



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

Unidad de Zacatenco

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

**“Determinación de los niveles de expresión de las
Fucosiltransferasas en tejido tumoral de pacientes con CEO y
en la línea celular SKOV-3 expuestas a líquido ascítico”**

TESIS QUE PRESENTA

Q.B.P. Nayely Paulina Alvear Hernández

Para obtener el Grado de

Maestra en ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular

Tutora

Dra. Patricia Talamás Rohana

Co-Tutora

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdenares

Ciudad de México

Agosto 2016

AGRADECIMIENTOS

CONACIT.

Por en financiamiento proporcionado durante el periodo de la maestría.

CINVESTAV

Por proporcionarnos una formación académica de excelencia y brindarnos nuevas oportunidades de superación.

Dra. Patricia Talmas Rohana.

Por confiar en mí y permitirme realizar mi proyecto de maestría dentro de su laboratorio de investigación, por enseñarme la forma correcta de trabajar y sobre todo por enseñarme que el éxito se logra con voluntad y dedicación.

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres.

Gracias por guiarme por el camino correcto, sus enseñanzas y consejos siempre las voy a tener presentes y nunca olvidare.

M. en C. Juan Carlos Osorio Trujillo.

Mi gratitud y cariño por su infinita paciencia e interés en mi aprendizaje académico, gracia por su amistad incondicional y por mostrarme que las grandes personas pueden ser grandes amigos.

Dra. Verónica Ivonne Hernández Ramírez.

Admiro profundamente el compromiso que tiene con sus estudiantes, por no descansar hasta ver que han alcanzado su meta, gracias por su labor tan valiosa que lleva adelante día a día sin desmayar, pido a Dios que siempre le de fuerzas y sabiduría en todo lo que haga.

DEDICATORIAS

A DIOS... Por permitirme llegar hasta este punto de mi vida y agradecerle por todas la cosa buenas que me brinda día a día.

A MIS PADRES... Por todos los sacrificios que siempre estuvieron dispuestos hacer por mí, por fomentarme valores que ahora son el cimiento de mi persona. Porque a través de su ejemplo y sabiduría me enseñaron a vivirles infinitamente agradecida y espero dios nos conserve mucho tiempo unidos. Gracia papitos los amo.

A MIS HERMANOS... Por su apoyo incondicional y que pese a la distancia siempre nos hemos mantenidos unidos, por enseñarme que sin ustedes ningún logro académico tendría sentido los amo.

A MI NOVIO... Sé que hemos vivido muchas cosas juntos, las cuales, no todas han sido buenas, pero esa situaciones son la que no han mantenido más unidos, gracias por tu paciencia y tu apoyo te amo.

A MIS AMIGOS... Por compartir conmigo tantas locuras y apoyarnos mutuamente sin egoísmos ni hipocresías, los quiero mucho y espero que siempre tengan mucho éxito en el ámbito donde laboren.

COMPAÑEROS DEL LAB 9... Por sus consejos, su apoyo y su disponibilidad en todo momento, Gracia.

I. ABREVIATURAS

BRCA 1	Gen asociado al Cáncer de mama 1
BRCA 2	Gen asociado al Cáncer de mama 2
BSA	Albúmina sérica bovina
CA-125	Antígeno Cancerígeno 125
CaOv	Cáncer de ovario
CEO	Cáncer epitelial de ovario
Dil	Dilución
Fut	Fucosiltransferasa
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
h	Hora
HCC	Hepatocarcinoma celular
HCl	Ácido clorhídrico
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
kDa	Kilodaltones
LA	Líquido ascítico

mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaF	Fluoruro de Sodio
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SKOV-3	Línea celular de carcinoma ovárico
TBS-T	Amortiguador Tris-Salino con Tween 20
µg	Microgramos
µl	Microlitros

II. ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	ABREVIATURAS	I
II.	ÍNDICE DE CONTENIDO	III
III.	ÍNDICE DE FIGURAS	V
IV.	ÍNDICE DE TABLAS	VI
V.	RESUMEN	VII
VI.	ABSTRACT	VIII
VII.	INTRODUCCIÓN	1
	1. Cáncer de ovario	1
	1.1 Clasificación de acuerdo a FIGO	1
	2. Factores de riesgo	2
	3. Diagnóstico	2
	4. Glicosilación y cáncer	3
	5. Fucosilación	5
	5.1 Clasificación de las Fucosiltransferasas	5
	5.2 Funciones biológicas	7
	5.3 Fucosiltransferasas y su relación con el cáncer	8
	6. Líquido ascítico	10
	6.1 Clasificación del líquido ascítico.	10
	6.2 Formación y microambiente.	10
VIII.	JUSTIFICACIÓN	12
IX.	HIPÓTESIS	13
X.	OBJETIVOS	14
XI.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	15

XII. METODOLOGÍA	17
XIII. RESULTADOS	24
XIV. TABLAS DE RESULTADOS	56
XV. DISCUSIÓN	58
XVI. CONCLUSIÓN	63
XVII. PERSPECTIVAS	64
XVIII. REFERENCIAS	65

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama representativo de la adición de fucosa catalizada por las Fucosiltransferasas.

Figura 2. Morfología de las células SKOV-3 incubadas durante un curso temporal en presencia del LA 151910.

Figura 3. Análisis de RT-PCR de las Fucosiltransferasas 1-11 en la línea celular SKOV-3.

Figura 4. Inmunodetección por Western Blot de Fut 2, 4 y 8 en células SKOV-3.

Figura 5. Análisis de microscopía confocal de la fucosilación total en células SKOV-3 estimuladas con LA.

Figura 6. Localización subcelular de las Fucosiltransferasas 2, 4 y 8 en células SKOV-3.

Figura 7. Análisis comparativo del efecto de distintos LA sobre la expresión de Fut 2, 4 y 8 en células SKOV-3.

Figura 8. Niveles de expresión de las Fut 2, 4 y 8 en células SKOV-3 expuestas a diferentes condiciones de estrés.

Figura 9. Análisis de la expresión diferencial de Fut 2, 4 y 8 en cortes seriados de tejido tumoral de pacientes con CEO.

IV. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligos diseñados para los diferentes genes de las Fucosiltransferasas 1-11 y de GAPDH.

Tabla 2. Expresión de las Fucosiltransferasas en cortes de tejido tumoral de pacientes con cáncer epitelial de ovario.

V. RESUMEN

El cáncer epitelial de ovario (CEO) es la neoplasia maligna del sistema reproductor femenino más mortal a nivel mundial, ya que las pacientes no son diagnosticadas en estadios tempranos debido a la falta de pruebas específicas. En etapas avanzadas de la enfermedad se desarrolla la producción de líquido ascítico (LA) en la cavidad peritoneal, este líquido contiene componentes como factores de crecimiento y células tumorales que podrían estar alterando el microambiente como la neoexpresión o activación de diversas enzimas. Se ha reportado que existen alteraciones en las modificaciones postraduccionales tales como la fucosilación, que se asocia con la progresión tumoral en los diferentes histotipos que componen al CEO. El presente trabajo se enfocó en determinar los niveles de expresión de las Fucosiltransferasas (Fut), ya que son las enzimas responsables de adicionar los residuos de fucosa a los oligosacáridos, en tejido tumoral de pacientes con CEO y en la línea celular SKOV-3 tratada con líquido ascítico. La estrategia experimental consistió en el análisis de 20 cortes tumorales de CEO utilizando microscopía confocal. Para determinar los niveles de expresión de cultivos *in vitro* de células SKOV-3 expuestas al LA y en medio con suero fetal bovino, se realizaron ensayos de Western Blot para Fut 2, 4 y 8 y de RT-PCR para Fut 1-11. El análisis realizado de la expresión de Fut 2, 4 y 8 de los cortes tumorales por microscopía confocal, detectó una distribución difusa y heterogénea en prácticamente todos los histotipos del CEO. Se detectó una expresión diferencial de Fut 4 y 8 comparando tejido sano con tejido tumoral. Los resultados obtenidos tanto por PCR como por WB indican que existen diferencias en los patrones proteicos y de expresión del mRNA de células control con respecto a las células expuestas al LA, así como cambios en la morfología celular. Estas diferencias se modifican en función al tiempo de exposición al LA. Con estos resultados se sugiere que el líquido ascítico proveniente de pacientes con CEO genera un microambiente capaz de inducir cambios morfológicos y bioquímicos tales como la expresión diferencial de las Fucosiltransferasas en las células SKOV-3.

VI. ABSTRACT

Epithelial ovarian cancer (CEO) is the deadliest neoplasm of the female reproductive system worldwide, because patients are not diagnosed in the early stages due to lack of specific tests. In advanced stages of the disease there is the production of ascitic fluid (AF) in the peritoneal cavity; this ascitic fluid contains components such as growth factors and tumor cells that could be altering the microenvironment by promoting the neoexpression or activation of various enzymes. It has been reported that during cancer development there are alterations in post-translational modifications of proteins, such as fucosylation, which is associated with tumor progression of the different histotypes comprising the CEO. This work focused on determining the expression levels of Fucosyltransferases (Fut), as they are the enzymes responsible for adding the fucose residues to oligosaccharides, in tumor tissues of patients with CEO and in the SKOV-3 cell line treated with AF. The strategy consisted in the analysis of 20 tumor sections from CEO diagnosed patients using confocal microscopy. To determine the expression levels of *in vitro* cultures of SKOV-3 cells exposed to AF or complete culture medium with FBS, Western Blot assays for Fut 2, 4 and 8 and for RT-PCR for Fut 1-11 were performed. The analysis of the expression of Fut 2, 4 and 8 in tumor sections by confocal microscopy, detected a diffuse and heterogeneous distribution in every CEO histotype. A differential expression was detected when a comparison between healthy and tumor tissues was performed. The results of the PCR and the Western Blot show that there are differences in the protein patterns and in the mRNA of control cells in comparison with cells exposed to AF. These differences changed in a time dependent manner after exposure to AF. With these results, it is suggested that the AF from patients with CEO creates a microenvironment capable of inducing biochemical changes, such as differential expression of fucosyltransferases in ovarian epithelial cancer. Our results suggest that the AF from patients with CEO

generates a microenvironment able to induce morphological and biochemical changes such as the differential expression of fucosyltransferases in SKOV-3.

VII. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de ovario

El ovario normal se desarrolla a partir de la cresta gonadal cerca de los mesonefros y contiene tres tipos celulares principales: 1) células germinales que se derivan del endodermo y migran a la cresta gonadal donde proliferan y se diferencian a oocitos, 2) células endócrinas e intersticiales que producen estrógeno y progesterona y 3) células epiteliales que derivan del ducto de Müller y que cubren el ovario [1]. De acuerdo con los datos del Globocan, durante el 2012 el cáncer de ovario (CaOv) fue el más letal de los cánceres ginecológicos y es la séptima causa de muerte en mujeres en los países desarrollados, con 225,500 nuevos casos y 140,200 muertes estimadas en todo el mundo [2]. La mayoría de los cánceres de ovario (80 a 90%), se desarrollan a partir de células epiteliales, conocido como cáncer epitelial de ovario (CEO) del cual se derivan el seroso, mucinoso, endometriode, células claras y mixtas. Seguido de los carcinomas originados en células germinales y raramente, de las células del estroma [3].

1.1 Clasificación de FIGO

Actualmente, se utiliza una clasificación de los carcinomas diseñado e implementados por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (F.I.G.O.) el cual divide al cáncer de ovario en cuatro estadios:

Estadio 1: El tumor está limitado a uno o ambos ovarios.

Estadio 2: El tumor se encuentra en uno o ambos ovarios y se extiende a la cavidad pélvica (pelvis).

Estadio 3: El tumor afecta a uno o a ambos ovarios y existen implantaciones peritoneales fuera de la pelvis y/o en ganglios linfáticos con células tumorales y la acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal.

Estadio 4: Además de haber afectado a uno o ambo ovarios, tener implantes peritoneales, ganglios linfáticos con células tumorales y la acumulación de líquido ascítico (LA), en esta etapa también existe metástasis hacia órganos distantes [4].

2. Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo que influyen en el desarrollo del cáncer de ovario comprenden la raza, la nuliparidad, el número de ciclos ovulatorios, el haberse sometido a terapias hormonales basadas en andrógenos o progesterona y una historia familiar relacionada con cáncer de ovario, mama, útero y colon, o la presencia de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 (síndrome de mama-ovario). Sin embargo se considera la edad como uno de los factores de riesgo más importantes ya que esta enfermedad afecta al 80% de las mujeres post-menopáusicas. El 15% de los cánceres de ovario están asociados con familiares y el 85% restante, se les considera como esporádicos, debido a que su origen es desconocido. Se ha reportado que el uso de anticonceptivos orales 5 años antes de la menopausia reduce el riesgo de padecer esta enfermedad, posiblemente relacionado con la reducción de la ovulación. Este tratamiento se sugiere debido a que aún no se cuenta con un diagnóstico oportuno y preciso para detectar el CEO [5] [6].

3. Diagnóstico

La alta incidencia de mortalidad en el CEO se debe a la falta de síntomas específicos al inicio de la enfermedad, así como la localización anatómica de los ovarios dentro de la cavidad abdominal, dificultando los chequeos rutinarios, además de que actualmente no existe ningún método eficaz para su diagnóstico temprano [5]. Debido a estas razones, el 70% de las pacientes son diagnosticadas en estadio III o IV, es decir, con diseminación más allá de los ovarios [7].

Dentro de los escasos métodos de diagnóstico del CEO se encuentra la detección sérica de CA-125, un glicoproteína de alto peso molecular (220 kDa) presente en la superficie celular [8], no obstante, su utilidad es limitada en términos de sensibilidad y especificidad [9][10], ya que se han observado niveles elevados de CA-125 en otras condiciones no ginecológicas como carcinoma pancreático, colorectal, mama, pulmón e hígado. Por lo que hoy en día, CA-125 es empleado como antígeno de progresión tumoral y de respuesta al tratamiento [11].

Las células que componen los diferentes histotipos del CEO tienen alteraciones genéticas que se reflejan, principalmente, en el descontrol de la regulación del ciclo celular y en el nivel de expresión de proteínas. Actualmente se han reportado alteraciones específicas de glicanos identificados por estudios con lectinas y basados en anticuerpos, donde el grado de alteración de las glicoproteínas se correlaciona con el estado clínico del paciente [12] [13].

4. Glicosilación y cáncer.

La glicosilación de proteínas es una de las más importantes modificaciones pos-traduccionales, con más del 50% de todas las proteínas humanas glicosiladas [14]. Los patrones de glicosilación de las glicoproteínas de la superficie celular influyen en el desempeño de funciones biológicas esenciales incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la integridad célula-célula y el reconocimiento célula-matriz extracelular, la modulación inmune, la transducción de señales, las interacciones huésped-patógeno y la migración [15]. Los glicanos que se encuentran en los seres humanos están unidos predominantemente a la proteína de dos maneras: (I) un residuo de N-acetil glucosamina (GlcNAc) se añade al residuo de asparagina (Asn) de la proteína dentro de un péptido consenso (excepto prolina) para los N-glicanos o (II) un residuo N-acetil galactosamina (GalNAc) se añade al grupo hidroxilo

en residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) de la proteína para los O-glicanos [16].

Las glicosilaciones aberrantes de proteínas han sido implicadas en diferentes enfermedades debido a su efecto en los cambios asociados con la función biológica y su plegamiento. En cáncer, las glicoproteínas de la superficie celular experimentan cambios estructurales dramáticos durante la progresión tumoral, las moléculas resultantes alteran propiedades importantes de las células cancerosas, facilitando su migración o afectando su reconocimiento por las células de la respuesta inmune, favoreciendo la progresión del cáncer [17] [18].

Los factores que contribuyen en las modificaciones pos-traduccionales de este tipo son la disponibilidad de nucleótidos donantes del azúcar, la disponibilidad de sustrato y las reacciones secuenciales [15][16], así como la alteración de distintas vías de transducción de señales que regulan la expresión específica de glicosiltransferasas, enzimas que catalizan la biosíntesis de estructuras de glicanos [19] conocidas como glicosiltransferasas (GT) y glicosilhidrolasas (GH), las cuales son las responsables de la adición y eliminación de los azúcares en las proteínas en el retículo endoplásmico-Golgi, respectivamente. Las alteraciones en esta vía pueden causar diferentes estructuras de oligosacáridos en las glicoproteínas de la superficie celular, estos cambios de glicanos, como se describió anteriormente, pueden tener efectos potentes sobre el microambiente tumoral [13][20][21]. Reportes previos indican que las glicoproteínas alteradas juegan un papel importante en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, como el carcinoma hepatocelular (HCC) [22] cáncer pancreático [23], cáncer de pulmón [24], cáncer de próstata [25], y cáncer de ovario [26].

Existen muchos tipos de carbohidratos que se le pueden adicionar a las glicoproteínas, tales como el ácido siálico, manosa, glucosa y fucosa, siendo este último, el residuo de mayor interés para este trabajo, ya que en estudios recientes en nuestro grupo de trabajo se determinó la presencia de

haptoglobina fucosilada en líquidos ascíticos de pacientes con CEO y se reportó que los niveles incrementados de esta proteína de fase aguda con un estado de fucosilación aberrante se correlacionaba positivamente con las etapas avanzadas de la enfermedad [27].

5. Fucosilación

La fucosilación es un proceso de transferencia de residuos de fucosa del sustrato donador, GDP-Fucosa al precursor oligosacárido, catalizada por las enzimas Fucosiltransferasas (Fut's) [28].

La L-fucosa es un monosacárido hidrófobo y un componente común de muchos N- y O- glicanos producidos por las células de mamíferos; los glicanos fucosilados se sintetizan a través de la acción de una serie de enzimas denominadas Fucosiltransferasas (codificadas por los genes Fut 1-11) y los productos de dichas actividades enzimáticas se dividen generalmente en dos subcategorías, fucosilación central y fucosilación terminal [18][28].

5.1 Clasificación de las Fucosiltransferasas

Según la posición en la que se incorpore el residuo de fucosa, distinguimos:

1. Fucosilación $\alpha(1,6)$, también denominada fucosilación central porque la transferencia del residuo de fucosa en enlace $\alpha(1,6)$ se realiza sobre el residuo de GlcNAc más interno del núcleo oligosacárido del N-glicano y es catalizada únicamente por Fut 8.
2. Fucosilación $\alpha(1,2)$, en la que se añaden residuos de fucosa mediante enlace $\alpha(1,2)$ a la galactosa terminal de un residuo de lactosamina. Esta reacción la catalizan Fut 1 y Fut 2.

3. Fucosilación $\alpha(1,3)$, en la que se añaden unidades de fucosa mediante enlace $\alpha(1,3)$ a la GlcNAc de una lactosamina tipo I. Esta reacción es catalizada por las enzimas Fut 3, Fut 4, Fut 5, Fut 6, Fut 7 y Fut 9.
4. Fucosilación $\alpha(1,4)$, en la que se añaden unidades de fucosa mediante enlace $\alpha(1,4)$. Esta reacción es característica de Fut 3 y Fut 5, que son las únicas Fucosiltransferasas capaces de catalizar la formación en más de un tipo de enlace, $\alpha(1,3)$ o $\alpha(1,4)$ [28][29][30].

