Análisis histoquímico de células tumorales (cáncer de colon) tumor primario y metastásico mediante lectinas biotiniladas

JAIRO GARCÍA GALLO*, JOHN FERNANDO GARCÍA VÉLEZ**, LUIS ANDRÉS VÉLEZ RESTREPO**, JOSÉ ANTONIO CADENA ZULUAGA***, SHIRLEY F. DELAIR E.***, CAROLINA PALACIO V***

RESUMEN

De las etapas del desarrollo del cáncer la más amenazante es la metástasis, por lo que se han hecho esfuerzos en su estudio y comprensión. Nosotros estudiamos el glicocáliz de tumores primarios de colon y sus metástasis a sacro, ganglios linfáticos e hígado.

Se utilizaron muestras tumorales de pacientes post quirúrgicos con cáncer de colon. Los cortes fueron fijados e incubados en PSA, DBA, UEA1, Jacalina y ECL. Como controles utilizamos azúcares inhibitorios específicos.

La mayor intensidad correspondió a Jacalina en tumores primarios y metástasis. PSA, ECL, y UEA1 reaccionaron con intensidad menor. No se registraron diferencias entre los tumores primarios y metastáticos, y tampoco entre las diferentes metástasis. No hubo reacción con el DBA.

Estos resultados no muestran diferencias en el Glicocáliz con la presencia de los carbohidratos estudiados entre el tumor primario y las metástasis. Es posible que se deban continuar los estudios con otras lectinas en la búsqueda de las moléculas que llevan a la selectividad por órgano de las metástasis tumorales.

* Magíster en Ciencias Básicas con Mención en Morfología. Docente Ciencias Básicas, Facultad de Medicina - CES. Grupo Ciencias Básicas. E-mail: jgarcia@ces.edu.co

** Residentes de Cirugía, Facultad de Medicina – CES.

*** Estudiante de Medicina, Facultad de Medicina – CES.

PALABRAS CLAVES

Carbohidratos
Glicocáliz
Célula neoplásica
Lectinas

SUMMARY

Of the different stages of cancer developing, the most threatening the metastasis, due to this, there has been great efforts in its studies and comprehension. We study the glycolalyz of primary colon tumors, and its metastasis to the sacrum, lymphatic ganglions and liver.

Tumor samples from post-surgical patients of cancer were used. The cuts were fixed and incubated in PSA, DBA,UEA1, Jacaline and ECL. As controls we used inhibitory specified sugar.

The biggest intensity corresponded to Jacaline in primary tumors and metastasis. PSA, ECL y UEA 1 reacted with less intensity. No difference was registered between primary tumors and the metastatic ones nor in the different metastasis. There was no reaction with the DBA.

These results show no differences in the glycocalyz with the carbohydrates studied between the primary tumor and the metastasis. It is possible that the studies should continued with other lectins in the search of the molecules that carry the organ of selectivity the tumoral metastasis.

KEY WORDS

Carbohydrates
Glycocalyz
Neoplasic cell
Lectins

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una patología muy frecuente y por lo tanto de amplio interés mundial. Se han estudiado los procesos de diseminación en busca de su posible bloqueo, igual a como se bloquean procesos inflamatorios. Si bien hay estudios al respecto, en muy pocos se han encontrado los receptores de la selectividad por órgano. En un estudio en tumores experimentales TA3MTXR inyectados en ratones a nivel muscular se encontraron diferencias en el glicocáliz en las metástasis a pulmón con respecto a otros focos como el corazón.[1] Ahora pretendemos buscar un modelo "natural" en humanos para investigar diferencias en el glicocáliz entre tumores primarios y metastáticos

Se ha encontrado que el cáncer es la tercera causa de muerte en Colombia después de las muertes violentas y las enfermedades cardiovasculares. La máxima incidencia del cáncer colo-rectal se presenta después de los 50 años, con una mayor prevalencia entre los 60 y 70 años. Menos del 20% de los casos aparecen antes. La proporción hombre mujer es 2:1, observándose una disminución de la prevalencia en mujeres en los últimos 40 años.[2]

La incidencia de cáncer colo-rectal es mayor en los países industrializados. Es la segunda causa de muerte por cáncer en Estados Unidos, Canadá, Reino Unido y en la mayoría de los países occidentales. [2,3]

