, N.; Nakamura, T.; Hirashima, M. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J Immunol.* 2003, 170, 3631-3636.
186. Ohtsubo, K.; Takamatsu, S.; Minowa, M.T.; Yoshida, A.; Takeuchi, M.; Marth, J.D. Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell.* 2005, 123, 1307-1321.
187. Zhu, C.; Anderson, A.C.; Schubart, A.; Xiong, H.; Imitola, J.; Khoury, S.J.; Zheng, X.X.; Strom, T.B.; Kuchroo, V.K. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol.* 2005, 6, 1245-1252.
188. Katoh, S.; Ishii, N.; Nobumoto, A.; Takeshita, K.; Dai, S.Y.; Shinonaga, R.; Niki, T.; Nishi, N.; Tominaga, A.; Yamauchi, A.; Hirashima, M. Galectin-9 inhibits CD44-

hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007, 176, 27-35.

189. Bi, S.; Earl, L.A.; Jacobs, L.; Baum, L.G. Structural features of Galectin-9 and Galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. *J Biol Chem.* 2008, 283, 12248–12258.

190. Mishra, R.; Grzybek, M.; Niki, T.; Hirashima, M.; Simons, K. Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin–Darby canine kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010, 107, 17633-17638.

191. Niki, T.; Tsutsui, S.; Hirose, S.; Aradono, S.; Sugimoto, Y.; Takeshita, K.; Nishi, N.; Hirashima, M. Galectin-9 is a high affinity IgE-binding lectin with anti-allergic effect by blocking IgE-antigen complex formation. *J Biol Chem.* 2009, 284, 32344-32352.

192. Matsuura, A.; Tsukada, J.; Mizobe, T.; Higashi, T.; Mouri, F.; Tanikawa, R.; Yamauchi, A.; Hirashima, M.; Tanaka, Y. Intracellular galectin-9 activates inflammatory cytokines in monocytes. *Genes Cells.* 2009, 14, 511-521.

193. Miyanishi, N.; Nishi, N.; Abe, H.; Kashio, Y.; Shinonaga, R.; Nakakita, S.I.; Sumiyoshi, W.; Yamauchi, A.; Nakamura, T.; Hirashima, M.; Hirabayashi, J. Carbohydrate-recognition domains of galectin-9 are involved in intermolecular interaction with galectin-9 itself and other members of the galectin family. *Glycobiology.* 2007, 17, 423-432.

194. Solís, D.; Maté, M.; Lohr, M.; Ribeiro, J.P.; López-Merino, L.; André, S.; Buzamet, E.; Cañada, F.J.; Kaltner, H.; Lensch, M.; Ruiz, F.M.; Haroske, G.; Wollina, U.; Kloor, M.; Kopitz, J.; Sáiz, J.; Menéndez, M.; Jiménez-Barbero, J.; Romero, A.; Gabius, H. N-domain of human adhesion/growth-regulatory galectin-9: preference for distinct conformers and non-sialylated N-glycans and detection of ligand-induced structural changes in crystal and solution. *Int J Biochem Cell B.* 2010, 42, 1019-1029.

195. Sato, M.; Nishi, N.; Shoji, H.; Seki, M.; Hashidate, T.; Hirabayashi, J.; Kasai Ki, K.; Hata, Y.; Suzuki, S.; Hirashima, M.; Nakamura, T. Functional analysis of the carbohydrate recognition domains and a linker peptide of galectin-9 as to eosinophil chemoattractant activity. *Glycobiology.* 2002, 12, 191-197.