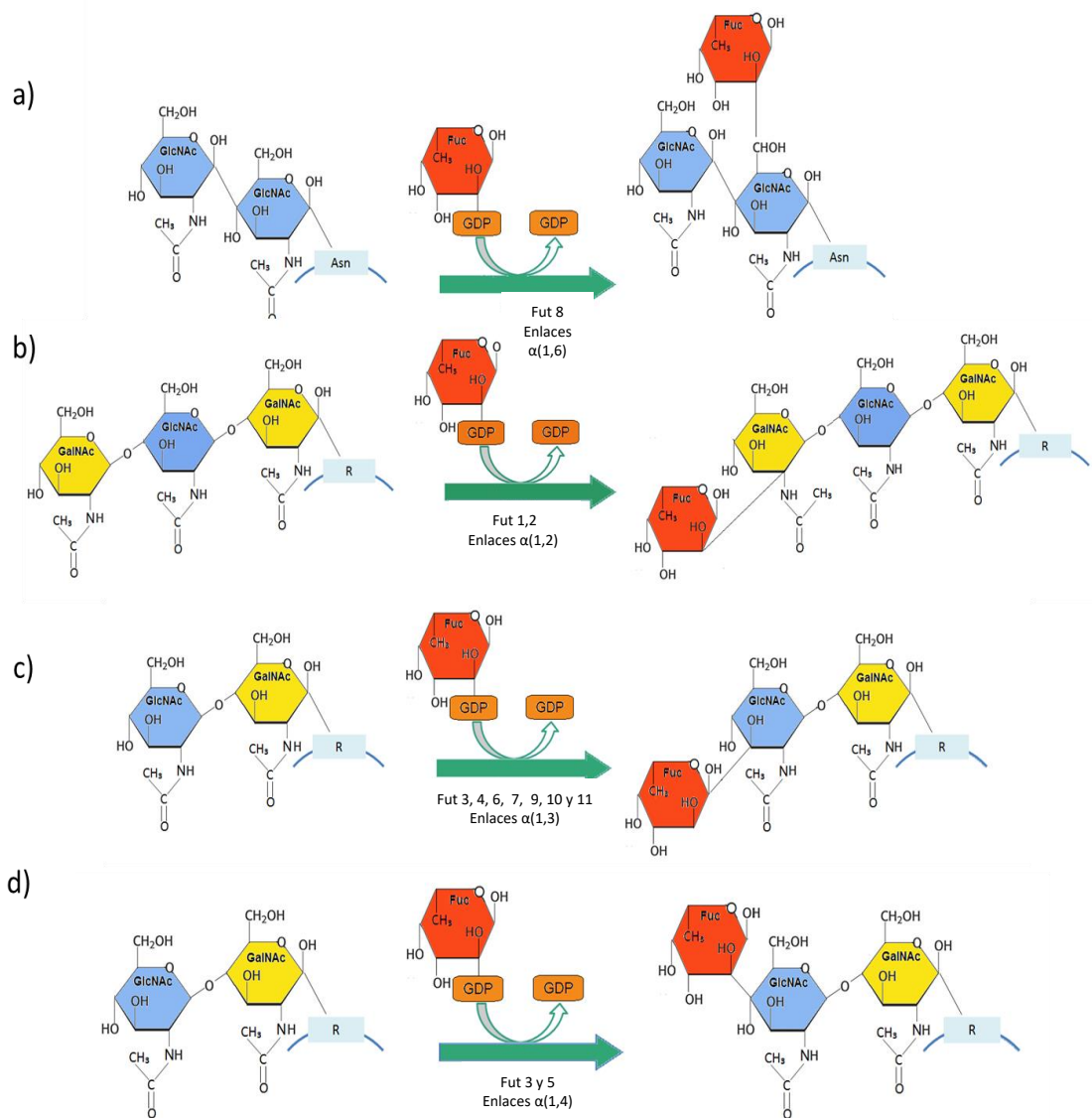


Figura 1. Diagrama representativo de la adición de fucosa catalizada por las Fucosiltransferasas. La fucosilación central se realiza en enlaces $\alpha(1,6)$ en N-acetilglucosamina, mientras que la fucosilación terminal es llevada a cabo en enlaces $\alpha(1,2)$ en N-glucosamina o galactosamina $\alpha(1,3)$ y $\alpha(1,4)$ [31].

5.2 Funciones biológicas

Las Fut's son proteínas transmembranales de tipo 2 que consisten en un dominio amino terminal citoplásmico corto seguido por una región de tallo de dominio trans-membrana, y un gran dominio globular dispuesto hacia la cara luminal del aparato de Golgi [32].

Los antígenos A, B, H del plasma así como los de los hematíes, son glicoproteínas y glicolípidos. Fut 1 y Fut 2 catalizan la adición de fucosa a los residuos de galactosa en glicanos Galb1-4GlcNAc-R, Galb1-3GlcNAc-R y H para formar los antígenos de tipo 1 y 2, respectivamente. Donde el antígeno de tipo H son las estructuras precursoras de los antígenos A y B, además, contribuyen a la síntesis de estructuras de Lewis fucosilados en enlace $\alpha(1,2)$ tales como Lewis Y (Ley, Fuc $\alpha(1,2)$, Galb1-4 (Fuc $\alpha(1,3)$) GlcNAc-R) [19]. Fut 3 interviene en la síntesis del CA19-9 añadiendo un residuo de L-fucosa en enlace $\alpha(1,4)$ [33]. Fut 4 regula el crecimiento de las células A431 mediante el control de la progresión del ciclo celular a través de MAPK y las vías de señalización PI3K / Akt [34]. Fut 8 regula la función del factor de crecimiento epidermal (EGF) mediante la unión a su ligando EGFR formando homo y heterodímeros que activan distintas vías de señalización río abajo tales como la vía PI3K / Akt [35]. Fut 10 y Fut 11 se han identificado en el genoma humano ya que tienen un dominio FT conservado, sin embargo, su actividad no ha sido validada [36].

Aunque la fucosilación es esencial para las funciones biológicas normales, un cambio en estos residuos se ha visto implicado en el cáncer y en el aumento del potencial metastásico de las células transformadas. Por

ejemplo, Antígenos Lex, codificados por Fut 1-7 y Fut 9 se han encontrado expresados diferencialmente en la superficie de células tumorales de cáncer de colon, de mama y líneas celulares de cáncer de ovario, lo cual favorece la progresión del tumor [37].

5.3 Fucosiltransferasas y su relación con el cáncer

Diversos reportes han demostrado neoexpresión o sobreexpresión en tumores de pacientes que normalmente no se expresan o sólo son expresados en bajos niveles en el tejido normal. En el cáncer de pulmón la expresión de los genes Fut 4 y Fut 7 está relacionada a un mal pronóstico [38]. Estas Fucosiltransferasas también se han observado incrementada en carcinoma gástrico y colorrectal [39][40]. La expresión del mRNA del gen Fut 6 fue detectada específicamente en tejidos de cáncer pancreático [41]. Antígenos de Lewis sintetizados por las Fucosiltransferasas 3 y 6 son altamente expresados en los pacientes con cáncer colorrectal metastásico (CRC) y se utilizan como marcadores tumorales para la detección y evaluación de la eficacia del tratamiento del cáncer [42].

La expresión de Fut 4 y Fut 7 promueve la proliferación celular neoplásica y el crecimiento celular *in vitro* de HCC, respectivamente [43].

Algunos datos demuestran que, en cáncer de mama, la sobreexpresión de Fut 4 promueve la proliferación celular y su silenciamiento la disminuye, por lo cual postulan que Fut 4 podría ser un marcador tumoral importante en el cáncer de mama y tal vez un nuevo objetivo de terapia molecular [44][45].

Se conoce que la sobreexpresión de Fut 4 incrementa la expresión de antígenos de Lewis Y sobre la superficie celular que desencadena la proliferación de células neoplásicas. Estos estudios sugieren que la Fucosiltransferasa 4 puede servir como una diana terapéutica potencial para el tratamiento de los cánceres epiteliales [46].

También se ha detectado incremento en los niveles de Fut 3 y de Fut 4 descrito que en los carcinomas de ovario, comparados con tejido de ovario libre de cáncer, Fut 4 se encontró en carcinoma seroso y se reportó que existe una mayor expresión en los tejidos con un mayor grado de progresión [47].

Poco se sabe acerca de la regulación de los genes Fut, sin embargo Belo A. *et al.*, en el 2015 se identificó por primera vez al factor HIF-1 α como un supresor de la expresión de Fut 1/2, regulando de esta manera la síntesis de glicanos fucosilados en enlaces $\alpha(1,2)$ sobre la superficie celular [48].

Por otro lado se ha demostrado que existe una sobre expresión de c-Jun correlacionado con el grado de malignidad del CaOv. Reportan que c-Jun regula positivamente la expresión de Fut 1, que a su vez actúa como un mediador de varias habilidades promotoras del tumor. Por lo cual, los autores del trabajo sugieren la aplicación potencial de inhibidores de c-Jun como una terapia contra el cáncer de ovario [49].

Por otra parte, también se ha demostrado que el silenciamiento de Fut 8 mediante siRNA inhibe la transición epitelio-mesénquimal mediante la supresión de la vía de señalización de TGF- β debido a la inhibición de la fucosilación central de TGF- β RII en células tubulares renales [50].

Datos recientes reportan que el TCR requiere de la fucosilación central para la señalización de células T, la producción de citoquinas inflamatorias y la inducción de colitis en ratones. Los niveles de TCR fucosilados en la región central, se incrementan en tejidos intestinales de pacientes con enfermedades inflamatorias, y proponen que este proceso podría ser bloqueado como una estrategia terapéutica [51].

6. Líquido ascítico

6.1 Clasificación del líquido ascítico

El líquido ascítico (LA) representa una respuesta secundaria a un proceso patológico y se relaciona con diversas enfermedades: la ascitis benigna se puede presentar como un exudado secundario a una pancreatitis o peritonitis, cirrosis hepática e hipoproteïnemia. La ascitis maligna se genera principalmente en cáncer como el de ovario, pancreático, el gástrico y el de colon, debido a la infiltración secundaria de una carcinomatosis con presencia de células transformadas del tumor primario, que circulan y sobreviven como una única célula o como pequeños agregados celulares llamados esferoides, que tienen la capacidad de adquirir nutrientes esenciales. Todo esto generado por el cambio en la permeabilidad vascular por efecto de diversos factores presentes en el fluido acumulado [52].

6.2 Formación y microambiente.

Esta acumulación excesiva del fluido en la cavidad abdominal es una complicación común en el CEO en etapas tardías de la enfermedad. Los mecanismos de formación del LA involucran la obstrucción de las vías linfáticas, activación de células mesoteliales como resultado del proceso metastásico, y un incremento en la permeabilidad [53].

La ascitis contiene factores de crecimiento como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), factor básico de crecimiento de fibroblastos (b-FGF), factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- α y TGF- β), proteínas del complemento, lípidos bio-activos como el ácido lisofosfatídico, entre muchos otros [54], así como constituyentes de la matriz extracelular producidos por los leucocitos infiltrados en el tumor y células mesoteliales activadas no cancerosas. La infiltración de células malignas de la superficie del tumor de ovario a la cavidad peritoneal es un escenario común en la progresión del carcinoma de ovario, la implantación subsecuente de las

células tumorales infiltradas a sitios secundarios a lo largo del revestimiento mesotelial del peritoneo depende de su proliferación, adhesión, migración y fenotipo invasivo [55].

Por lo tanto, se requiere una mayor comprensión de los cambios biológicos inducidos por la ascitis en las células cancerosas para entender la biología de la progresión del CEO.

VIII. JUSTIFICACIÓN

- El CEO es la neoplasia del sistema reproductor femenino más letal a nivel mundial, debido a la falta de pruebas sensibles y específicas capaces de detectar la enfermedad en etapas tempranas. En estadios avanzados de CEO se desarrolla la producción de líquido ascítico en la cavidad peritoneal, este líquido contiene componentes que podrían estar alterando el microambiente, como la expresión o inactivación de algunas enzimas.
- En los últimos años se ha enfocado en el estudio de glicanos aberrantes sobre la superficie celular, donde los niveles de fucosilación se han relacionado con la progresión tumoral, por lo cual estudiar los mecanismos de regulación, en particular, la expresión de las Fucosiltransferasas, sería importante para una mayor comprensión de los cambios bioquímicos inducidos en las células durante el desarrollo del CEO.

IX. HIPÓTESIS

- El microambiente que rodea a las células transformadas regula la expresión de las Fucosiltransferasas en el CEO.

X. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

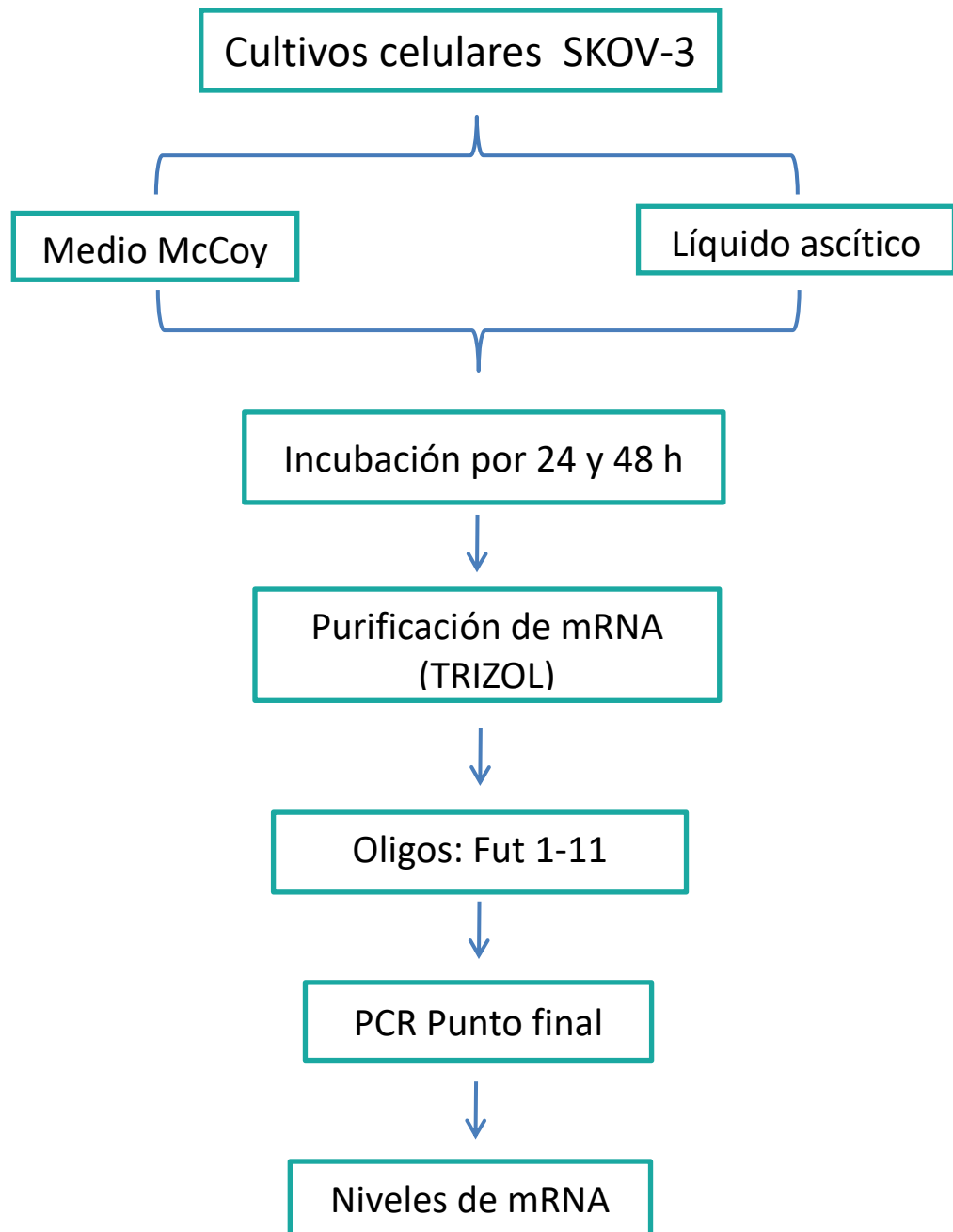
- Determinar los niveles de expresión de Fucosiltransferasas en tejido tumoral de pacientes con CEO y en la línea celular SKOV-3 tratada con líquido ascítico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

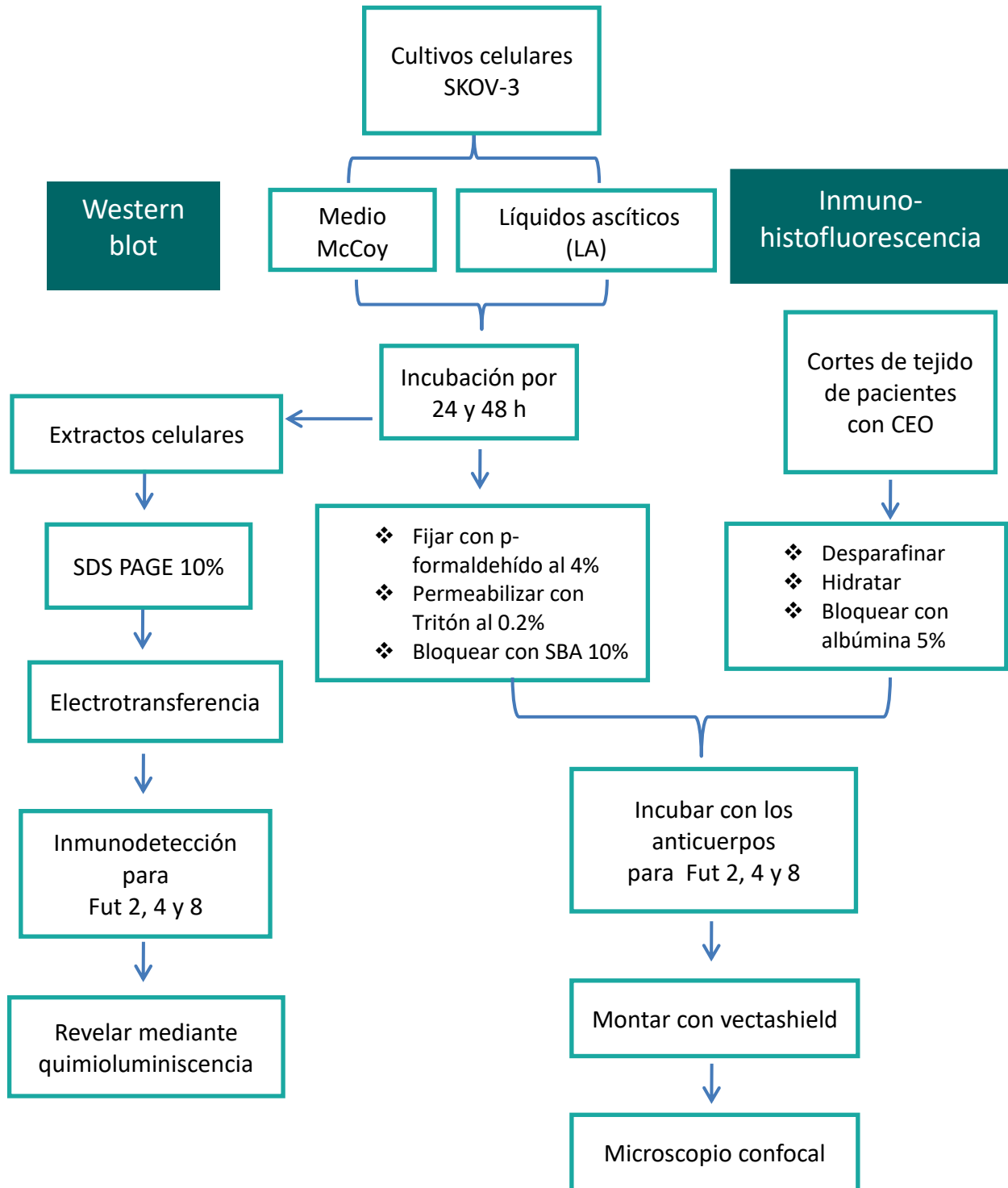
- Determinar los niveles del mRNA de los genes *Fut 1-11* en células SKOV-3 tratadas con y sin líquido ascítico.
- Evaluar los niveles proteicos de Fut 2, 4 y 8 en cortes de tejido tumoral de pacientes con CEO y en células SKOV-3 tratadas con líquido ascítico.

XI. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

- Determinar los niveles del mRNA de los genes *Fut 1-11* en células SKOV-3 tratada con y sin líquido ascítico.