El cáncer colo-rectal tiene una diseminación inicial local produciendo estrechez de la luz intestinal. Los tumores de submucosa y musculares de la mucosa metastizan a ganglios linfáticos 13% de los pacientes. Por vía hematógena, un 10 a 15% de los pacientes tienen evidencia de metástasis a distancia al tiempo del diagnóstico, siendo el hígado el sitio de metástasis más frecuente por su drenaje portal; sin embargo el recto es drenado por la vena hemorroidal superior que va a la porta y por la vena hemorroidal media e inferior que van a la cava y luego a la circulación pulmonar.[2, 4]

De las cuatro etapas definidas en el desarrollo del cáncer: Iniciación, promoción, invasión local y metástasis, esta última es la más amenazante para la vida del paciente y la menos explorada desde el punto de vista molecular. En esta etapa ocurre una serie de eventos que le confieren a la célula neoplásica el potencial metastático.[1, 2, 4]

Para adquirir un potencial metastático, sea una célula o un grupo de ellas, en primer lugar deben ser capaces de desprenderse del tumor primario, interactuar con la matriz extracelular y posteriormente, invadir el tejido local del huésped. A continuación, las células tumorales invaden la circulación, se ubican en el lecho vascular distante para colonizar el estroma y/o el parénquima del órgano blanco. En este lugar, las células neoplásicas proliferan y establecen una colonia secundaria.

Investigaciones experimentales, así como estudios clínicos y anatomo-patológicos, han demostrado que algunos cánceres presentan una selectividad para metastatizar determinados órganos como células melanociticas, cervix, tiroides, paratiroides, mediante interacciones similares a los procesos inflamatorios.[5]

Algunas proteínas que han sido denominadas receptores de adhesión, estarían involucradas en determinar el destino de las células inmunes circulantes. Evidencias preliminares sugieren que estos receptores serían capaces de controlar la diseminación metastasica de tumores sólidos. Adicionalmente las interacciones proteína oligosacarido determinan la especificidad inicial de la interacción de las células tumorales endoteliales.[4, 5]

En muchas ocasiones se ha resaltado la relación observada entre azúcares de superficie y células tumorales. En relación a los carbohidratos se conocen centenares de grupos, pero son sólo 7 los grupos que se encuentran comúnmente en mamíferos. Pequeñas moléculas de azúcares a menudo están unidas a proteínas de la membrana plasmática formando glicoproteinas o a lípidos formando glicolípidos. Es posible que estas cadenas de oligosacaridos de las glicoproteinas y de los glicolípidos, desempeñen un papel muy importante en los procesos de reconocimiento entre las células. Por todas estas razones, la identificación de residuos glicosídicos en cortes de tejidos, constituye una herramienta muy útil en histopatología, embriología y biología celular.

La experiencia en investigaciones pasadas ha mostrado que las lecitinas constituyen una excelente herramienta para caracterizar estos glicoconjugados. Biológicamente, las lectinas son glicoproteinas de origen no inmune que se unen específicamente a carbohidratos.[5]

El empleo de lectinas se realiza en diversos campos del saber, por ejemplo en la histogénesis de algunos tumores y en la biología básica de algunas células tumorales, que para fines prácticos es lo que se intentó realizar en este proyecto.[1, 5, 6 , 7]

Nosotros pretendemos buscar diferencias en el glicocáliz en el tumor primario y las metástasis del cáncer de colon humano como fuente de agresividad y selectividad por órganos que se explique además de la irrigación linfática y hematógena del tumor.

METODOLOGIA

Se utilizaron biopsias de tumores malignos del colon y de focos metastáticos encontrados en cirugía, de pacientes intervenidos en las diferentes instituciones de la ciudad de Medellín.

Las muestras obtenidas se fijaron durante 3 horas en solución de Carnoy. Luego los tejidos se procesaron según técnicas histológicas de rutina (deshidratación, inclusión en parafina, cortes de 5 um que fueron montados en portaobjetos con polilisina (Fijador de la muestra) por un período de una (1) hora. Algunos de estos cortes teñidos con hematoxilina-eosina-azul de Alcian con el fin de verificar si hay o no muestra del material en estudio.