196. Matsushita, N.; Nishi, N.; Seki, M.; Matsumoto, R.; Kuwabara, I.; Liu, F.T.; Hata, Y.; Nakamura, T.; Hirashima, M. Requirement of divalent galactoside-binding activity of ecalectin/galectin-9 for eosinophil chemoattraction. *J Biol Chem.* 2000, 275, 8355-8360.
197. Steelman, A.J.; Li, J. Astrocyte galectin-9 potentiates microglial TNF secretion. *J Neuroinflammation.* 2014, 11, 144-155.
198. Nishi, N.; Itoh, A.; Fujiyama, A.; Yoshida, N.; Araya, S.; Hirashima, M.; Shoji, H.; Nakamura, T. Development of highly stable galectins: truncation of the linker peptide confers protease-resistance on tandem-repeat type galectins. *Febs Lett.* 2005, 579, 2058-2064.
199. Wiersma, V.R.; Bruyn, M.; Helfrich, W.; Bremer, E. Therapeutic potential of Galectin-9 in human disease. *Med Res Rev.* 2013, 33, E102-E126.
200. Mengshol, J.A.; Golden-Mason, L.; Arikawa, T.; Smith, M.; Niki, T.; McWilliams, R.; Randall, J.A.; McMahan, R.; Zimmerman, M.A.; Rangachari, M.; Dobrinskikh, E.; Busson, P.; Polyak, S.J.; Hirashima, M.; Rosen, H.R. A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of T cell immunity in hepatitis C infection. *PLoS One.* 2010, 5, e9504.
201. Kadowaki, T.; Arikawa, T.; Shinonaga, R.; Oomizu, S.; Inagawa, H.; Soma, G.; Niki, T.; Hirashima, M. Galectin-9 signaling prolongs survival in murine lung-cancer by inducing macrophages to differentiate into plasmacytoid dendritic cell-like macrophages. *Clin Immunol.* 2012, 142, 296-307.
202. Dai, S.Y.; Nakagawa, R.; Itoh, A.; Murakami, H.; Kashio, Y.; Abe, H.; Katoh, S.; Kontani, K.; Kihara, M.; Zhang, S.L.; Hata, T.; Nakamura, T.; Yamauchi, A.; Hirashima, M. Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2005, 175, 2974-2981.
203. Seki, M.; Oomizu, S.; Sakata, K.M.; Sakata, A.; Arikawa, T.; Watanabe, K.; Ito, K.; Takeshita, K.; Niki, T.; Saita, N.; Nishi, N.; Yamauchi, A.; Katoh, S.; Matsukawa, A.; Kuchroo, V.; Hirashima, M. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin Immunol.* 2008, 127, 78-88.

204. Moritoki, M.; Kadowaki, T.; Niki, T.; Nakano, D.; Soma, G.; Mori, H.; Kobara, H.; Masaki, T.; Kohno, M.; Hirashima, M. Galectin-9 ameliorates clinical severity of MRL/lpr lupus-prone mice by inducing plasma cell apoptosis independently of Tim-3. *PLoS one*. 2013, 8, e60807.
205. Monney, L.; Sabatos, C.A.; Gaglia, J.L.; Ryu, A.; Waldner, H.; Chernova, T.; Manning, S.; Greenfield, E.A.; Coyle, A.J.; Sobel, R.A.; Freeman, G.J.; Kuchroo, V.K. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 2002, 415, 536-541.
206. Ungerer, C.; Quade-Lyssy, P.; Radeke, H.H.; Henschler, R.; Königs, C.; Köhl, U.; Seifried, E.; Schüttrumpf, J. Galectin-9 is a suppressor of T and B cells and predicts the immune modulatory potential of mesenchymal stromal cell preparations. *Stem Cells Dev*. 2013, 23, 755-766.
207. Anderson, A.C.; Anderson, D.E.; Bregoli, L.; Hastings, W.D.; Kassam, N.; Lei, C.; Chandwaskar, R.; Karman, J.; Su, E.W.; Hirashima, M.; Bruce, J.N.; Kane, L.P.; Kuchroo, V.K.; Hafler, D.A. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science*. 2007, 318, 1141-1143.
208. Chabot, S.; Kashio, Y.; Seki, M.; Shirato, Y.; Nakamura, K.; Nishi, N.; Nakamura, T.; Matsumoto, R.; Hirashima, M. Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells. *Glycobiology*. 2002, 12, 111-118.
209. Zhang, F.; Zheng, M.; Qu, Y.; Li, J.; Ji, J.; Feng, B.; Lu, A.; Li, J.; Wang, M.; Liu, B. Different roles of galectin-9 isoforms in modulating E-selectin expression and adhesion function in LoVo colon carcinoma cells. *Mol Biol Rep*. 2009, 36, 823-830.
210. Lesley, A.E.; Shuguang, B.; Linda, G.B. Galectin multimerization and lattice formation are regulated by linker region structure. *Glycobiology*. 2011, 21, 6-12.
211. Heusschen, R.; Griffioen, A.W.; Thijssen, V.L. Galectin-9 in tumor biology: A jack of multiple trades. *BBA-REV Cancer*. 2013, 1836, 177-185.