- Evaluar los niveles proteicos de Fut 2, 4 y 8 en cortes de tejido tumoral de pacientes con CEO y en células SKOV-3 tratadas con líquido ascítico.



XII. METODOLOGÍA

- **Línea celulares SKOV-3**

La línea celular SKOV-3 fue adquirida en ATTC (HTB-77). La línea fue generada en 1973, a partir de líquido ascítico de una mujer caucásica de 64 años con un tumor de ovario de subtipo histológico seroso papilar. Tienen una morfología parecida a la epitelial y posee una actividad de quimiotaxis. En modelos animales, esta línea celular puede llegar a formar tumores primarios de ovario. Las células fueron cultivadas a 37°C en medio McCoy's 5A adicionado con suero fetal bovino al 10%, con una atmósfera de CO₂ del 5%.

- **Material biológico.**

Los cortes de tejido tumoral de pacientes con cáncer epitelial de ovario, embebidas en parafina fueron provistas, bajo convenio aprobado por los Comités de Bioética y Científico (protocolo No. 012/018/GII,CB/764) a través del el Banco de Tumores del instituto Nacional de Cancerología (INCan), con la colaboración con los doctores Dr. María de los Dolores Gallardo Rincón y David Francisco Cantú De León. La estratificación clínica de cada paciente se determinó al momento de su cirugía, el grado de avance del tumor y la histopatología fueron asignados por un patólogo de acuerdo con los criterios de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO).

Las muestras de líquido ascítico fueron obtenidas a partir de pacientes diagnosticadas con carcinoma ovárico adscritas al Departamento de Oncología Médica del INCan, a través de un Protocolo elaborado por nuestro grupo de trabajo y aprobado por los Comités de Bioética y Científico, con el expediente No. 009/029/GOI)(CB/549/09), bajo la asesoría de la Dra. Dolores Gallardo Rincón, Oncóloga Médica del INCan.

- **Procesamiento del líquido ascítico:**

El líquido ascítico se extrajo por paracentesis bajo condiciones de esterilidad y se colocó en un tubo Falcon estéril de 50 ml. Los tubos se colocaron en un recipiente con hielo y se transportaron al laboratorio el mismo día de la extracción para su procesamiento inmediato. Para ser incluidas en el estudio las muestras de ascitis debieron ser claras, libres de bacterias (analizadas por centrifugación y observación directa al microscopio óptico) y no contener sangre visible (por la coloración de la ascitis). Las muestras que cumplían con estas condiciones, se centrifugaron a 4,000 rpm (1,000 x g) por 10 min a 4°C. La ascitis libre de células tumorales fue filtrada utilizando equipos de filtración (Corning, diámetro de poro de 0.22 µm, No. Cat. 431097). Las muestras de líquido ascítico fueron etiquetadas y almacenadas en nitrógeno líquido a -70°C.

- **Lisis celular**

El líquido ascítico se extrajo por paracentesis bajo condiciones de esterilidad y se colocó en un tubo Falcon estéril de 50 ml. Los tubos se colocaron en un recipiente con hielo y se transportaron al laboratorio el mismo día de la extracción para su procesamiento inmediato. Para ser incluidas en el estudio las muestras de ascitis debieron ser claras, libres de bacterias (analizadas por centrifugación y observación directa al microscopio óptico) y no contener sangre visible (por la coloración de la ascitis). Las muestras que cumplían con estas condiciones, se centrifugaron a 4,000 rpm (1,000 x g) por 10 min a 4°C. La ascitis libre de células tumorales fue filtrada utilizando equipos de filtración (Corning, diámetro de poro de 0.22 µm, No. Cat. 431097). Las muestras de líquido ascítico fueron etiquetadas y almacenadas en nitrógeno líquido a -70°C.

- **Western blot**

Los extractos proteicos de las células SKOV-3 (50 µg) de cada condición medio 48 h y LA 24 y 48 h, se corrieron en geles SDS-PAGE al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie. Una réplica se transfirió en frío a 25 V durante toda la noche a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con rojo de Ponceau durante 30 min en agitación constante a temperatura ambiente, para confirmar la transferencia de las proteínas. Posteriormente se lavó la membrana con TBS-Tween 20 al 0.05%. La membrana se bloqueó con leche al 5% en TBS-T por 1 h y después se lavó, de 4 a 5 veces, con TBS-T por 30 min cada lavado. Para la detección de las enzimas se utilizaron anticuerpos primarios policlonales, anti-Fut 2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, No. Cat.: sc-21964) diluido 1:250 en TBS-T leche al 2.5% y anti-Fut 4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, No. de Cat. sc-292247) en una dilución 1:2500 en PBS leche al 2.5%, y un anticuerpo monoclonal anti-Fut 8 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, No. Cat. sc-271244) diluido 1:100 en TBS-T leche al 2.5%. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Posteriormente se lavaron con TBS-T de 5 a 7 veces durante 10 min cada uno. La incubación con los anticuerpos secundarios fue como se describe: un anticuerpo anti-IgG de cabra (No. Cat. 705-035-003) para Fut-2, un anticuerpo anti-IgG de conejo (No. Cat. 111-035-003) para Fut 4 y un anticuerpo anti-IgG de ratón (No. Cat. 115-035-003) para Fut 8. Los tres anticuerpos secundarios están acoplados a peroxidasa de rábano (HRP), y se utilizaron en una dilución 1:1,000 en TBS-T leche 2.5 %. Se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Se realizaron 5 lavados de 10 min cada uno con TBS-T y finalmente se reveló por quimioluminiscencia (SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate, thermoScientific, #34095).

- **Inmunofluorescencia**

Las células SKOV-3 (5×10^4) se cultivaron sobre cubreobjetos y fueron expuestas a diferentes condiciones. Como condición control, las células se incubaron en medios McCoy's y como condiciones experimentales las células se incubaron con diferentes LAs (códigos: 151910, 152433 y 151737), durante una cinética de tiempo de 24 y 48 h. Posteriormente se les retiró el medio o tratamiento y se realizaron 2 lavados con PBS filtrado. Las células se fijaron con p-formaldehído al 4% por 1 h a 37 °C y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2%, se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA (*Bovine Serum albumin*) al 10% por 1 h a 37 °C. Se adicionaron los anticuerpos primarios para las Fucosiltransferasas 2, 4 y 8, en una dilución 1:50 en PBS. Se incubaron durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se retiró el anticuerpo primario y se lavó 3 veces con PBS. Se adicionaron los anticuerpos secundarios: un anticuerpo anti-IgG de cabra-FITC (No. Cat. A-15970) para Fut 2, un anticuerpo anti-IgG de conejo-TRITC (No. Cat. A-16028) para Fut 4 y un anticuerpo anti-IgG de ratón-ALEXA 647 (No. Cat. A-214663) para Fut 8, en una dilución 1:100 en PBS. Se incubó durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Se retira el anticuerpo secundario y se lava tres veces con PBS. Se incubo 10 min con 100 µl de DAPI. Se lavó tres veces con PBS y se montó sobre un portaobjetos con 7 µl de vectashield (No. Cat. H-1000). Las muestras fueron almacenadas a -20 °C. Es importante mencionar que el marcaje para las diferentes Fucosiltransferasas se realizó de manera simultánea.

Para los experimentos de fucosilación total, se sembró el mismo número de células en las mismas condiciones de incubación, incluyendo el tiempo de 72 h, y se utilizó un control de células en medio tratadas a las 48 h. Las células se fijaron, se permeabilizaron y se bloquearon como se mencionó anteriormente. Posteriormente se empleó la lectina *Aleuria aurantia* biotinilada (AAL) (No. Cat. B-1395) que se une preferentemente a fucosa unida a enlaces (α -1,6) de N-acetilglucosamina o fucosa unida a enlaces (α

-1,3) de N-acetil-galactosamina. AAL también se une de forma reversible a fucosas unidas a los ácidos nucleicos. La incubación se realizó toda la noche a 4°C y al otro día se incubó con estreptavidina-FITC (No. Cat. 9538SA) durante 1 h a temperatura ambiente, posteriormente se incubó con DAPI y se montó como se describió anteriormente.

- **Inmuno-histofluorescencia**

Los cortes de tejido tumoral de pacientes con CEO (20) y un tejido ovárico libre de cáncer, embebidos en parafina y proporcionados por el INCan, fueron desparafinados a 60 °C toda la noche. Posteriormente los cortes histológicos fueron colocados en xilol durante 5 min 3 veces. Las laminillas se hidrataron en soluciones descendientes de etanol (absoluto, 95%, 90%, 80%, y 70%) durante 5 min c/u. Se lavó 3 veces con TBS-T durante 5 min. La recuperación antigénica se realizó con la incubación del amortiguador de tripsina 0.1%, CaCL₂ 0.1% pH 7.8 en H₂O mQ durante 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los cortes se lavaron 2 veces con TBS-T durante 5 min cada uno, para bloquear los sitios de unión inespecíficos. Las muestras fueron bloqueadas con BSA al 10% en TBS-T, recién preparada, durante 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se retiró la BSA y las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios (anti Fut 2, Fut 4 y Fut 8) descritos en la sección anterior. Los tres anticuerpos fueron diluidos 1:50 en Tris-HCL 0.05 M, pH 7.4, con BSA al 1% y Tween 20 (150 µL por corte), y se incubaron en cámara húmeda toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron 3 veces con TBS-T por 5 min c/u y se aplicaron los anticuerpos secundarios: Para Fut-2 se empleó un anticuerpo anti-IgG de cabra-FITC, para Fut- IV un anticuerpo anti-IgG de conejo-TRITC y para Fut 4 un anti-IgG de ratón-ALEXA 647 en una dilución 1:100 en Tris-HCL 0.05 M pH 7.4. La incubación se realizó durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Se retiró el anticuerpo secundario y se lavó tres veces con TBS-T durante 5 min. Se incubaron con 100 µl de DAPI durante 10 min. Se lavó tres veces con TBS-T 5 min y se montó con 15 µl de Vectashield (No. Cat. H-

1000). Las muestras fueron almacenadas a -20 °C. Es importante mencionar que las diferentes Fucosiltransferasas se analizaron de manera simultánea. Las imágenes obtenidas son el resultado de un análisis por "Tile Scan", lo que significa que se registró la fluorescencia presente en 25 campos en un cuadrado de 5 x 5, observados mediante un objetivo 40X, con un aumento óptico (Crop) de áreas específicas. El equipo utilizado para el análisis de las muestras fue un Microscopio Confocal Carl Zeiss LSM 700, en el cual las imágenes fueron procesadas mediante el software Zen 2012 Blue Edition.

- **Aislamiento de RNA total "TRIZOL"**

Células cultivadas en cajas T-75 incubadas en presencia de líquido ascítico y medio McCoy's, con una confluencia del 80-90%, fueron lisadas directamente en las cajas de cultivo con 4 ml de TRIZOL. Las células recuperadas se pasaron a tubos Eppendorf nuevos. La fase de separación consistió en dejar reposar por 5 min a temperatura ambiente, con la finalidad de permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se adicionaron 20 µl de cloroformo por cada mililitro de TRIZOL, se realizó un ciclo de vortex/reposo vigorosamente (15 seg/15 seg) por 3 min. Se centrifugó la muestra a 6 000 rpm por 15 minutos a 4 °C, y se procedió a retirar la fase acuosa (fase superior más clara). Posteriormente se precipitó el RNA, para lo cual se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se adicionaron 500 µl de isopropanol por cada ml de TRIZOL utilizado para la homogeneización inicial. Se homogeneizó y se incubó 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 6 000 rpm por 10 min a 4 °C (se formó un precipitado parecido a un gel en el fondo del tubo). Se retiró el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 75%, con 1 ml por cada ml de TRIZOL usado para la homogeneización. Se centrifugó a 3,500 rpm, por 5 minutos a 4 °C. La pastilla obtenida de RNA se secó brevemente y se resuspendió en 20 µl de agua DEPC (pirocarbonato de di-etilo). Se incubó por 15 min a 55-60 °C y se almacenó a -20 °C. La concentración de RNA se estableció por absorbancia de la muestra a 260 nm.

- **Ensayos de RT-PCR.**

Para el procesamiento del cDNA se utilizó el First strand cDNA synthesis Kit (Thermo Scientific, No. Cat K1612) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se tomaron 5 µg de RNA total de cada condición, se cargó 1 µl de oligo dT, 9 µl agua DEPC y la mezcla se incubó a 65 °C durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 2 µl de amortiguador 5X First Strand, 1 µl de la mezcla de dNTP's, 5 µl de 0.1 M DTT y se incubó a 37 °C durante 2 min con 1 µl de inhibidor de RNasa ribolock, posteriormente se adicionó 1 µl de la enzima M-Mul V transcriptasa reversa, y se incubó a 37 °C durante 60 min y 70 °C 5 min.

El cDNA molde se procesó durante 35 ciclos de amplificación utilizando el Sistema de iCycler BIO-RAD. La PCR se realizó en una mezcla de reacción estándar de 20 µl que consistió en: 2 µl de Buffer Taq 10X con KCl 10 mM, 2 µl de una mezcla de dNTP 25 mM, 3 µl de oligos sentido y 3 µl de oligos anti-sentido, 0.5 µl de la enzima DNA Taq pol y 4 µl de cDNA. Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes de la Fucosiltransferas aparecen en la tabla 1. Los productos de PCR amplificados se procesaron en un gel de agarosa al 2 % que contenía 0.02 % de bromuro de etidio. Para normalizar la cantidad de cDNA total, se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de la enzima constitutiva gliceraldehídos-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

XIII. RESULTADOS

El microambiente generado por el LA induce cambios morfológicos en las células SKOV-3. Antecedentes directos de nuestro grupo de trabajo, reportados por Toledo Leyva en el 2013 demuestra que los LA generan distintos microambientes en las células SKOV-3, ya sea favoreciendo la proliferación celular, la formación de agregados celulares, e inclusive generando efectos citopáticos.

Para validar el efecto del LA que se emplearía en los ensayos del presente estudio sobre las células SKOV-3, se realizó una cinética de tiempo (24, 48 y 72 h) de células incubadas con el LA 151910. Como condición control, las células SKOV-3 se incubaron en medio suplementado durante 48 h.

En la Figura 2, se presenta el registro fotográfico digitalizado de las células SKOV-3 que se emplearon para el análisis de la expresión de las Fucosiltransferas, a través de PCR, Western blot, e Inmunofluorescencia. Los resultados validaron el efecto de la estimulación de las células SKOV.3 con líquido ascítico en la inducción de cambios morfológicos a partir de las 24 h, manteniéndose dicho efecto hasta las 72 h de incubación. Las células control se observan creciendo en monocapas sin cambios morfológicos aparentes y conservan su posición en el centro de la superficie del cultivo, del T0 a las 48 h de incubación. Mientras que las células incubadas en LA por 24 h mostraron una morfología fusiforme y un contenido citoplasmático reducido y alargado, con prolongaciones membranales extensas, morfología similar a la de un fibroblasto. Las células no presentaban daño citopático tras la exposición al LA. Sin embargo, trascurridas las 48 h de incubación en el LA, las células se observaban con mayor contenido citoplásmico y formando agregados celulares, también se observaron células refringentes y en algunos campos, se detectó la presencia de células redondeadas. Esta morfología no es un patrón de daño, sin embargo, el aspecto del cultivo sugería que las células SKOV-3 pasaban por un proceso de adaptación al LA. A las 72 h de incubación las células volvieron adquirir la morfología de

las células incubadas por 24 h. Otra condición observada a las 72 h, fue que el moco presente en el cultivo atraía a las células SKOV-3, ya que las células se encontraban embebidas sólo donde estaba presente esta secreción, dejando totalmente despejadas la demás áreas de la superficie. La presencia de esta mucina es un componente que podría ser generado por las célula SKOV-3 o provenir del LA adicionado.

Todos los campos analizados, en las tres condiciones de incubación con LA eran homogéneos y las prolongaciones membranales podían llegar a ser tan largas, que es sus regiones más distantes, se unían con otras células con la misma característica estructural. (Fig. 2)

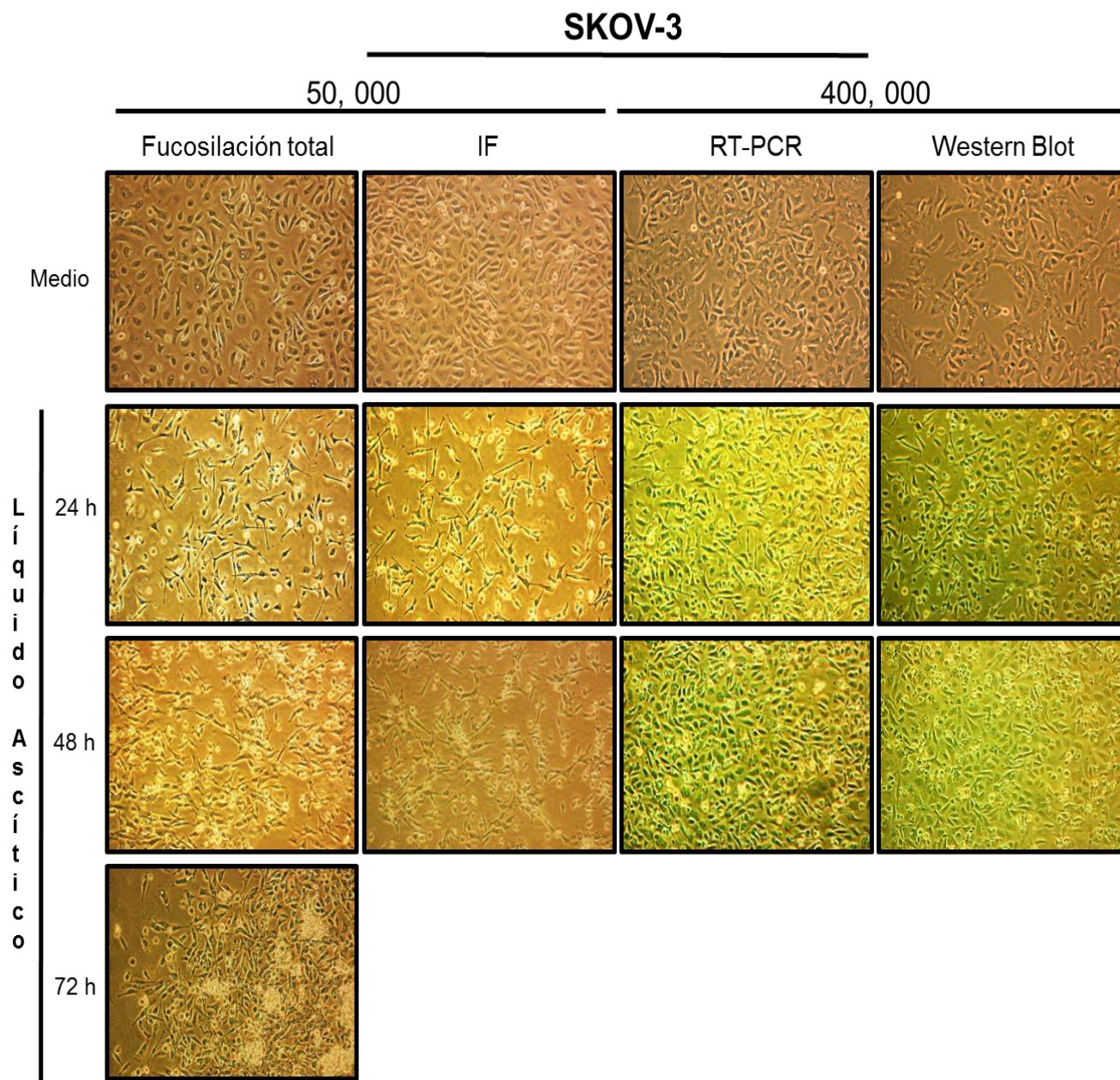


Figura 2. Morfología de las células SKOV-3 incubadas durante un curso temporal en presencia del LA 151910, Células incubadas en LA por 24, 48 y 72 h y en medio por 48 h. Las células se analizaron por microscopía óptica por la técnica de contraste de fases en un objetivo 10X. La imagen representa 4 ensayos independientes realizados por duplicado.