Una vez hidratados, los cortes se colocaron en una cámara húmeda, se taparon con una gota de agua destilada y se encerraron en un círculo con Dakopen. Posteriormente se dejaron durante 10 minutos en perhidrol al 0.3% para inhibir la peroxidasa endógena y así evitar falsos positivos al usar mas tarde en el proceso una peroxidasa. A continuación las secciones se lavaron en agua destilada y enjuagadas en suero bovino (BSA) al 1% en tampón salino fosfato (PBS) 0.1 M, Ph 7.0.

Luego las secciones se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en lectinas conjugadas con biotina suspendidas en PBS 0.1 M, pH 7.2; mas cloruro de sodio 0.1 M y cloruro de calcio, magnesio y manganeso 0.1 M. Posteriormente se realizaron 3 lavados en PBS, pH 7.2 cada 5 minutos. La concentración óptima para cada lectina que ha permitido un máximo de tinción con un mínimo de background ha sido 5 microgramos por ml.

Luego se incubaron los cortes en una solución de PBS (2.4 ml) con peroxidasa biotilinada (12 microlitros) mas 12 microlitros de neutravidina durante 1 hora. La tinción de sitios señalando la ligadura de la lectina – HRP con los residuos glicosidicos se obtuvo incubando los cortes histológicos en una solución de ácido etilcarbamin (AEC) 15 minutos a temperatura ambiente . Luego se lavaron repetidamente en agua destilada y se cubrieron en medio acuoso.

Las lectinas que se utilizaron fueron: PSA (que reconoce á-D-manosa > á-D-Glucosa), JACALINA (gal(â1-3)-3galNAc), DAB (á-D-GalNAc), UEA1 (á-L-Fucosa), ECL (Gal â1-4GlcNAc). Para confirmar la especificidad para el azúcar respectivo por cada lectina, secciones histológicas adyacentes se incubaron con una mezcla de lectina-biotina conjugada con el azúcar inhibitorio apropiado 0.1 M (la mezcla lectina-HRP + azúcar se preparó a temperatura ambiente 2 horas antes de usar). Los azucares que utilizamos fueron los siguientes: D-gal para inhibir DBA y D-galactosa (D-gal) para inhibir jacal y ECL igualmente. Fucosa para inhibir UEA1 y manosa y glucosa para inhibir PSA. Bajo estas condiciones la disminución o inhibición de la tinción se consideró evidencia de unión a la molécula de carbohidrato específico.

El material obtenido se analizó con microscopia de luz a diferentes aumentos y el grado de tinción se evaluó de acuerdo a una escala subjetiva desde -, ninguna reacción; +, trazas; + +, intermedia; + + +, intenso. Entre mas intenso, mayor la concentración de lectina en la membrana.

RESULTADOS

Para realizar el análisis histológico pudimos recolectar 15 muestras de pacientes con tumor primario de colon. De estos 15 pacientes, seis presentaban metástasis a ganglios linfáticos, 5 metástasis a hígado y 6 metástasis óseas (Sacras). (Ver tablas 1, 2, 3 y 4).

Tabla 1
Descripción de los resultados del tumor primario

PACIENTE	PSA	JACAL	UEA	ECL
1	+ +	+ + +	+	+ +
2	+ +	+ +	+	+ +
3	+ +	+ + +	+	+ +
4	+ +	+ + +	+	+ +
5	+	+ +	+	+ +
6	+ +	+ + +	+	+ +
7	+ +	+ + +	+	+ +
8	+ +	+ + +	+	+ +
9	+	+ + +	+	+ +
10	+ +	+ + +	+	+ +
11	+	+ + +	+	+ +
12	+ +	+ +	+	+ +
13	+ +	+ + +	+	+ +
14	+	+ +	+	+ +
15	+ +	+ +	+	+ +

Tabla 2
Descripción de los resultados de las metástasis hepáticas

METAST HIGADO	PSA	JACAL	UEA	ECL
PTE 1	+ +	+ + +	+	+ +
PTE 2	+ +	+ +	+	+ +
PTE 3	+ +	+ + +	+	+ +
PTE 4	+ +	+ + +	+	+ +
PTE 12	+ +	+ + +	+	+ +