212. Asakura, H.; Kashio, Y.; Nakamura, K.; Seki, M.; Dai, S.; Shirato, Y.; Abedin, M.J.; Yoshida, N.; Nishi, N.; Imaizumi, T.; Saita, N.; Toyama, Y.; Takashima, H.; Nakamura, T.; Ohkawa, M.; Hirashima, M. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN- γ -induced galectin-9. *J Immunol.* 2002, 169, 5912-5918.

213. Park, W.S.; Jung, W.K.; Park, S.K.; Heo, K.W.; Kang, M.S.; Choi, Y.H.; Kim, G.Y.; Park, S.G.; Seo, S.K.; Yea, S.S.; Liu, K.H.; Shim, E.B.; Kim, D.J.; Her, M.; Choi, I.W. Expression of galectin-9 by IFN- γ stimulated human nasal polyp fibroblasts through MAPK, PI3K, and JAK/STAT signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011, 411, 259-264.

214. Imaizumi, T.; Kumagai, M.; Sasaki, N.; Kurotaki, H.; Mori, F.; Seki, M.; Nishi, N.; Fujimoto, K.; Tanji, K.; Shibata, T.; Tamo, W.; Matsumiya, T.; Yoshida, H.; Cui, X.F.; Takanashi, S.; Hanada, K.; Okumura, K.; Yagihashi, S.; Wakabayashi, K.; Nakamura, T.; Hirashima, M.; Satoh, K. Interferon- γ stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *J Leukocyte Biol.* 2002, 72, 486-491.

215. Alam, S.; Li, H.; Margariti, A.; Martin, D.; Zampetaki, A.; Habi, O.; Cockerill, G.; Hu, Y.; Xu, Q.; Zeng, L. Galectin-9 protein expression in endothelial cells is positively regulated by histone deacetylase 3. *J Biol Chem.* 2011, 286, 44211-44217.

216. Yoshida, H.; Imaizumi, T.; Kumagai, M.; Kimura, K.; Satoh, C.; Hanada, N.; Fujimoto, K.; Nishi, N.; Tanji, K.; Matsumiya, T.; Mori, F.; Cui, X.F.; Tamo, W.; Shibata, T.; Takanashi, S.; Okumura, K.; Nakamura, T.; Wakabayashi, K.; Hirashima, M.; Sato, Y.; Satoh, K. Interleukin-1 β stimulates galectin-9 expression in human astrocytes. *Neuroreport.* 2001, 12, 3755-3758.

217. Saita, N.; Goto, E.; Yamamoto, T.; Cho, I.; Tsumori, K.; Kohrogi, H.; Maruo, K.; Ono, T.; Takeya, M.; Kashio, Y.; Nakamura, K.; Hirashima, M. Association of galectin-9 with eosinophil apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002, 128, 42-50.

218. Heusschen, R.; Freitag, N.; Tirado-González, I.; Barrientos, G.; Moschansky, P.; Muñoz-Fernández, R.; Leno-Durán, E.; Klapp, B.F.; Thijssen, V.L.; Blois, S.M. Profiling Lgals9 splice variant expression at the fetal-maternal interface: implications in normal and pathological human pregnancy. *Biol. Reprod.* 2013, 88, 1-10.