El LA modifica los niveles transcripcionales de RNA de las Fucosiltransferasas 1-11 en las células SKOV-3.

Estudios previos han reportado patrones diferenciales en la expresión de las Fucosiltransferasas en distintos tipos de cáncer. En este estudio, se evaluó la expresión de las Fucosiltransferasas 1-11 en células expuestas al LA 151910. En la Figura 3 se muestra el patrón de expresión de los genes de las Fucosiltransferasas mediante ensayos de PCR punto final, observando la amplificación de fragmentos específicos para la FUT 1 (395 pb), FUT 2 (483 pb), FUT 3 (521 pb), FUT 4 (516), FUT 5 (555 pb), FUT 6 (534 pb), FUT 7 (497 pb), FUT 8 (539 pb), FUT 9 (809 pb) y FUT 10 (681); en estas condiciones no se logró amplificar el gen correspondiente para FUT 11 (650 pb), aunque los oligos fueron capaces de amplificar a partir de muestras de DNA, el fragmento esperado. Esta condición se incluyó como control positivo. La amplificación de GAPDH (395 pb), utilizado como control de carga para la RT-PCR, mostró intensidades similares para todas las condiciones de incubación, lo que sugiere que la variación en la amplificación del RNA de las Fucosiltransferasas refleja los niveles de expresión de dichas enzimas al momento del análisis, y no una diferencia en la cantidad del cDNA utilizado.

En el caso específico de FUT 1, 2, 4, 5, 7, y 8 observamos que los niveles del mRNA se incrementan en las células que fueron expuestas en LA por 24 h, en comparación con las células expuestas a medio o en LA por 48 h. Sin embargo, existen otras Fucosiltransferasas cuyo RNA incrementa sus niveles a las 48 h de exposición al LA, comparándolas con las células incubadas en medio y en LA por 24 h, como es el caso las Fut 3, 6 y 9. Para el caso de Fut 10, las células tratadas con el LA por 24 y 48 h, se mantiene debajo de los niveles expresados en las células control. Los análisis densitométricos realizados en el experimento de PCR punto final, siguieron fuertemente que los genes de las Fucosiltransferasas están sujetos a la regulación

ocasionada por el tratamiento con el LA, ya sea incrementando o disminuyendo sus niveles de mRNA (Fig. 3).

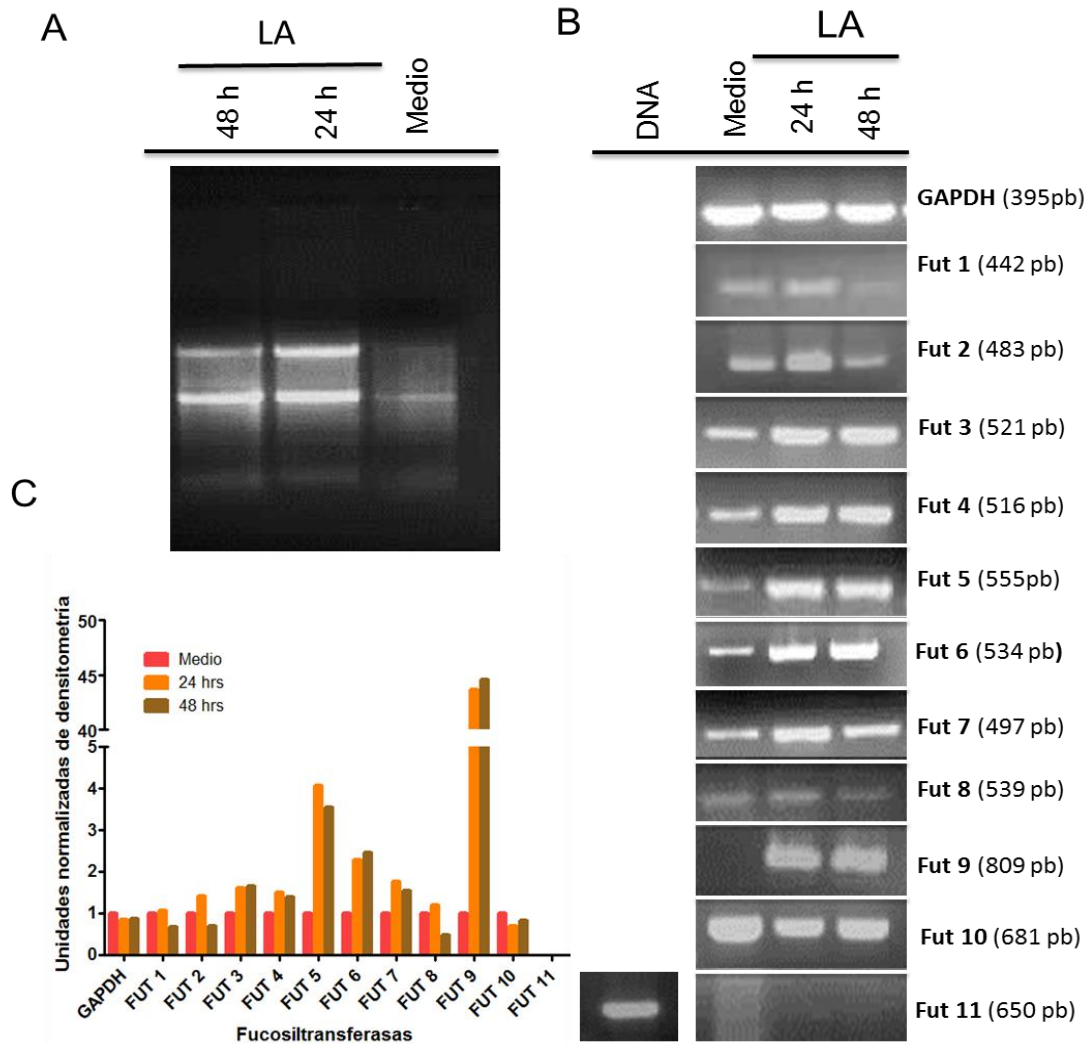


Figura 3. Análisis de RT-PCR de las Fucosiltransferasas 1-11 en la línea celular SKOV-3. Purificación de RNA de células SKOV-3 (A), el cual se utilizó para generar el cDNA. Después de la reacción de PCR, los productos se separaron en geles de agarosa al 2%. GAPDH fue utilizado como control de carga y para Fut 11 se utilizó DNA como control positivo. Los tamaños de los fragmentos amplificados se indican a la derecha (B). Análisis densitométrico con valores normalizados en relación al valor obtenido con el control (C). Resultados representativos de tres experimentos realizados por triplicado.

El LA genera cambios en los niveles de expresión de las proteínas Fut 2, 4 y 8 en células SKOV-3.

La familia de las Fucosiltransferasas se divide en cuatro grupos, según la posición del enlace donde se adicionen los residuos de fucosa. Existen dos tipos de fucosilación; fucosilación central y fucosilación en región terminal. Tomando en cuenta esta categorización se seleccionaron dos enzimas que forman enlaces en regiones terminales del oligoacárido y que pertenecen a grupos diferentes. Fut 2 que realiza la adición de fucosa en enlaces $\alpha(1-2)$ y Fut 4 que realiza la transferencia en enlaces $\alpha(1-3)$, y por último se seleccionó a Fut 8 ya que es la única Fut que puede catalizar la transferencia de fucosa en enlaces $\alpha(1-6)$, mejor conocida como fucosilación central.

Una vez establecidos los patrones de expresión de los genes que codifican para las diferentes Fucosiltransferasas, se realizaron ensayos de WB para analizar los niveles de expresión de las proteínas seleccionadas en las diferentes condiciones de incubación con el LA y establecer si había correlación entre ambos productos. En la figura 4 se muestran los extractos proteicos de las células SKOV-3 analizadas en geles SDS-PAGE al 10% teñidos con azul de Coomassie para observar el patrón de proteínas totales (Fig. 4A). El análisis de Western blot de una réplica de este material validó que los niveles de las Fucosiltransferasas, se modulan durante los periodos de incubación en el LA. Resaltando que la Fut 2 y 4 presentan una sobreexpresión en células incubadas durante 24 h en LA comparadas con la condición control, mientras que las células incubadas a 48 h en LA muestran una reducción en sus niveles de expresión. En el caso de Fut 2, la disminución de su expresión es menor comparada con la condición de 24 h en LA, pero es mayor comparada con la condición control. Para Fut 4, la caída de su expresión a las 48 h, es más marcada comparándola con la condición de 24 h de incubación en LA, e incluso, comparada con la condición control. Sin embargo, observamos que los niveles proteicos de Fut 8 se ven incrementados en la condición de 48 h de incubación en LA,

comparada con la condición control y la de 24 h en LA. Como control de carga se utilizó a ERK total (Fig. 4B). Los resultados antes descritos se apoyaron a través del análisis densitométrico de las bandas identificadas por los anticuerpos (Fig. 4C). Los cambios en estas fucosiltransferasas, aunque no en la misma proporción, correlacionan con lo encontrado a nivel del RNA.

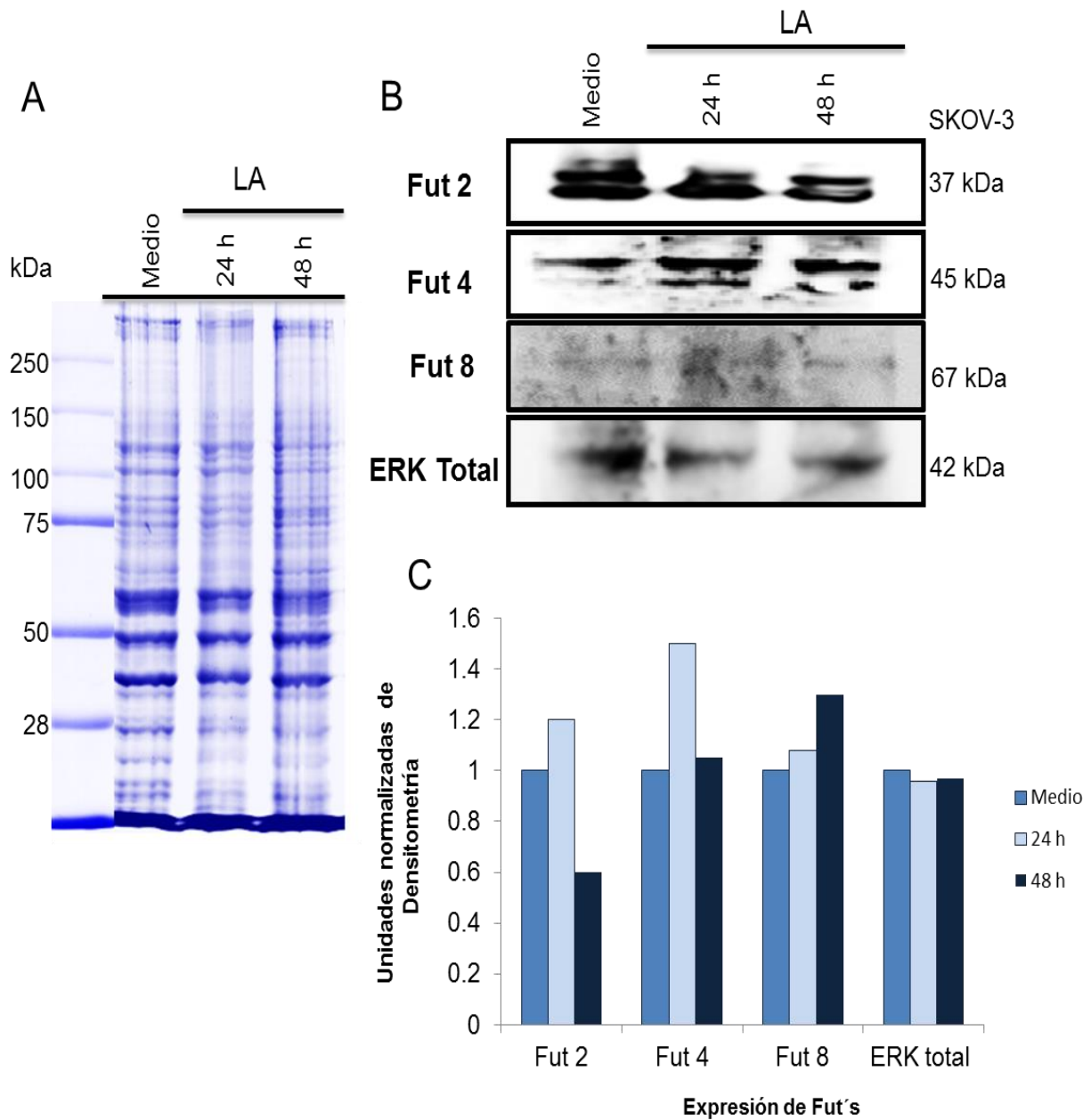


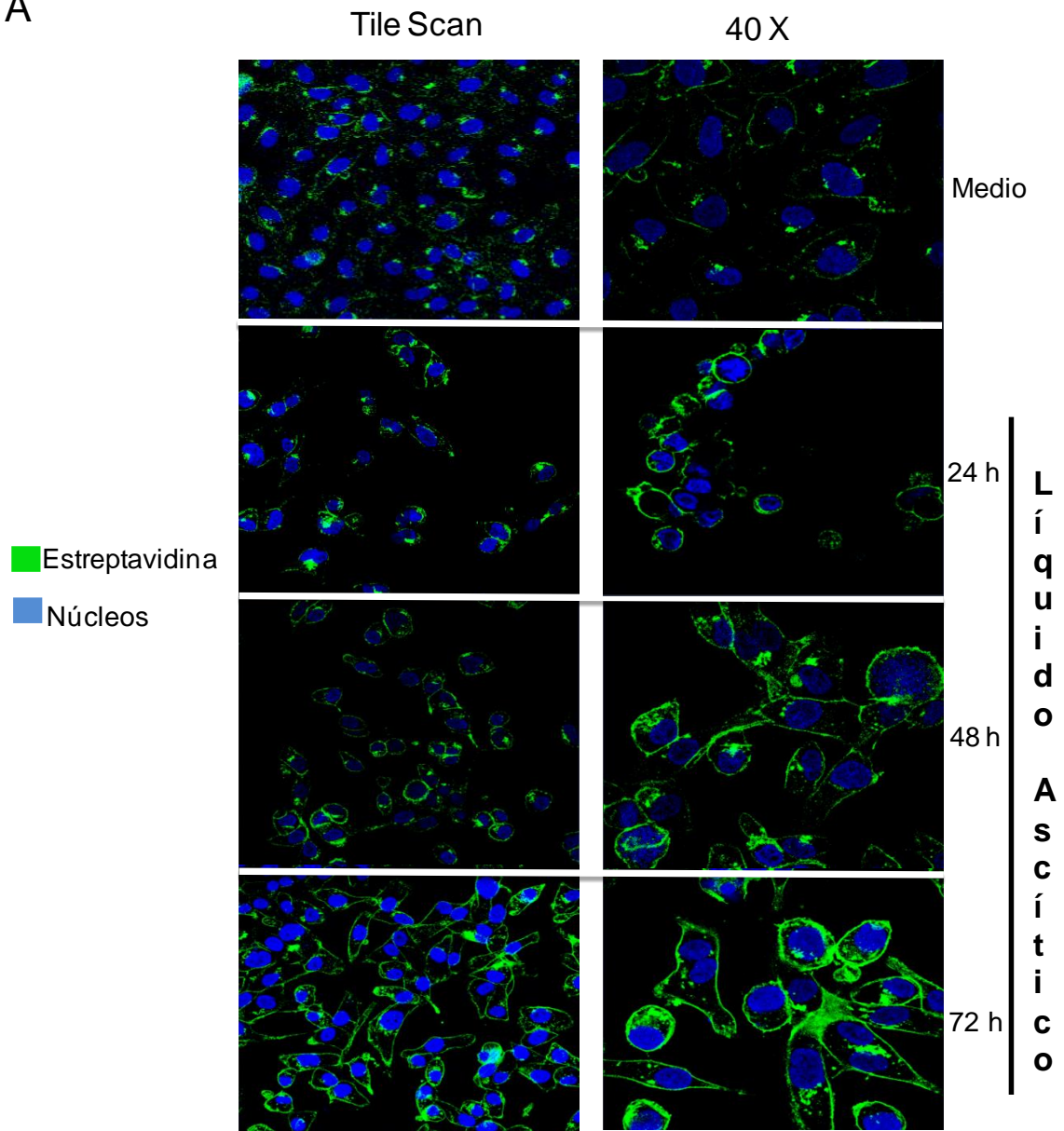
Figura 4. Inmunodetección por Western Blot de Fut 2, 4 y 8 en células SKOV-3. 50 µg de proteína se cargaron por condición en cada carril en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de metileno (A). Se utilizaron anticuerpos policlonales para Fut 2 y 4, y un anticuerpo monoclonal para Fut 8. Indicando los pesos moleculares para Fut 2 de 37 kDa, para Fut 4 de 45 kDa y para Fut 8 de 67 kDa (B). Análisis densitométrico de las unidades normalizadas con respecto a los valores obtenidos de las células control (C).

La fucosilación total es tiempo dependiente a la exposición del LA en células SKOV-3

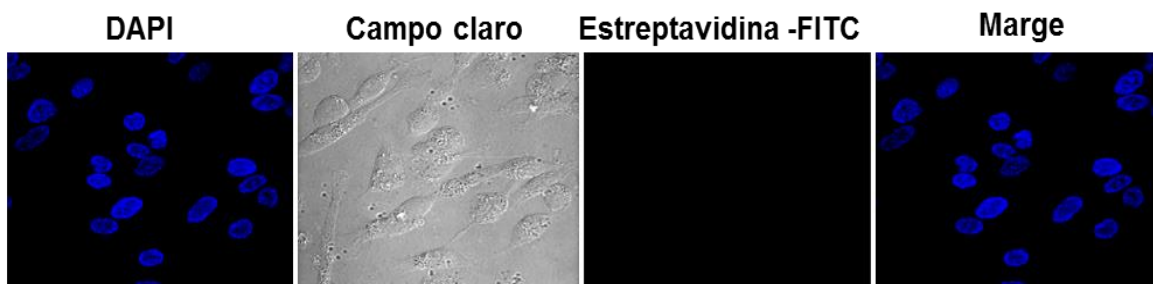
Las Futs realizan la adición de residuos de fucosa en las glicoproteínas, por lo cual analizar la fucosilación total es una forma indirecta de determinar la actividad de estas enzimas. Se realizaron ensayos con la lectina AA que tiene afinidad por enlaces de fucosa, con la finalidad de determinar los niveles de fucosilación en respuesta a la exposición del LA en las células SKOV-3. En la Figura 5, observamos que los niveles de fucosilación son dependientes del tiempo de exposición al líquido ascítico, por lo que se sugiere que el LA juega un papel importante en la regulación de la fucosilación total en células SKOV-3.

El análisis por microscopía confocal, reveló que en la condición de medio existe una fucosilación basal y que esta señal se mantiene en zonas perinucleares y de manera discreta en la membrana plasmática de las células. También observamos que a las 24 h, la fucosilación comienza a incrementar en comparación con el control y existe un marcaje mejor definido sobre la membrana, sin embargo, este evento es más evidente a las 48 h. A las 72 h de incubación, el citoplasma muestra mayor señal, de forma homogénea y la membrana plasmática está fucosilada en mayor proporción. En algunas células se logra observar puntos de colocalización entre la lectina y el núcleo, resultados que tienen que ser confirmados por otros métodos (Fig. 5A). El control negativo corrobora que no existe señal inespecífica del anticuerpo secundario (Fig. 5B). Análisis de Intensidad de fluorescencia en unidades de píxeles (5C).