Tabla 3
Descripción de los resultados de las metástasis a Ganglios Linfáticos

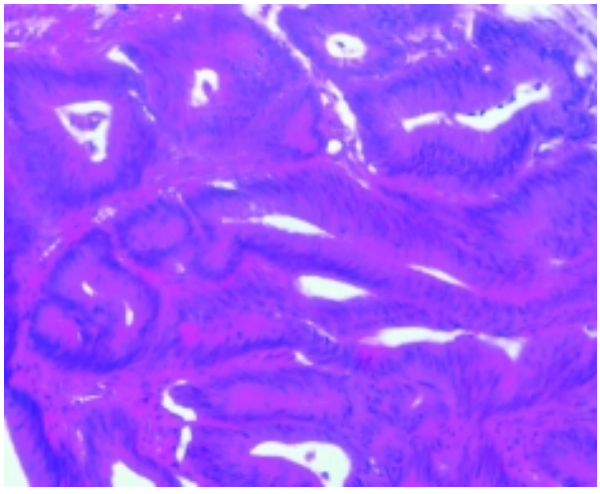
METAST GANGLIO	*PSA*	*JACAL*	*UEA*	*ECL*
PTE 1	+ +	+ + +	+	+ +
PTE 5	+	+ +	+	+ +
PTE 6	+ +	+ + +	+	+ +
PTE 7	+ +	+ + +	+	+ +
PTE 12	+ +	+ + +	+	+ +
PTE 14	+	+ +	+	+ +

Tabla 4
Descripción de los resultados de las metástasis a Sacro

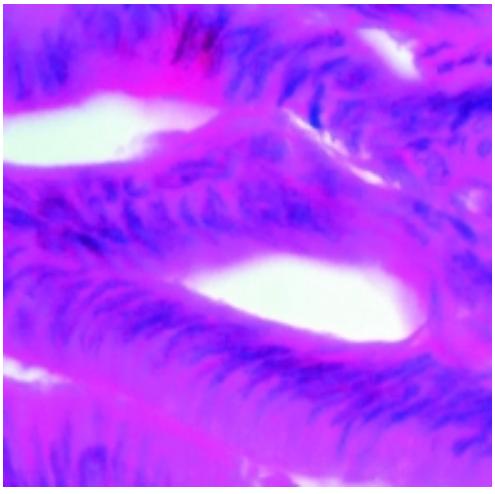
METAST SACRO	PSA	JACAL	UEA	ECL
PTE 2	+ +	+ +	+	+ +
PTE 3	+ +	+ + +	+	+ +
PTE 4	+ +	+ + +	+	+ +
PTE 8	+ +	+ + +	+	+ +
PTE 9	+	+ + +	+	+ +
PTE 12	+ +	+ +	+	+ +

De acuerdo a la lectura de las placas del tumor primario y las metástasis con las respectivas coloraciones se encontraron las siguientes descripciones microscópicas de los especimenes, las cuales pueden ser vistas en las imágenes que se tienen de estas (Ver gráficas 1, 2, 3 y 4).

Gráfica 1
Tumor primario cáncer de colon
10x

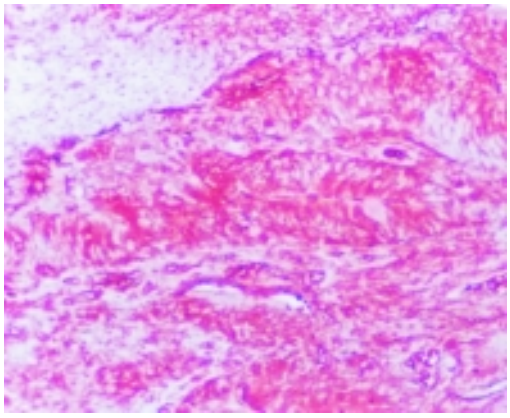


Gráfica 2
Tumor primario cáncer de colon
40x

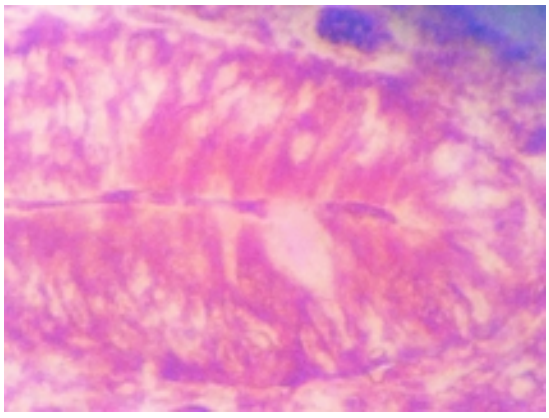


Tumor primario Cáncer de colon: glándulas irregulares que muestran reacción desmoplasica, con estructuras epiteliales malignas, células pleomorfas con numerosas mitosis, con núcleos grandes y células monstruosas, compatible con tumor maligno de tipo adenocarcinoma.