219. Hirashima, M.; Kashio, Y.; Nishi, N.; Yamauchi, A.; Imaizumi, T.A.; Kageshita, T.; Saita, N.; Nakamura, T. Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconj J.* 2004, 19, 593–600.
220. Thijssen, V.L.; Hulsmans, S.; Griffioen, A.W. The galectin profile of the endothelium; altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol.* 2008, 172, 545-553.
221. Lipkowitz, M.S.; Leal-Pinto, E.; Cohen, B.E.; Abramson, R.G. Galectin 9 is the sugar-regulated urate transporter/channel UAT. *Glycoconj J.* 2004, 19, 491–498.
222. Lahm, H.; André, S.; Hoeflich, A.; Fischer, J.R.; Sordat, B.; Kaltner, H.; Wolf, E.; Gabius, H.J. Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001, 127, 375-386.
223. Fu, H.; Liu, Y.; Xu, L.; Liu, W.; Fu, Q.; Liu, H.; Zhang, W.; Xu, J. Galectin-9 predicts postoperative recurrence and survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma. *Tumor Biol.* 2015, 36, 5791-5799.
224. Keryer-Bibens, C.; Pioche-Durieu, C.; Villemant, C.; Souquère, S.; Nishi, N.; Hirashima, M.; Middeldorp, J.; Busson, P. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer.* 2006, 6, 283.
225. Yamauchi, A.; Kontani, K.; Kihara, M.; Nishi, N.; Yokomise, H.; Hirashima, M. Galectin-9, a Novel Prognostic Factor with Antimetastatic Potential in Breast Cancer. *Breast J.* 2006, 12, s196-s200.
226. Liang, M.; Ueno, M.; Oomizu, S.; Arikawa, T.; Shinonaga, R.; Zhang, S.; Yamauchi, A.; Hirashima, M. Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008, 134, 899-907.
227. Schulkens, I.A.; Heusschen, R.; van den Boogaart, V.; van Suylen, R.J.; Dingemans, A.M.C.; Griffioen, A.W.; Thijssen, V.L. Galectin expression profiling identifies

galectin-1 and galectin-9 δ 5 as prognostic factors in stage I/II non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2014, 9, e107988.

228. Jiang, J.; Jin, M.S.; Kong, F.; Cao, D.; Ma, H.X.; Jia, Z.; Wang, Y.P.; Suo, J.; Cao, X. Decreased galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. *PloS One*. 2013, 8, e81799-e81807.

229. Yang, J.; Zhu, L.; Cai, Y.; Suo, J.; Jin, J. Role of downregulation of galectin-9 in the tumorigenesis of gastric cancer. *Int J Oncol*. 2014, 45, 1313-1320.

230. Nobumoto, A.; Nagahara, K.; Oomizu, S.; Katoh, S.; Nishi, N.; Takeshita, K.; Niki, T.; Tominaga, A.; Yamauchi, A.; Hirashima, M. Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices. *Glycobiology*. 2008, 18, 735-744.

231. Zhang, Z.Y.; Dong, J.H.; Chen, Y.W.; Wang, X.Q.; Li, C.H.; Wang, J.; Wang, G.Q.; Li, H.L.; Wang, X.D. Galectin-9 acts as a prognostic factor with antimetastatic potential in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012, 13, 2503-2509.

232. Liu, Z.; Han, H.; He, X.; Li, S.; Wu, C.; Yu, C.; Wang, S. Expression of the galectin-9-Tim-3 pathway in glioma tissues is associated with the clinical manifestations of glioma. *Oncol Lett*. 2016, 11, 1829-1834.

233. Punt, S.; Thijssen, V.L.; Vrolijk, J.; de Kroon, C.D.; Gorter, A.; Jordanova, E.S. Galectin-1,-3-9 expression and clinical significance in squamous cervical cancer. *PloS One*. 2015, 10, e0129119.

234. Lipkowitz, M.S.; Leal-Pinto, E.; Rappoport, J.Z.; Najfeld, V.; Abramson, R.G. Functional reconstitution, membrane targeting, genomic structure, and chromosomal localization of a human urate transporter. *J Clin Invest*. 2001, 107, 1103-1115.

235. Hertel, K.J. Combinatorial control of exon recognition. *J Biol Chem*. 2008, 283, 1211-1215.

236. Bidon-Wagner, N.; Le Pennec, J.P. Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconj J*. 2004, 19, 557-563.