A



B



C

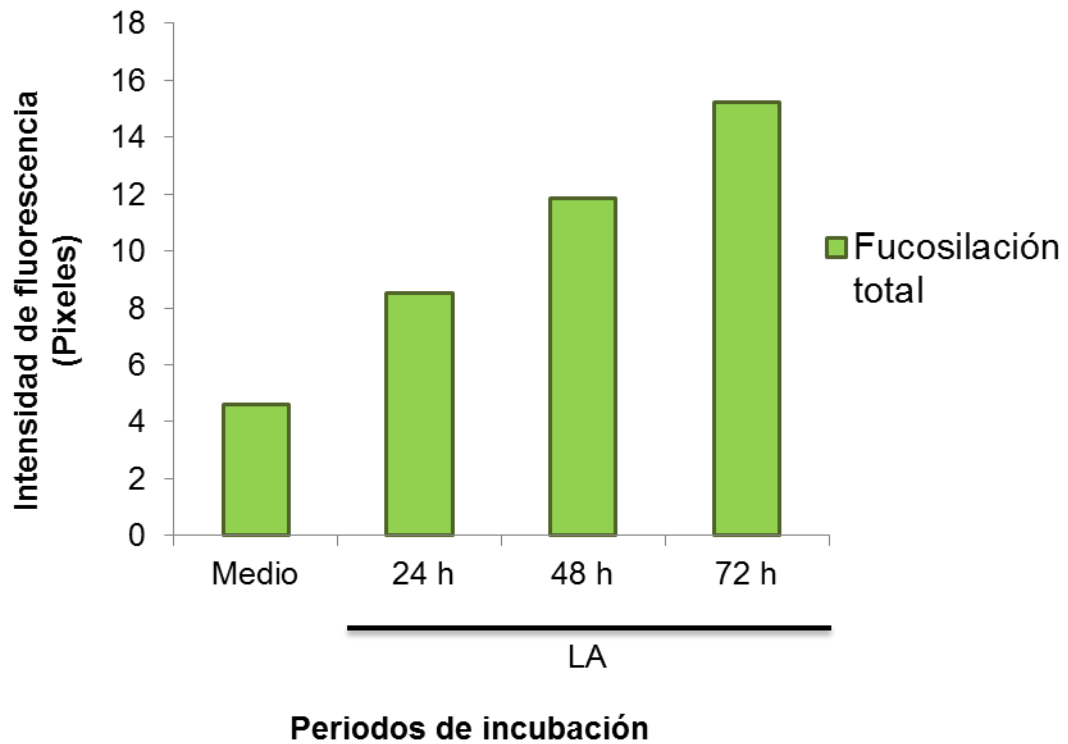


Figura 5. Análisis de microscopía confocal de la fucosilación total en células SKOV-3 estimuladas con LA. Se muestra una imagen representativa de la fucosilación total de cada periodo de incubación, a un aumento de 40X, donde a los núcleos se marcaron con DAPI y las proteínas fucosiladas se marcaron con *Aleuria Aurantia* acoplada a biotina. En el carril izquierdo se muestra el Tile Scan de 4 campos y del lado derecho un solo campo de cada condición (A). Control negativo con estreptavidina acoplada a FITC (B). Análisis de intensidad de fluorescencia reportada en unidades de píxeles (C).

Localización subcelular de las fucosiltransferasas en células SKOV-3 expuestas a LA.

Para conocer la distribución subcelular de las fucosiltransferasas se realizaron ensayos *in situ* utilizando anticuerpos policlonales anti: Fut- 2 y Fut-4, con respecto a la detección de la Fut-8, se utilizó un anticuerpo monoclonal. Se cultivaron células SKOV-3 y se analizaron a través de un microscopio confocal. Se incluyó un control negativo para descartar marcaje inespecífico por parte de los anticuerpos secundarios.

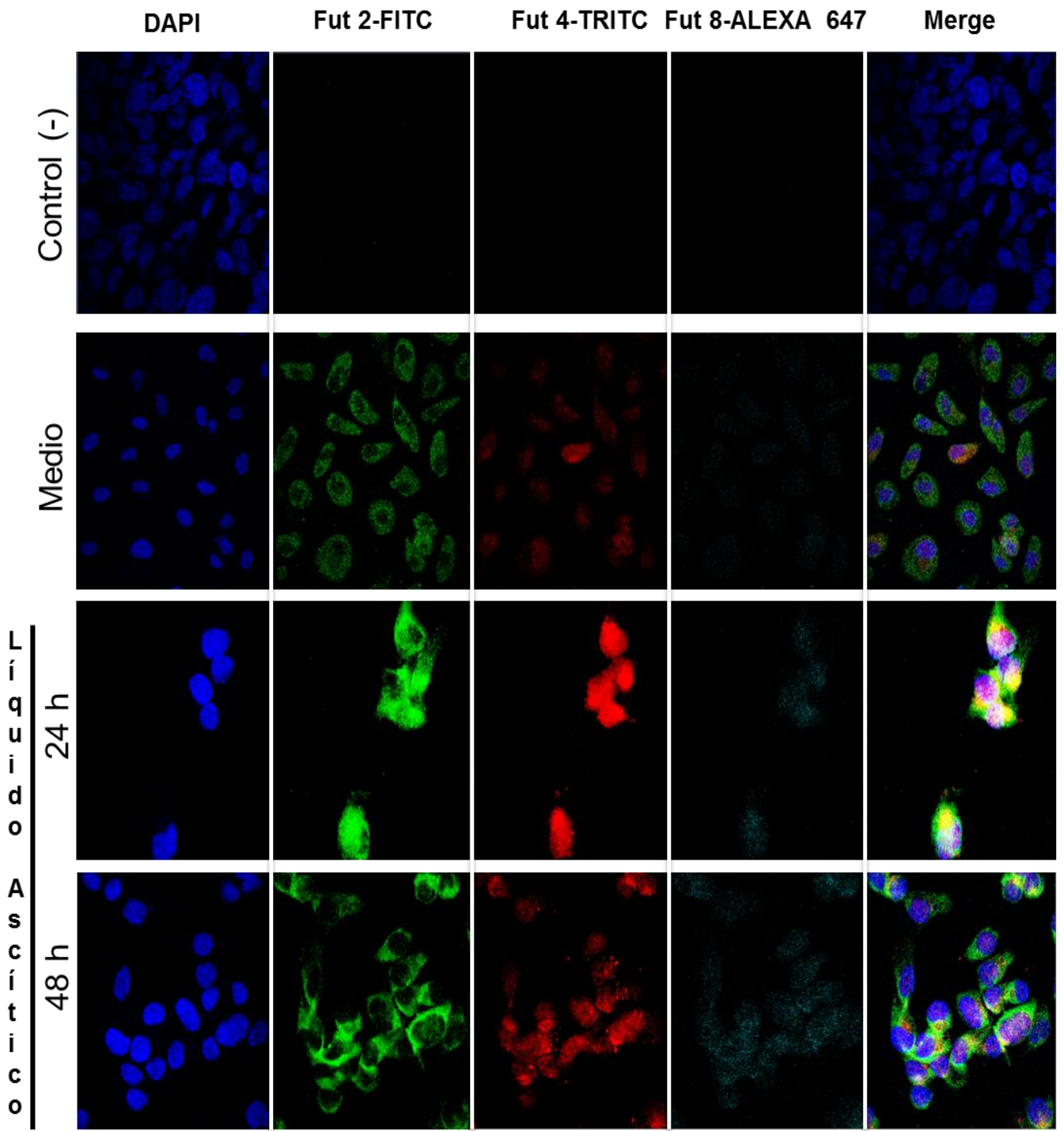
Los resultados de las inmunofluorescencias sugieren que existe una expresión basal de Fut 2, 4 y 8 en las células sembradas en medio de cultivo a las 48 h de incubación. Observándose la mayor intensidad de fluorescencia para Fut 2 (Fig. 6A). Las células incubadas en LA por 24 h, expresan mayormente a Fut 4 que a Fut 2 y 8, comparándola con la condición control. La marca observada para Fut 4 no solo se observa en zonas perinucleares, estructuras citoplasmáticas y en la membrana celular, como es el caso de Fut 2 y 8, sino que también se observa colocalizando con el núcleo (Fig. 6A). A las 48 h se observa que Fut 2 y 4 disminuyen, pero Fut 8 incrementa su señal comparada con las dos condiciones anteriores. Sin embargo, en esta condición, Fut 4 se logra observar en pequeñas vesículas citoplasmáticas. En varios campos se observan colocalizando a la tres Fucosiltransferasas, resaltando la colocalización entre Fut 2 y 4 (Fig. 6A). Con el análisis de intensidad de pixeles de fluorescencia, se corroboró el aumento o disminución de cada Fucosiltransferasa (Fig. 6B).

Es importante mencionar que durante el análisis de las imágenes se observaron campos con una morfología celular homogénea de las células SKOV-3 para la condición de 24 h y campos con morfología alterada para la condición de 48 h. Estos resultados sugieren que en la condición de incubación con el LA código 151910 los cultivos mostraron problemas de adaptación a las 48 h, lo cual les generaba un cambio morfológico distinto a

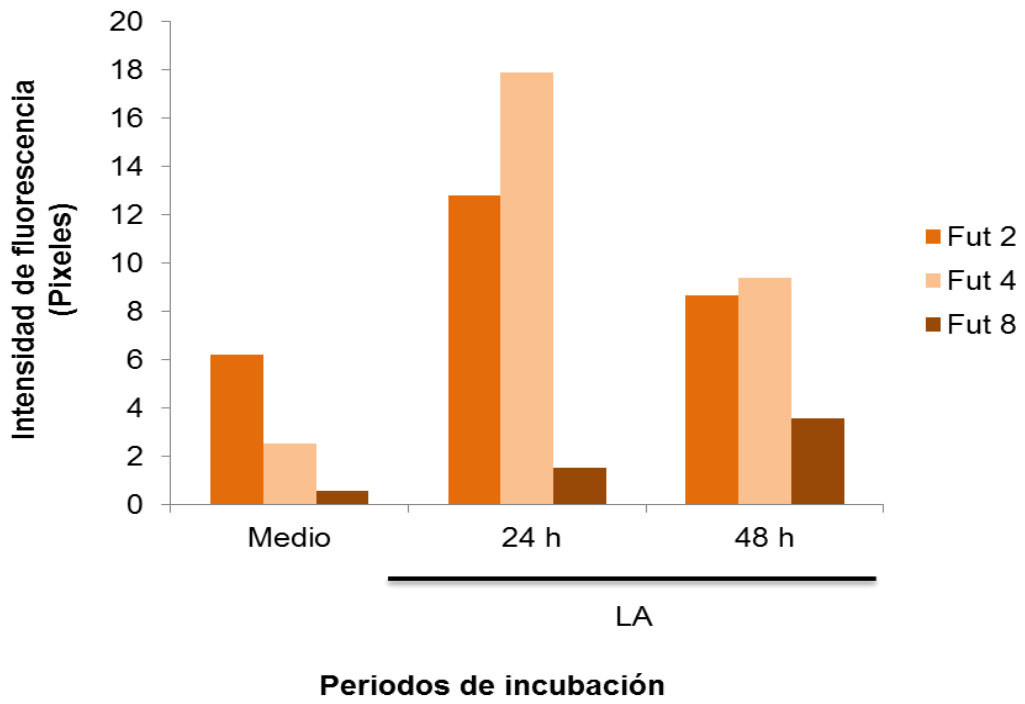
la condición de 24 h. En la Figura 6C se muestran imágenes representativas de estas condiciones (24 y 48 h en LA), resaltando que a las 24 h las células conservan su morfología alargada, prolongaciones membranales, y mismos sitios de localización para cada Fucosiltransferas. En la condición de 48 h, sugerimos que las células presentan un tipo de daño, no obstante desconocemos si sea causado por efecto del LA. Adicional a estos hallazgos, se observó la presencia de Fut 2 y Fut 8 de forma citoplasmática y perinuclear, con una expresión más abundante para Fut 8, y a Fut 4 dentro de pequeñas vesículas (Fig. 6C).

Para corroborar la colocación de Fut 4 en el núcleo, se realizó un análisis de CROP/ORTHO, de una célula capturada de la condición de 24 h. El CROP permitió realizar un aumento óptico de la zona seleccionada y el ORTHO nos permite analizar la imagen en tres dimensiones del plano óptico X, Y y Z. Este análisis sugiere que efectivamente Fut 4 se encuentra dentro del núcleo, ya que se observó que la Fut 4 revelada con el anticuerpo acoplado a TRITC se encontraba intercalado con el núcleo marcado con DAPI en todos los planos ópticos analizados (Fig. 6D). En la figura 6E se muestra una gráfica con la intensidad de fluorescencia reportada en unidades de pixeles.

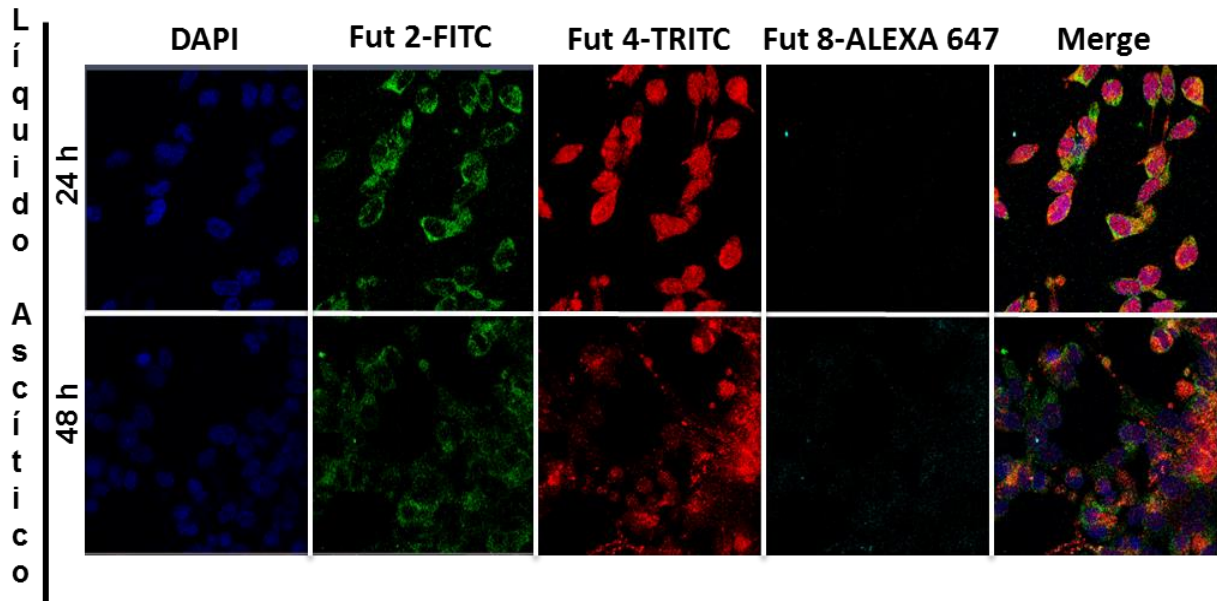
A



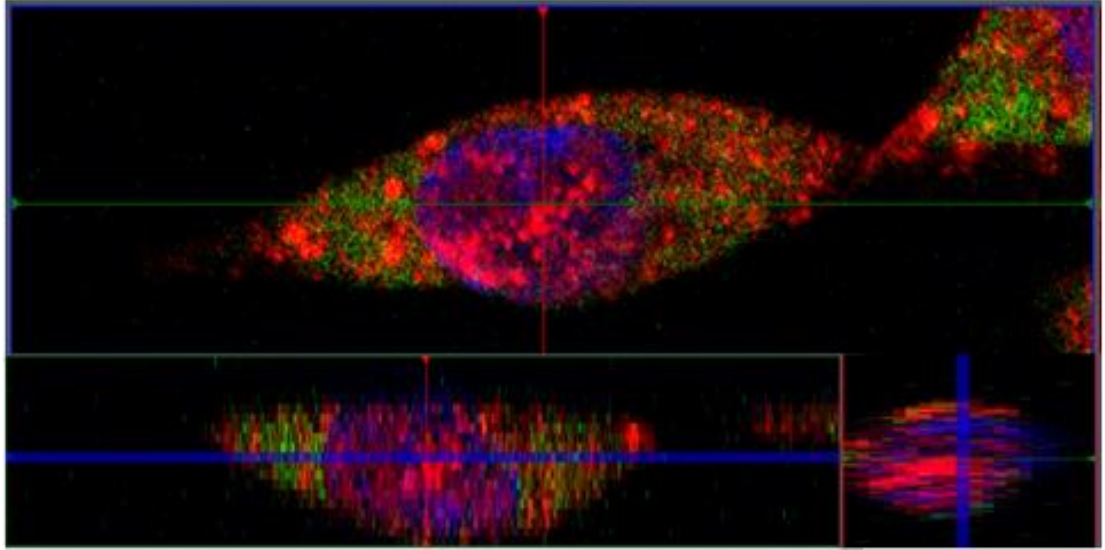
B



C



D



E

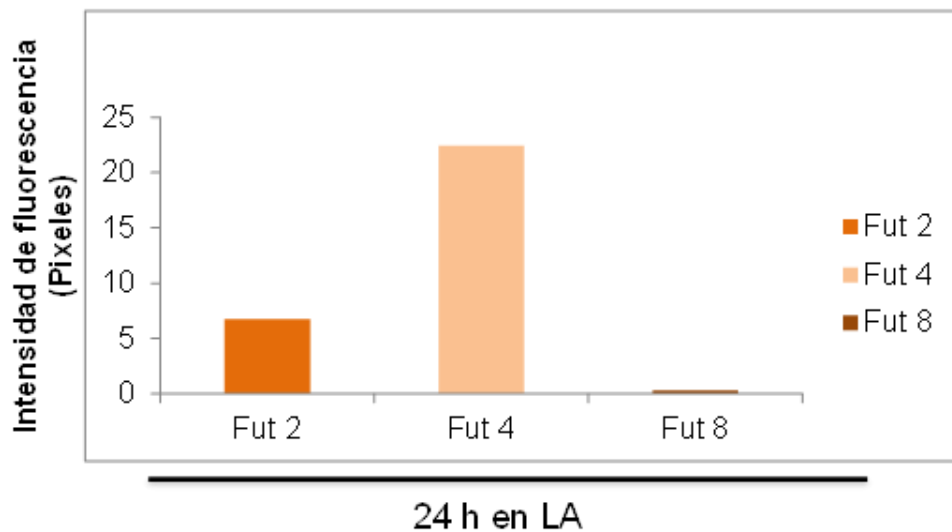


Figura 6. Localización subcelular de las Fucosiltransferasas 2, 4 y 8 en células SKOV-3.

Imágenes representativas del patrón diferencial de las Fucosiltransferasas en células SKOV-3 obtenidas por microscopía confocal, a un aumento de 40X. Se detectó a los núcleos marcados con DAPI (Azul), a Fut 2 con FITC (Verde), a Fut 4 con TRITC (Rojo) y a Fut 8 con ALEXA 647 (Cian) (A). En B se representa el análisis de intensidad de fluorescencia reportado en unidad de píxeles. Imágenes adicionales de inmunofluorescencia de las condiciones de 24 y 48 h de incubación en LA (C). Aplicación de la función CROP/ORTHO de un campo representativo de 24 h (D). La intensidad de fluorescencia se reportó en unidad de píxeles proveniente del análisis CROP/ORTHO (E).

El análisis comparativo del efecto de diferentes LA no influye en la localización subcelular de las Fucosiltransferasas en células SKOV-3.

Para analizar el efecto de diferentes líquidos ascíticos sobre las células SKOV-3 se emplearon cultivos que fueron incubados en dos líquidos ascíticos con código 152433 y 151737, y como condición control se emplearon cultivos celulares que se incubaron en medio suplementado. Todas las condiciones fueron expuestas a 24 y 48 h de las cuales se presenta el registro fotográfico digitalizado y capturado utilizando un microscopio de luz.