Gráfica 3
Tumor primario reaccionado con jabalina (+ + +)
10x



Gráfica 4
Tumor primario reaccionado con jabalina (+ + +)
40x



Tumor primario reaccionando con jabalina (+ + +)

DISCUSIÓN

A pesar de que en este estudio sólo evaluamos 5 lectinas de las muchas que se encuentran disponibles en el medio, podemos sacar conclusiones importantes e igualmente se pueden crear inquietudes que den pie a resolver con estudios complementarios las especulaciones que se nos crearon al conocer los resultados. Todo esto finalmente pretende abrir puertas en el amplio estudio de los procesos de diseminación en busca de un posible bloqueo para la diseminación o metástasis de enfermedades como el cáncer.

Evaluando la literatura mundial nos encontramos artículos donde se ha mostrado que las células del cáncer de colon de mayor potencial de producir metástasis expresan en su membrana un ligando conocido como el sialyl lewis x, diferente a las células de mas bajo potencial metastático que no lo expresan, por decirlo de otra forma se evidencia que los pacientes con cáncer de colon que expresan el sialyl lewis tienen un peor pronostico sobre las que no lo hacen.

Nuestro trabajo muestra una reacción positiva (+ +) frente a la lectina ECL tanto en el tumor primario como en las diferentes metástasis, lo cual demuestra la presencia de Galâ1-4GlcNAc, disacárido que hace parte del ologosacárido sialil Lewis x; este oligosacárido como ya se mencionó, se ha asociado a alta malignidad en muchos tumores entre ellos los del colon. Esta malignidad se debe a que permite una unión mayor de la célula tumoral al endotelio de los órganos a metastatizar y esta unión es a través de las selectinas "P" y la" E".[8, 9, 10] Nosotros proponemos hacer la reacción histoquímica con esta lectina en tumores de colon más localizados, como son los tumores in situ y evaluar la diferencia entre los tumores avanzados y los localizados en cuanto a la presencia o no de esta lectina.

Es importante mencionar que en nuestro estudio, la lectina que mayor expresión obtuvo a nivel de la membrana plasmática fue la Jacalina y comparándola con las demás lectinas, encontramos una gran relación de esta con la lectina PNA. Según estudios publicados en la literatura, se ha demostrado que la PNA se une ávidamente a oligosacaridos que contienen la secuencia terminal gal(â1-3)-3galNAc, residuo que representa el 60% de los azucares O-unidos a epiglicanina. Este disacárido representa el grupo inmuno-determinante del anfígeno Thomsen-Friedenreich (T), antígeno presente en la membrana plasmática en un gran numero de adenocarcinomas humanos y animales de alta malignidad, un ejemplo de ésto lo presenta la línea tumoral experimental TA3 que hace metástasis a pulmón y que contiene alta proporción de este disacárido.[11] En nuestro estudio se encontró una reacción alta al usar la jacalina tanto en el tumor primario como en

las metástasis, donde se obtuvo una reacción similar, posiblemente estas células presentan también una alta expresión del disacárido gal(â1-3)-3galNAc y posiblemente unido al antígeno relacionado con alta malignidad en otros trabajos.[11] El hecho que la reacción de las células tumorales en nuestro estudio se mantuvo en los tumores primarios y las diferentes metástasis nos permite suponer que la expresión de este disacárido se mantiene.