Los resultados (Fig. 7A) indican que las células incubadas en medio por 24 y 48 h no mostraron cambios morfológicos, solo se observaban a la células creciendo en monocapas. En el caso de las células incubadas por 24 h en los líquidos ascíticos, presentaron un elevado dinamismo, así como largas prolongaciones membranales y un reducido contenido citoplasmático, con aspecto fusiforme. Con respecto a los cultivos incubados por 48 h se observó una contaminación bacteriana, evidente únicamente en este período de incubación. Se considera que la contaminación fue error en la manipulación de las cajas Petri y no así del LA, ya que los líquidos ascíticos se procesan bajo condiciones de esterilidad. En el cultivo incubado con el LA 152433 se observaban células flotando en el sobrenadante, lo cual condujo a una reducción en el número total de células. En comparación con las células incubadas en el líquido 151737. Pero en ambos casos, la morfología de las células adheridas sobre la superficie mostraron un efecto citopático, esto debido a la cantidad de material bacteriano presente en los cultivos celulares (Fig. 7A).

En el análisis de microscopia confocal, en el caso de Fut 2, para ambos LA, indicaron (Fig. 7B) que la enzima presentó una distribución perinuclear, en la membrana plasmática y difusa sobre todo el citoplasma. Esta distribución no se modificó durante los periodos de incubación, sin embargo la intensidad de fluorescencia sí presentó cambios. A las 24 horas de incubación en medio, se observó su expresión en niveles basales, pero a 48 h, ésta se incrementó, lo cual se observó de igual manera en las células incubadas con el LA 152433. Cuando se analizó la condición de las células incubadas con el LA 151737, el tiempo de 24 h, mostró el mayor índice de intensidad de fluorescencia para Fut 2 en todos los tiempos y condiciones de incubación.

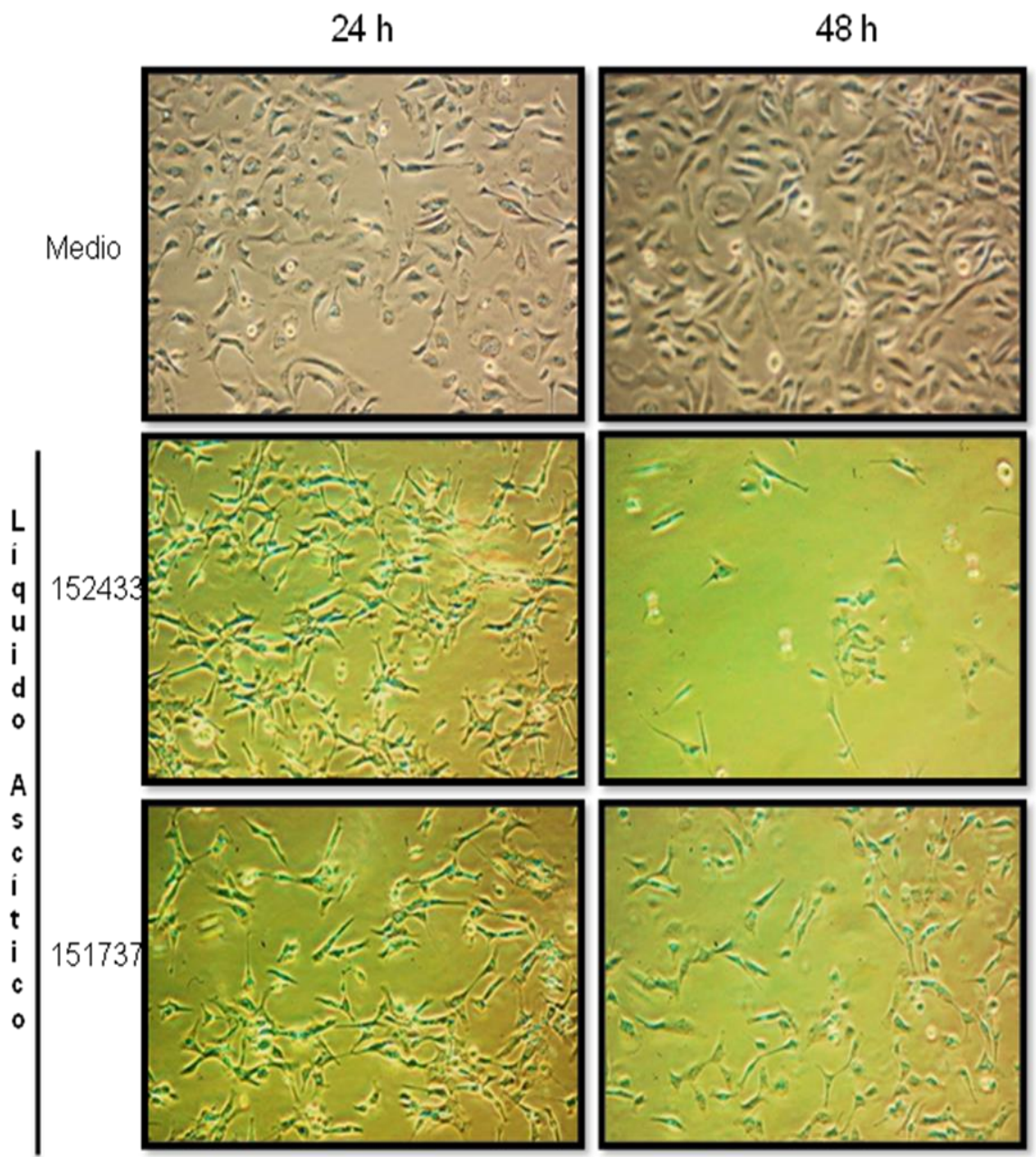
Por otra parte, en la figura 7B se observó a Fut 4 colocalizando con el núcleo, así como dentro de pequeñas vesículas localizadas en el citoplasma de las células. Estos resultados ya habían sido observados en los experimentos de localización subcelular utilizando el LA 1910 (Fig. 6) Fut 4, es la Fucosiltransferasa que más se expresa en las condición control, sin embargo, su mayor intensidad de fluorescencia se da a las 24 h de incubación con el LA 151737, no obstante, posterior a este tiempo, la enzima presento una caída de la expresión en todas las condiciones de incubación de 48 h (Medio, LA 152433 y LA 151737).

En el caso de Fut 8, en todas las condiciones de 24 h, se observó de forma difusa una escasa expresión en el citoplasma. Sin embargo en los cultivos celulares incubados por 48 h con los LA, la intensidad de fluorescencia se incrementa notablemente siendo más acentuado este incremento con el LA 151737. Es importante resaltar que las células control de 48 h no presentaron indicios de contaminación, pero tampoco presentaron la sobre expresión de Fut 8 como en las condiciones anteriores de 48 h. Por lo cual se sugiere que la condición de contaminación, generó un microambiente que indujo la expresión de Fut 8, y no así la de Fut 2 y 4 (Fig. 7B).

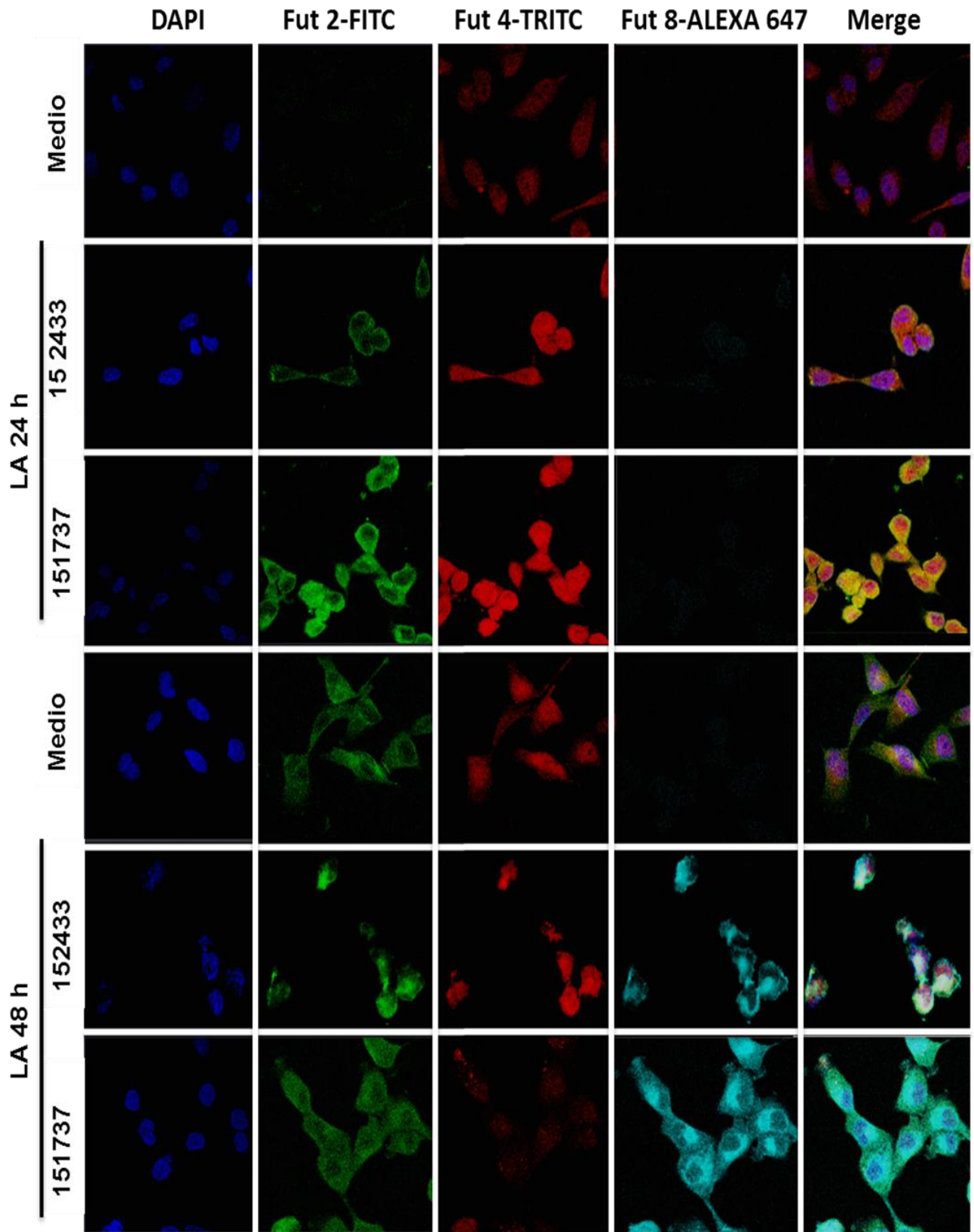
Estos resultados corroboran que la localización subcelular de las tres Fucosiltransferasas expuestas a diferentes LA no se modifica. Sin embargo

los tiempos de exposición de las células al LA sí están generando cambios en los patrones de intensidad de fluorescencia. Estos resultados validan lo antes observado con el LA 1910 para Fut 2 y 4. Pero no así para Fut 8, donde la única diferencia en los experimentos realizados radicó en la contaminación que se reportó en los cultivos incubados con los LA 152433 y 151737 en el tiempo de 48 h. Por lo cual se sugiere que la condición de contaminación, genero un microambiente que indujo la expresión de Fut 8, y no así la de Fut 2 y 4 (Fig. 7B). Con el fin de realizar un análisis semi-cuantitativo de los niveles de expresión de las tres Fucosiltransferasas analizadas a nivel de proteína, se realizaron análisis de intensidad de fluorescencia reportando los resultados en unidad de pixeles (Fig. 7C).

A



B



C

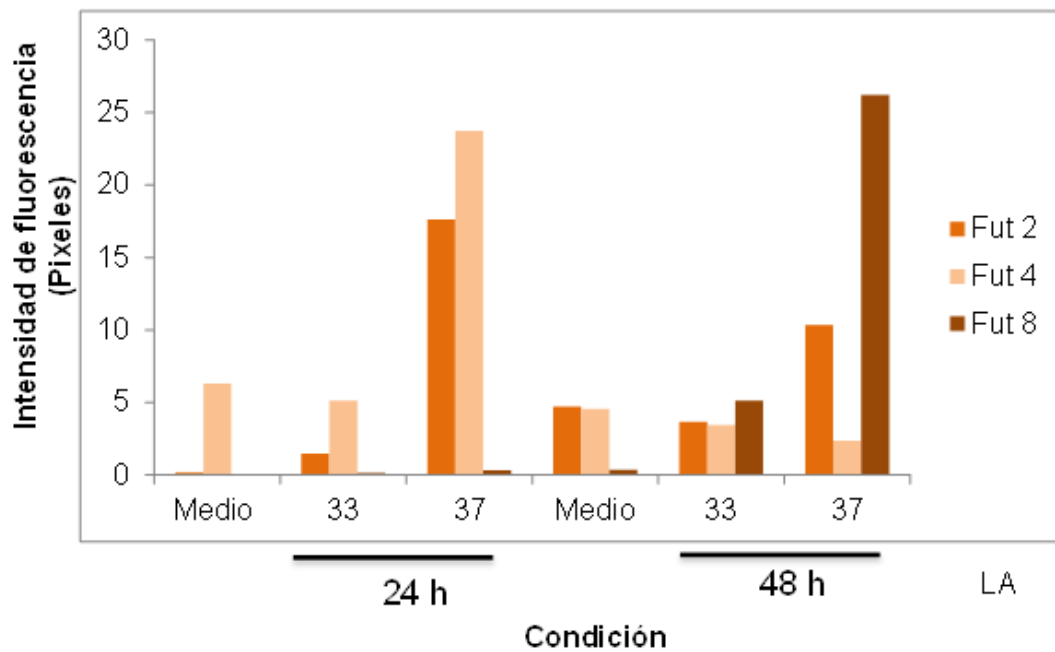


Figura 7. Análisis comparativo del efecto de distintos LA sobre la expresión de Fut 2, 4 y 8 en células SKOV-3. Descripción morfológica de células SKOV-3 bajo el estímulo con dos LA con código 152433 y 151737 y en medio suplementado incubados por 24 y 48 h, observadas por microscopía óptica por la técnica de contraste de fases en un objetivo 10X (A). Imágenes representativas de la expresión diferencial de las Fucosiltransferasas obtenidas por microscopía confocal donde los núcleos se detectaron con DAPI (Azul), a Fut 2 con FITC (Verde), a Fut 4 con TRITC (Rojo) y Fut 8 con ALEXA 647 (Cian) (A) con un aumento de 40 x (B). En C se registró el análisis de intensidad de fluorescencia reportado en unidad de píxeles.

¿Las condiciones de estrés modulan la expresión de las Fucosiltransferasas?

Considerando que la sobre expresión de Fut 8 en las células SKOV-3 podría deberse al microambiente bacteriano, se decidió realizar un experimento donde se expusieron a las células a diferentes estímulos. Las condiciones empleadas fueron, células SKOV-3 incubadas en medio, medio-LPS (1 mg/ml), LA, LA-LPS (1 µg/ml), LA-Carboplatino (150 µg/ml) y LA-Choque térmico (42 °C). Se realizó un registro fotográfico digitalizado por microcopia de luz. Los registros se realizaron a los tiempos de 24 h y 48 h para darle seguimiento a las células durante los períodos de incubación, pero para el análisis por microscopía confocal, todos los cultivos celulares se procesaron a las 48 h.

En la Figura 8A, se observó que en la condición de medio y medio LPS, en los tiempos analizados, no se generaron cambios en la morfología de las células. Las células incubadas en LA y LA- LPS muestran las mismas estructuras reportadas anteriormente (Fig. 6) y se sugiere que el LPS no genera daño celular en ninguna de las condiciones analizadas.

Sin embargo las células incubadas por 48 h con LA-Carboplatino mostraron sensibilidad a la concentración administrada del medicamento, observando redondeamiento celular, con aspecto refringente y células flotando en el sobrenadante, disminuyendo así el número de células adheridas. Este evento también se observó para las células expuestas a LA-Choque térmico, excepto por la drástica pérdida de células (Fig. 8A)

Con la finalidad de analizar los niveles de expresión en estas condiciones se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Los resultados se observan en la Figura 8B. En las células SKOV-3 tratadas bajo diferentes condiciones de estrés, se muestra que la distribución subcelular de las Fucosiltransferasas no se modifica y que en estas condiciones no se estimuló la sobre expresión de Fut 8. Sin embargo, en el medio-LPS, LA y LA-LPS, se observó una

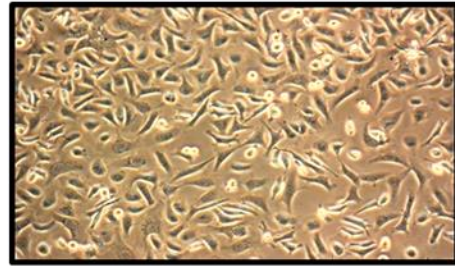
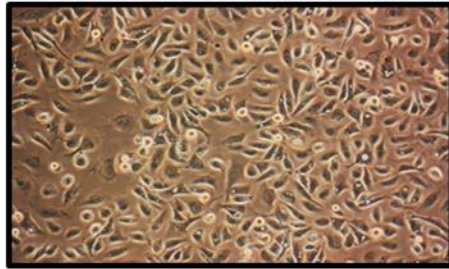
expresión moderada la cual fue más evidente en comparación con el resto de los estímulos empleados. En la condición de incubación con Carboplatino y choque térmico se observó que la expresión de Fut 8 es nula comparada con el control, pero la expresión de Fut 4 se mantiene sostenida comparada con las otras condiciones de estrés y su localización en vesículas citoplasmáticas es más evidente (Fig. 8B). Con respecto a Fut 2, se logró determinar que en estas condiciones su expresión se mantiene de forma constitutiva, excepto en la condición de LA-LPS. Los datos se semi-cuantificaron a través de un análisis densitométrico de intensidad de fluorescencia representado en unidades de pixeles (8C).

A

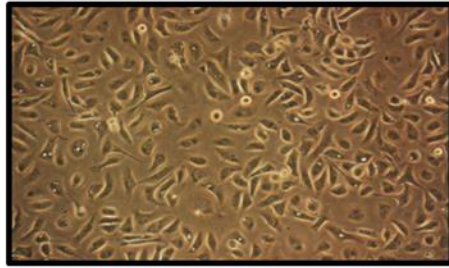
24 h

48 h

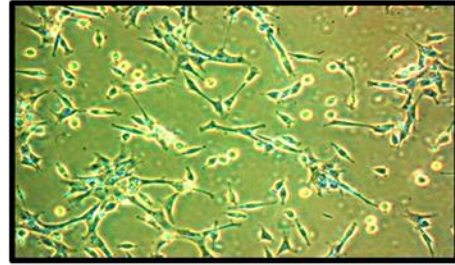
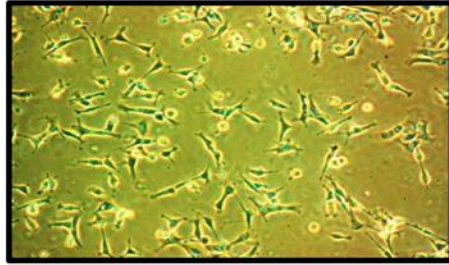
Medio



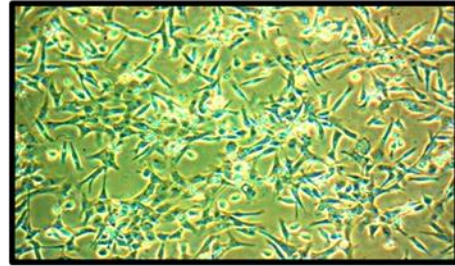
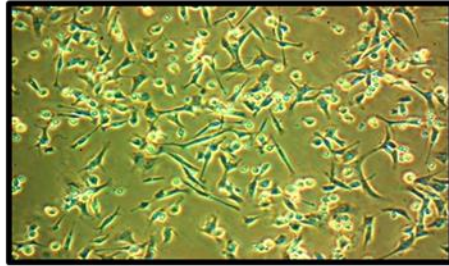
Medio
LPS 1µg/ml



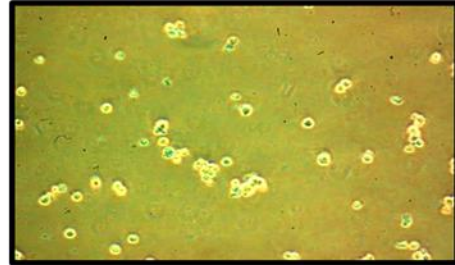
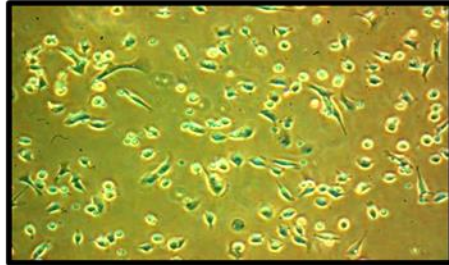
1910



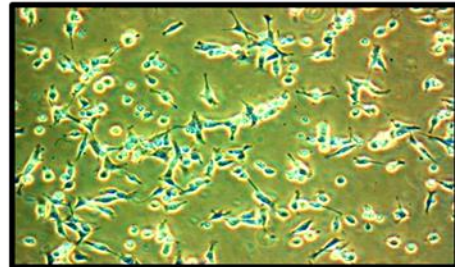
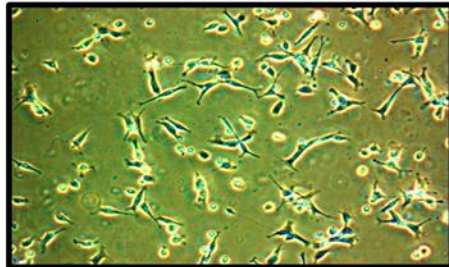
LPS
1 µl/ml



Carboplatino
150 µg/ml



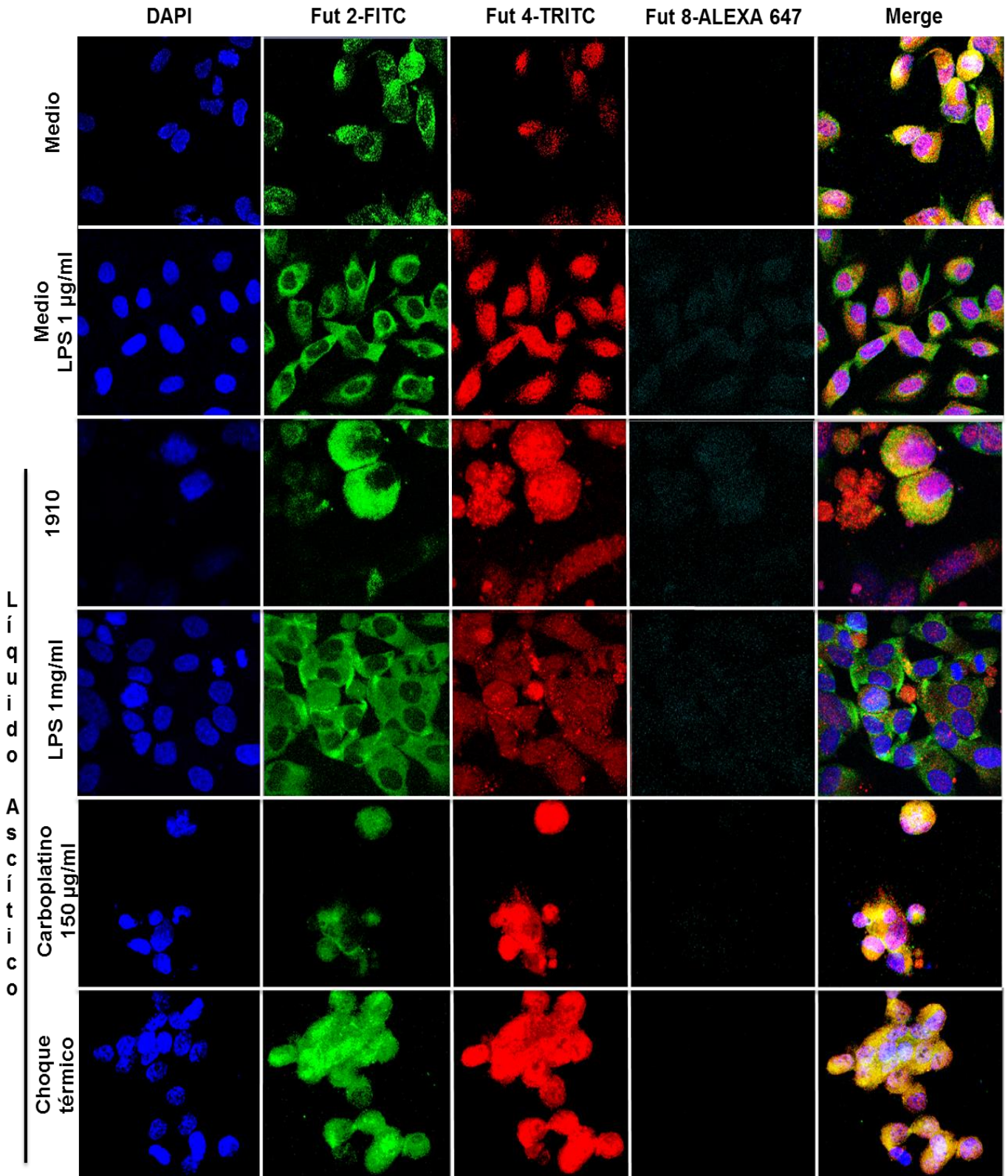
Choque
térmico



L
í
q
u
í
d
o

A
s
c
í
t
i
c
o

B



C

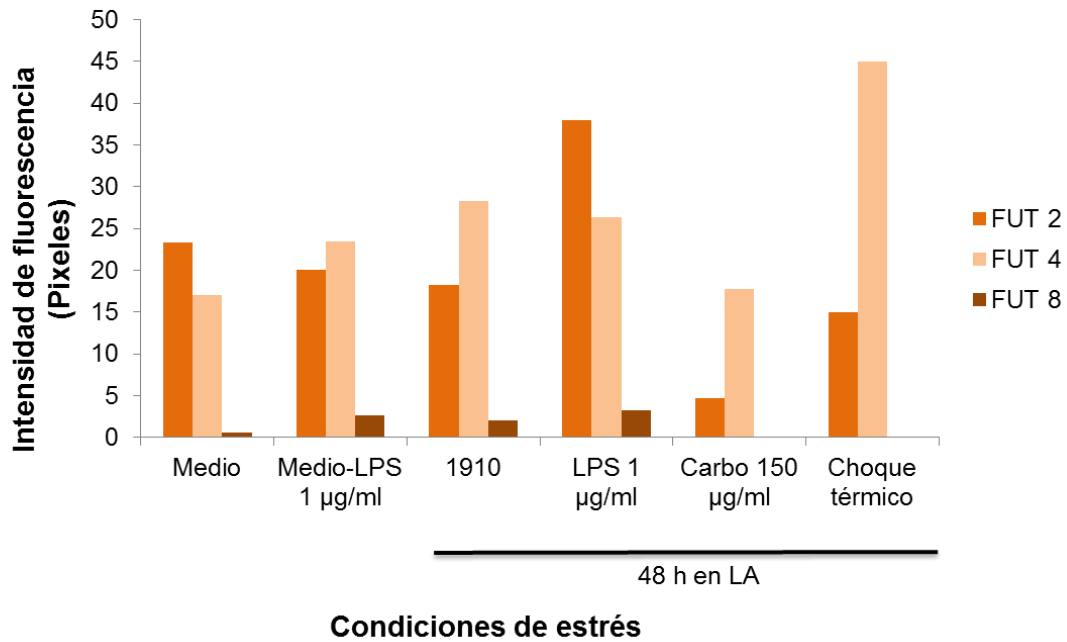


Figura 8. Niveles de expresión de las Fut 2, 4 y 8 en células SKOV-3 expuestas a diferentes condiciones de estrés. Descripción morfológica de células SKOV-3 bajo diferentes microambientes a 24 y 48 h de incubación, observadas por microscopía óptica por la técnica de contraste de fases en un objetivo 10X (A). Imágenes representativas de la expresión diferencial de las Fucosiltransferasas obtenidas por microscopía confocal donde los núcleos se detectaron con DAPI (Azul), a Fut 2 con FITC (Verde), a Fut 4 con TRITC (Rojo) y Fut 8 con ALEXA 647 (Cian) (A) con un aumento de 40 x (B). En C se registró el análisis de intensidad de fluorescencia reportado en unidad de pixeles.

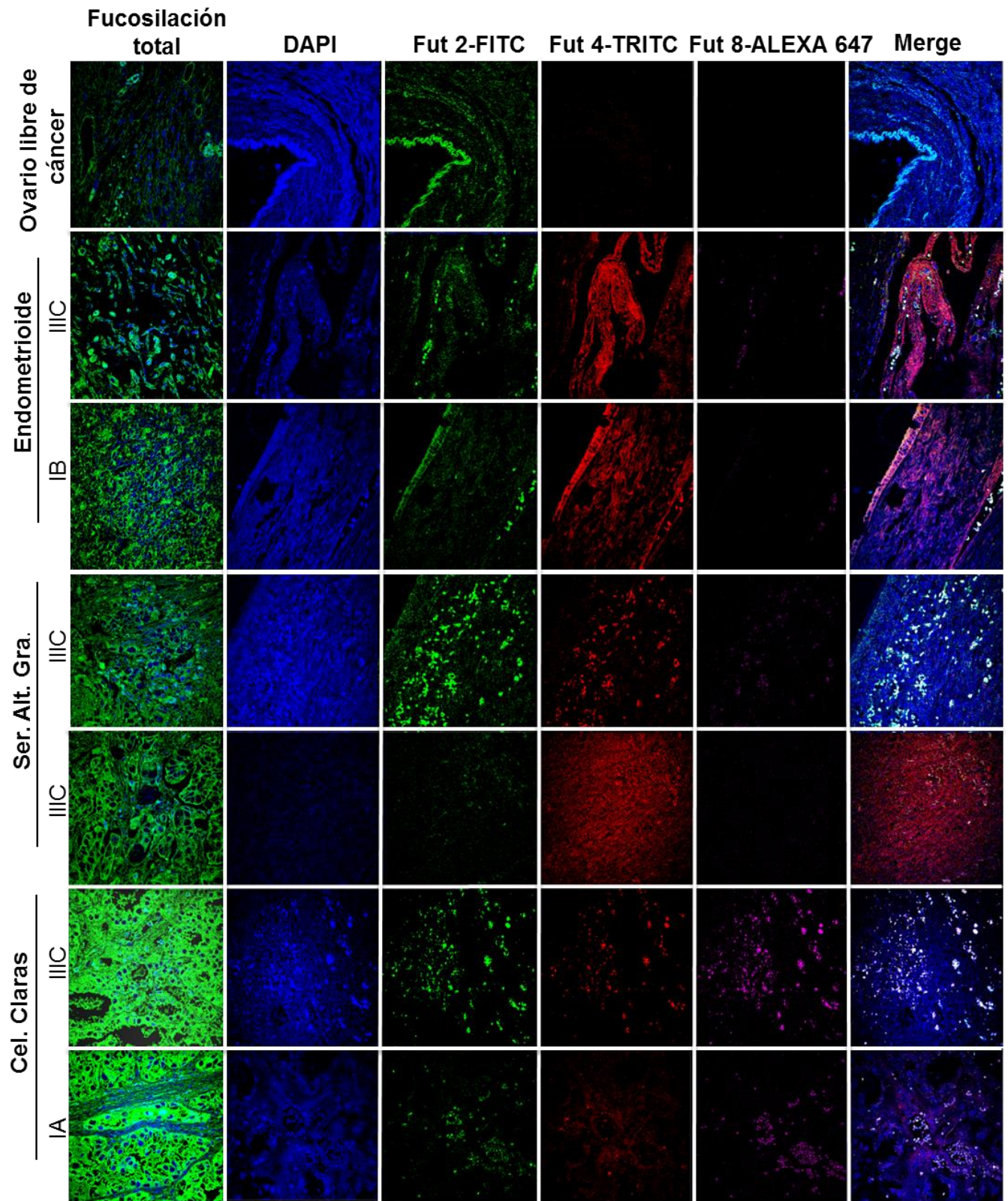
Niveles de expresión de fucosilación total y Fucosiltransferasas en los diferentes histotipos del CEO.

Se realizó un análisis serial de 20 cortes de tejido tumoral de pacientes con diferentes histotipos de CEO. En este estudio, se incluyó material analizado previamente con la lectina AA. En la Figura 9A, en la primera columna se muestra una imagen representativa del perfil de proteínas totales fucosiladas, presentes en cada histotipo reportadas por Villegas Pineda en el 2012. En las siguientes columnas se analizó la presencia de las Fucosiltransferasas tanto en tejido de ovario libre de cancer como en los diferentes histotipos del CEO en distinta etapas clínicas de la enfermedad. Los resultados muestran que la fucosilación total en el tejido libre de cáncer se encuentra sobre expresada, comparada con el patrón del tejido libre de cáncer. Estos resultados sugieren que la fucosilación basal puede estar siendo modulada por Fut 2 y no así por Fut 4 y 8, ya que Fut 2 se localiza dentro de los folículos, así como alrededor de los bordes del epitelio y su expresión es superior comparada con la encontrada para Fut 4 y Fut 8 en tejido sano. Es importante resaltar que se vuelve a presentar un patrón diferencial y difuso de la expresión de Fut 2, 4 y 8, en la superficie del tejido tumoral y en algunas áreas se encuentran zonas de colocalización. Sin embargo, la expresión de Fut 8 se encontró incrementada solo en los cortes tumorales que provienen del histotipo de células claras (Fig. 9A).

En la Figura 9B se muestra una imagen representativa de la expresión diferencial de los niveles proteicos de las Fucosiltransferasas 2, 4 y 8 tanto en tejido de ovario libre e cáncer como en los diferente histotipos que componen el CEO. En los "Tile Scan" analizados, observamos que las células de ovario libre de cáncer expresan niveles basales de Fut 2 dentro de los folículos y en las células que componen el epitelio del ovario, sin embargo la señal obtenida para Fut 4 y 8 era casi inexistente. En los cortes de tejido tumoral observamos que la expresión de Fut 4 y 8 se incrementa, y la distribución de las tres Futs se encuentra distribuida de manera difusa y heterogénea, pero

existen campos donde se observan colocalizando en puntos específicos del tejido. La expresión diferencial Fut 4 y 8 en tejido tumoral y no así en el tejido sano, indica fuertemente que Fut 4 y 8 están jugando un papel importante en la patogenia del cáncer de ovario, por lo que resultaría muy interesante estudiar estas moléculas como posibles blancos terapéuticos (Fig. 9B).

A



B

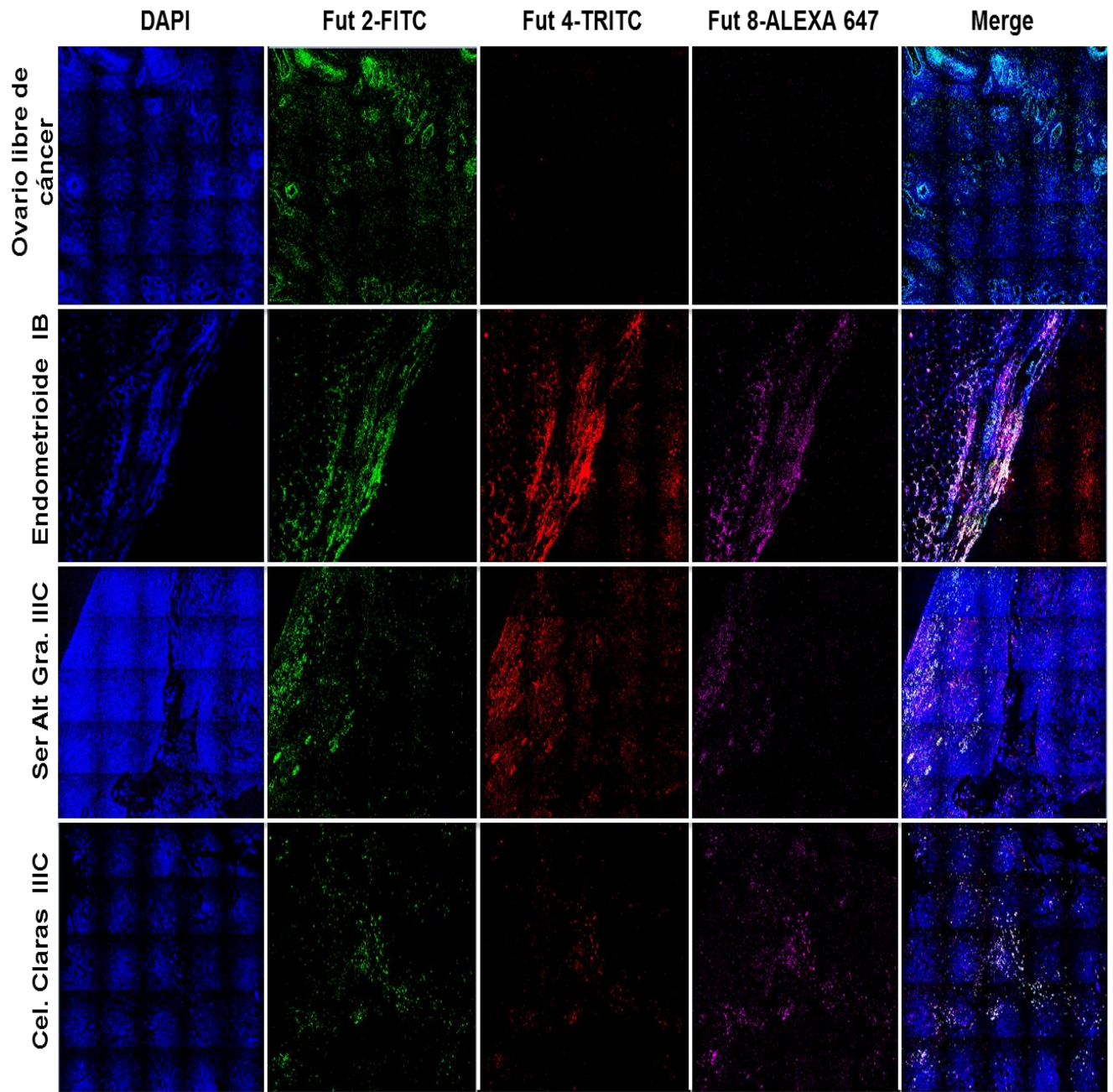


Figura 9. Análisis de la expresión diferencial de Fut 2, 4 y 8 y niveles de expresión de la fucosilación total de reportes previos en cortes seriados de tejido tumoral de pacientes con CEO. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal en un aumento de 40x. Análisis mostrado por campo (A) y por “Tile Scan” (B). Se detectó a los núcleos marcados con DAPI (Azul), a Fut 2 con FITC (Verde), a Fut 4 con TRITC (Rojo) y Fut 8 con ALEXA 647 (Cian) (A). Los datos mostrados se apoyaron de un análisis de intensidad de fluorescencia reportado en unidad de pixeles (Tabla 2).