Nuestro trabajo presentó una reacción positiva (+ +) frente a la PSA, lo cual demuestra la presencia de el monosacárido á-D-man (aunque también une con menor afinidad a >á-D-gluc). Se ha encontrado un receptor de manosa en las células endoteliales de los sinusoides hepáticos, en los macrófagos y en el endotelio placentario.Esto les permite a estas estructuras captar patógenos que contengan manosa en su pared como muchas bacterias, igualmente sirve para captar proteínas de la circulación y hacer una labor de metabolismo y de limpieza. Se ha propuesto que este receptor serviría como puerta de entrada para que células tumorales hagan metástasis a los órganos que contengan este receptor, como lo es el hígado.[8, 12 , 13]

En este estudio hay que aclarar que de las 5 lectinas anteriormente mencionadas tuvimos dificultades técnicas con DBA por daño del reactivo, imposibilitando su interpretación frente a el tumor primario y las diferentes metástasis.

Observaciones clínicas de pacientes con cáncer y estudios tumorales han llegado a la conclusión que ciertos tumores producen metástasis a órganos específicos independiente de la anatomía vascular, el flujo sanguíneo, el número de células tumorales liberadas, ésto se da por la afinidad celular específica hacia algunos órganos y esta afinidad solo depende de las células tumorales y el micro ambiente específico del tejido huésped (melanoma metástasis)[5]. Es por ésto que creemos que, las lectinas se seguirán utilizando como herramienta importante de diagnóstico en el futuro cercano, por su alta sensibilidad y selectividad por residuos glicósidicos y tienen una gran habilidad para revelar determinantes patológicos que no se demuestran fácilmente por otros medios.

CONCLUSIONES

Por los resultados anteriores podemos concluir que al menos los carbohidratos afines con las lectinas que utilizamos en nuestro estudio no cambiaron en ninguna de las muestras de tumor colónico primario ni metastático. Es ahí donde vemos que todavía se requiere de múltiples estudios donde se evalúen los demás carbohidratos junto con otras lectinas y las demás moléculas existentes en la membrana celular de los tumores primarios y metastáticos para sacar mas conclusiones al respecto y encontrar un posible bloqueo de la diseminación especifica de los tumores o metástasis que es adonde finalmente pretendemos llegar con este modelo de estudios.

BIBLIOGRAFÍA

1. García J, Guerrero A. Análisis citoquímico de células neoplásicas mediante lectinas conjugadas con peroxidasa de rábano. Rev. Chil. Anat 1995; 13(2): 177–182.

2. Devita V. Ca of the colon and rectum. In: Devita V, Hellman S, Rosenberg S. Cancer principles and practice of oncology. 6 ed. USA: Lippincott William and Wilkins; 2001. p. 1216–1312.

3. Steele G, Meyer R. Adenocarcinoma of the colon and rectum. In: Zuidema GD, Yeo CJ, Pemberton JH. Shackekfords Surgery of the Alimentary Tract. 4 ed. USA: W.B. Saunders Company; 2001. p. 124-140.

4. Hwang RF, Baril N, McGarvey M, Chiang MH, Formenti SC, Skinner K. Principles of molecular biology for cancer surgeons. In: Silberman H, Silberman A. Surgical Oncology: Multidisciplinary approach to Difficult Problems. 1 ed. Great Britain: Oxfor University Press; 2002. p. 1-38.

5. Damjanov I. Biology of disease: Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab Invest 1987; 57(1): 5–20.

6. Sharon N, Lis H. Lectins as cell recognition molecules. Science 1989; 246(4927): 277-234.

7. Jomieno E. Empleo de lectinas en histopatologia: fundamentos y aplicaciones. Patología animal 1993; 7(1).

8. Fukuda MN, Ohyama C, Lowitz K, Matsuo O, Pasqualini R, Ruoslahti E, Fukuda M. A peptide mimic of E-selectin ligand inhibits sialyl Lewis X-dependent lung colonization of tumor cells. Cancer Res 2000; 60(2): 450-456.

9. Sawada R, Tsuboi S, Fukuda M. Differential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. J Biol Chem 1994; 269(2): 1425-1431.

10. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(16): 9325-9330.

11. Shysh A, Eu SM, Noujaim AA, Suresh MR, Longenecker BM. Radioimmunodetection of murine mammary adenocarcinoma (TA3/Ha) lung and liver metastases with radioiodinated PNA. Int J Cancer 1985; 35(1): 113-119.

12. Taylor ME, Conary JT, Lennartz MR, Stahl PD, Drickamer K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. J Biol Chem 1990; 265(21): 12156-12162.

13. Taylor ME, Drickamer K. Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. J Biol Chem 1993; 268(1): 399-404.