XIV. TABLAS DE RESULTADOS

Tabla 1. Oligos diseñados para los diferentes genes de las Fucosiltransferasas 1-11 y de GAPDH

GENE FUT's	SENTIDO 5'-----3'	ANTISENTIDO 3'-----5'
GAPDH (395pb)	GTCCAGTGGTGGACCTGACCT	AGGGGAGATTTCAGTGTGGTG
FUT 1 (442pb)	TGGCCTTCCTGCTAGTCTGT	CTCAAGTCCGCGTACTCCTC
FUT 2 (483pb)	GGGAGTTACCGGTGCAGATA	CATGGACCCCTACAAAGGTG
FUT3 (521 pb)	CCTCCCGACAGGACCACTCC	GCGTCCGTACACGTCCACCTTG
FUT 4 (516 pb)	GAGAGGCTCAGGCCGTGCTTTT	GCAGGAGCCCAATTTGGGGCAC
FUT 5 (555 pb)	GAACCTGTCACCGGGGCTCCC	GCGTCCGTACACGTCCACCTTG
FUT 6 (534pb)	AATGGGTCCCCTTCCCAGACAG	GCGTCCGTACACGTCCACCTTG
FUT 7 (497 pb)	CACCTCCGAGGCATCTTCAACTG	CGTTGGTATCGGCTCTCATTTCATG
FUT8 (539pb)	CAGCGAACACTCATCTTGGA	TCCTTCCAATTTCTGTGG
FUT 9 (804pb)	GGGCAGACCTTTGACCTTACAT	CTTTTCACATGATCGCAAGC
FUT 10 (681pb)	CGAAACAAAGACCTCCTCA	GCCCCAAAACCTTTGAGATG
FUT 11 (650pb)	CTGCTCTTCTACGGCACAGA	AACTCTGCCAGCTTCTGAGG

Los oligos para FUT 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 11 fueron tomados de Escrevente *et al.*, 2006. FUT 1, 2, 8 y GAPDH fueron diseñados utilizando el software primer3.

Tabla 2. Expresión de las Fucosiltransferasas en cortes de tejido tumoral de pacientes con cáncer epitelial de ovario.

I. Datos del análisis por campo

Histotipo	Etapa clínica	Fucosilación total	Fucosiltransferasa		
			Fut 2	Fut 4	Fut 8
Endometrioide	IIIC	1.26	5.69	17.28	0.60
Endometrioide	IB	18.98	4.97	14.35	0.18
Ser. Pap. Alt.	IIIC	29.45	27.03	9.03	1.09
Ser. Pap. Alt.	IIIC	22.00	2.14	26.45	0.42
Cel. claras	IIIC	69.59	6.56	3.03	5.58
Cel. claras	IA	88.81	1.68	3.25	1.43
Tejido de ovario libre de cáncer	N/A	4.30	10.14	0.21	0.02

II. Datos del análisis en “Tile Scan”

Endometrioide	IB	0.39	2.77	3.17	1.27
Ser Alt. Gra.	IIIC	29.46	3.12	3.8	0.59
Cel. claras	IIIC	69.59	1.37	0.59	1.68

N/A: No aplica

XV. DISCUSIÓN

Considerando que el líquido ascítico contiene componentes como factores de crecimiento y citosinas pro-inflamatorias, se cree que éste podría influir en los procesos de regulación del microambiente que rodea a las células tumorales, ya que se relaciona con estadios avanzados del cáncer de ovario [54]. La glicosilación de proteínas es una modificación pos-traducciona involucrada en procesos biológicos esenciales y en cáncer, la síntesis de glicanos aberrantes se relaciona con la formación de tumores y su progresión metastásica [58]. Estas alteraciones son generadas por la expresión descontrolada de enzimas responsables de la biosíntesis errónea de estructuras de glicanos [19].

Dado que actualmente no se cuenta con un método eficaz capaz de detectar el CEO, el presente trabajo se enfocó en la caracterización de los patrones de expresión de las enzimas Fucosiltransferasas, ya que en otras patologías se propone que estas proteínas podrían ser importantes como moléculas útiles para establecer un diagnóstico y pronóstico específico [44] [59].

Los resultados sugieren fuertemente que el LA genera rearrreglos en el citoesqueleto de las células, favoreciendo el desplazamiento de las células SKOV-3. Reportes recientes indican que abundantes carbohidratos, sintetizados por las Fucosiltransferasas, fueron detectados en múltiples proyecciones de la superficie celular que se encontraron asociados a procesos de adhesión que ocurren durante la metástasis, actuando como ligandos para P y E-selectina [47].

El análisis realizado con respecto a las comparaciones entre los LA mostró heterogeneidad entre los mismos, quizá debido, entre otras causas, a las diferencias genéticas entre las pacientes, lo cual da lugar a distintas respuestas adaptativas en los cultivos celulares *in vitro*. Esto puede deberse al proceso inflamatorio, donde la importancia de diferentes mediadores de la

inflamación se refleja en el incremento de niveles séricos de citocinas proinflamatorias, entre las que destacan el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 (IL-1), e Interleucina 6 (IL-6), así como la generación importante de estrés oxidativo y la formación de radicales libres que pueden dañar estructuras celulares y amplificar la respuesta inflamatoria tanto a nivel local como sistémico [60]. Siendo los cambios genéticos manifestaciones tardías del proceso inflamatorio sostenido [61], podrían generar una influencia distintiva en la expresión de los genes que codifican a las diferentes Fucosiltransferasas.

Los niveles de mRNA de los genes que codifican estas enzimas demuestran que las células SKOV-3 expuestas a LA por 24 h expresan niveles incrementados de los genes FUT 1, 2, 4, 5, 7, y 8, mientras que las células expuestas en LA por 48 h incrementan los patrones de expresión para los genes FUT 3, 6 y 9, así como también existen genes que sufren una regulación negativa como el gen FUT 10. Es importante resaltar que en las condiciones establecidas, se logró detectar el mRNA de Fut 7, ya que en otros estudios no se había logrado obtener su amplificado. Sin embargo la traducción de este gen deberá ser corroborada. Reportes de Escrevente *et.al.*, en el 2006, reporta el patrón de expresión de los genes FUT en distintas líneas celulares de cáncer de ovario incubadas en medio de cultivo. Sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios de la regulación de estos genes en presencia de LA.

Evaluando los niveles proteicos de Fut 2, 4 y 8 en célula SKOV-3 se corroboró la influencia del LA sobre la regulación de los niveles de expresión de estas enzimas, reportando que la expresión máxima de estas proteínas es a tiempos tempranos. De acuerdo a los datos obtenidos por PCR, se sugiere que existen otras Fucosiltransferasas que se expresan en tiempos tardíos, las cuales podrían estar sosteniendo la fucosilación total, ya que este evento se incrementa en función al tiempo de exposición al LA en células SKOV-3.

A pesar de que los procesos de regulación de las Fucosiltransferasas no están bien descritos, existen reportes que argumentan específicamente que FUT 4 está siendo regulado por varios factores de transcripción como el HSF1 y el SP1, donde HSF1 responde a procesos de choque térmico y otros factores de estrés, los cuales contribuyen a la proliferación celular y desarrollo tumoral [62]. En el presente trabajo se reportó una expresión sostenida de Fut 4 a tiempo tardíos en condiciones de estrés y choque térmico, lo cual se podría correlacionar con la regulación positiva que ejerce el factor HSF1 sobre Fut 4.

Estudios previos demostraron que la expresión del factor de transcripción HIF-1 α disminuye la expresión de Fut 2 y cuando HIF-1 α se encuentra ausente, los niveles de Fut 2 se incrementan en células de pancreatitis aguda [48]. Desconocemos si la confluencia alcanzada en los cultivos celulares empleados para PCR y WB, estén generando un microambiente favorable para la expresión de HIF-1 α en los tiempos tardíos y por ello observemos una disminución en la expresión de Fut 2 a las 48 h de exposición. Ensayos que estén diseñados para inducir condiciones de hipoxia serían necesarios para relacionar este efecto con la regulación en la expresión de Fut 2 en condiciones *in vitro*.

Datos publicados reportan que la fucosilación es uno de los tipos más importantes de glicosilación en el cáncer y en la inflamación [63]. Se ha correlacionado la presencia de *H. pylori* con procesos de carcinomas gástricos y procesos de inflamación gastrointestinales [64]. La presencia de estas entidades despierta varias respuestas inmunológicas, como la activación de células T y se sabe que el receptor TCR depende de la fucosilación central para desencadenar vías de señalización. Este tipo de fucosilación solo es catalizado por la enzima Fut 8 [51]. En este trabajo se encontró que en presencia de contaminación bacteriana en los cultivos SKOV-3 incubados con los LA 152433 y 151737 se sobre expresó Fut 8 a las 48 h, evento que solo se detectó bajo estas condiciones. Por lo tanto

sugerimos que los componentes bacterianos influyen en la regulación de la expresión de Fut 8. Sin embargo los análisis con LPS en las condiciones utilizadas no fueron concluyentes por lo que se sugiere realizar ensayos con dosis más elevadas y así como también probar otros componentes bacterianos.

La localización subcelular de las Fut 2, 4 y 8 se muestra en zonas perinucleares y difusas en el citoplasma, pero en el caso de Fut 4 también se observó colocalizando con el núcleo y en vesículas citoplasmáticas.

La localización subcelular de las Fucosiltransferasas no se modificó tras la exposición a distintos microambientes, pero si se reportan cambios en la intensidad de fluorescencia. Esto debido a que los genes que codifican para cada Fucosiltransferasa se regulan de manera independiente.

Reportes previos mostraron patrones de distribución de Fut 4 en membrana plasmática y en el aparato de Golgi [65]. Nuestros resultados confirman la presencia de la enzima en la membrana celular y observamos su localización en estructuras vesiculares. Un dato relevante de estos resultados fue la translocación de Fut 4 hacia el núcleo. Datos de los cuales no se tienen reportes previos. Estrategias experimentales dirigidas a establecer la posible asociación entre material nuclear y la proteína Fut 4 podrían corroborar los hallazgos encontrados en el presente trabajo.

Se ha reportado que Fut 2 y 8 son proteínas que poseen secuencias de secreción y localización en el aparato de Golgi [66] [67]. Adicional a estos reportes se indica que Fut 2 se encuentra dentro de exosomas [66]. Por lo que a este trabajo respecta, la presencia de Fut 2 y 8 se encontró de forma difusa en el citoplasma y en la membrana celular.

La distribución difusa de las Fucosiltransferasas podría estar asociada a diferentes organelos, por lo que un análisis con sondas específicas dirigidas a organelos en particular, como la vía Retículo-Golgi ayudaría a esclarecer su distribución subcelular específica.

Recientemente se ha publicado que la fucosilación se encuentra sobre expresada en tejidos tumorales de pacientes mexicanas con CEO [12]. Los análisis realizados *in situ* en este trabajo mostraron que la enzima Fut 2 se encuentra expresada de manera constitutiva tanto en tejido de ovario libre de cáncer como en tejido transformado, mientras que Fut 4 y 8 mostraron una expresión asociada a la patología. Los resultados sugieren que la fucosilación basal puede estar sujeta a la función de Fut 2 y no así por Fut 4 y 8, ya que la expresión de estas enzimas no se logró detectar en tejido libre de cáncer, pero en tejido con CEO la detección de Fut 4 y 8 se incrementa.

La expresión diferencial de Fut 4 y 8 en tejido tumoral, indica fuertemente que Fut 4 y 8 están jugando un papel importante en la patogenia del cáncer de ovario, por lo que resultaría muy interesante estudiar estas moléculas como posibles blancos terapéuticos. Un análisis con un número mayor de tejidos podría sustentar estas sugerencias.

XVI. CONCLUSIÓN

El cáncer es una enfermedad con características heterogéneas que podrían estar generando distintos microambientes, capaces de generar cambios a nivel morfológico y bioquímico sobre las células. En este trabajo concluimos que el líquido ascítico que rodea a las células transformadas, así como algunas condiciones de estrés, generan modificaciones en los patrones de expresión de las Fucosiltransferasas y estas modificaciones son reguladas en función al tiempo de exposición al microambiente.

Los resultados *in situ* demuestran que Fut 4 y Fut 8 se encuentran sobre-expresadas en tejido transformado. Se sugiere realizar un análisis de correlación entre el nivel de expresión de las Fut 4 y 8 con la etapa clínica de las pacientes para establecer si dichas enzimas se encuentran involucrados en la progresión tumoral. Estos estudios podrían ser relevantes para considerarlas como potenciales biomarcadores en el CEO.

XVII. PERSPECTIVAS

- Evaluar la expresión de Fut 1-11 en célula SKOV-3 por PCR tiempo real.
- Corroborar la localización de Fut 4 dentro del núcleo mediante fraccionamientos subcelulares.
- Una vez determinada la presencia de Fut 4 dentro del núcleo, establecer la función de Fut 4 dentro del núcleo mediante mutaciones o silenciamiento del gen.
- Determinar la actividad catalítica de las Fucosiltransferasas a través del marcaje del sustrato GDP-Fucosa.
- Evaluar si el mRNA de las diferentes Fucosiltransferasas se encuentra en el suero y el LA provenientes de pacientes con CEO.
- Realizar el análisis de un mayor número de muestras de tejido con CEO con la finalidad de obtener datos estadísticos, que permitan determinar la asociación de Fut 4 y 8 con la progresión tumoral del CEO.

XVIII. REFERENCIAS

1. Smith HO., Berwick M., *et al.*, 2006. Incidence and survival rates for female malignant germ cell tumors. *Obstet Gynecol* 107:1075–1085
2. GLOBOCAN **2012**. Estimated cancer incidence and prevalence worldwide in 2012. (<http://globocan.iarc.fr>)
3. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, *et al.*, **2001** Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 22: 255-288.
4. Benedet L., Bender H., III HJ., Ngan HY., Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. **2000**. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet*, 70:209–262.
5. Pothuri B., Leitao M., Levine DA., *et al.*, **2010**. Genetic analysis of the early natural history of epithelial ovarian carcinoma. *PLoSOne* 5:e10358
6. Menon U., Gentry Maharaj, Jacobs I. **2011**. Ovarian Cancer Screening and Mortality. *JAMA*, 306:1544.
7. Permuth J., Sellers T. **2009** Epidemiology of ovarian cancer. *Methods Mol. Biol*, 472:413-437.
8. Yin BWT., Lloyd KO. **2001**. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem*, 276:27371-27375.
9. Rustin GJS. **2004**. Use of CA-125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 10:3919-3926.
10. Permuth Wey J., Sellers T. **2009**. Epidemiology of ovarian cancer. *Methods Mol Biol*, 472:413-437
11. Gubbels J, *et al.*, **2010**. The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*; 3: 8

12. Villegas Pineda JC., *et al.*, **2015**. Integrins and haptoglobin: molecules overexpressed in ovarian cancer. *Pathology –Research & Practice*; 211: 973–981
13. Handerson T., Camp R., Harigopal M. **2005**. 1,6-Branched oligosaccharides are increased in lymph node metastases and predict poor outcome in breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 11, 2969–2973.
14. Maja N. Christiansen, Jenny Chik *et al.*, **2014**. Cell surface protein glycosylation in cáncer. *Proteomics*. 14, 525–546.
15. Abbott K., Nairn, A., Hall, E., Horton M. *et al.*, **2008**. Focused glycomic analysis of the N-linked glycan biosynthetic pathway in ovarian cancer. *Proteomics*. 8, 3210–3220.
16. Potapenko I., Haakensen, V, Luders, T., Helland, A. *et al.*, **2010**. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol. Oncol.* 4, 98–118.
17. Okuyama N. *et al.*, **2008**. Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. *Int. J. Cancer.* 118, 2803–2808
18. Miyoshi E., Moriwaki K. and Nakagawa T., **2008**. Biological function of fucosylation in cancer biology. *J. Biochem.* 143, 725–729
19. Le Pendu J., Marionneau S., Cailleau Thomas A., Rocher J. **2001**. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. *Apmis* 109, 9-26
20. Wei T., Liu Q., He F., Zhu, W., *et al.*, **2012**. The role of N-acetyl glucosaminyl transferases V in the malignancy of human hepatocellular carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.*, 93,8–17
21. Butler M., **2006**. Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology*, 50, 57–76

22. Comunale M., Lowman M., Long R., *et al.*, **2006**. Proteomic analysis of serum associated fucosylated glycoproteins in the development of primary hepatocellular carcinoma. *J. Proteome Res.* 5, 2006 308–315
23. Barrabés S., Pagès Pons L., *et. al.* **2016**. Glycosylation of serum ribonuclease 1 indicates a major endothelial origin and reveals an increase in core fucosylation in pancreatic cancer. *Glycobiology* 2016 17, 388–400
24. Geng F., Shi B., Yuan Y., and Wu X., **2004**. The expression of core fucosylated E-cadherin in cancer cells and lung cancer patients: prognostic implications. *Cell Res.* 14, 2004 423–433
25. Tabarés G., Radcliffe C., Barrabés S., Ramírez M., *et al.*, **2006**. Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA. *Glycobiology* 16, 2006 132–145
26. Saldova R., Royle L., Radcliffe, C., Abd Hamid., Evans R., *et al.*, **2007**. Ovarian cancer is associated with changes in glycosylation in both acute-phase proteins and IgG. *Glycobiology* 17, 2007 1344–1356.
27. Garibay Cerdaneres OL, Talamás Rohana P. *et. al.* **2014**. Proteomic identification of fucosylated haptoglobin alpha isoforms in ascitic fluids and its localization in ovarian carcinoma tissues from Mexican patients. *J Ovarian Res.* 2014 Feb 27;7:27. doi: 10.1186/1757-2215-7-27.
28. Fernández Mojón Sara. **2014**. Estudio de expresión de proteínas $\alpha(1,6)$ fucosiladas implicadas en la malignización del cáncer colorrectal. Tesis de Maestría, Universidad de Coruña, España.
29. Weston BW, Nair RP. **1992** Isolation of a novel human alpha (1,3) fucosyltransferase gene and molecular comparison to the human Lewis blood group alpha (1,3/1,4) fucosyltransferase gene. Syntenic, homologous, nonallelic genes encoding enzymes with distinct acceptor substrate specificities. *J Biol Chem.* Feb 25;267(6):4152-60
30. Weston BW, Smith PL. **1992**. Molecular cloning of a fourth member of a human alpha (1,3) fucosyltransferase gene family. Multiple

homologous sequences that determine expression of the Lewis x, sialyl Lewis x, and difucosyl sialyl Lewis x epitopes. *J Biol Chem*. Dec 5;267(34):24575-84

31. Christiansen MN. *et al.*, **2014**. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics*; 14: 525–546
32. C. Breton., J. Mucha, C. Jeanneau. **2001**. Structural and functional features of glycosyltransferases *Biochimie*, 83 (8), pp. 713–718
33. Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. **2004**. Carbohydrate mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *2004 Cancer Sci* 95(5): 377–384.
34. Yang XS, Liu S, Liu YJ, Liu JW, Liu TJ, Wang XQ. *et a.*, **2010**. Overexpression of fucosyltransferase IV promotes A431 cell proliferation through activating MAPK and PI3K/ Akt signaling pathways. *J Cell Physiol*; 225: 612–619.
35. Miyoshi E, Honke K, Tangiguchi N. Core fucosylation regulates epidermal growth factor receptor-mediated intracellular signal. *J Biol Chem* 2006; 281: 2572–2577.
36. Roos C, Kolmer M, Mattila P, *et al.*, **2002**. Composition of *Drosophila melanogaster* proteome involved in fucosylated glycan metabolism. *J Biol Chem* 277: 3168-3175,
37. Sakamoto, J., Furukawa, K., Cordon-Cardo, C., Yin, B. W. T. *et al.*, **1986**. Expression of Lewis^a, Lewis^b, X, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines. *Cancer Res*. 46, 1553–1561.
38. Ogawa J, Inoue H, Koide S. **1996**. Expression of alpha-1,3-fucosyltransferase type IV and VII genes is related to poor prognosis in lung cancer. *Cancer Res*. Jan 15;56(2):325-9.

39. Petretti T, Schulze B. *et al.*, **1999**. Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human gastric carcinomas. *Biochim Biophys Acta*. Aug 5;1428(2-3):209-18.
40. Petretti T¹, Kemmner W. **2000**. Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human colorectal carcinomas and liver metastases. *Gut*. Mar;46(3):359-66.
41. Mas E, Pasqualini E., *et al.* **1998** Fucosyltransferase activities in human pancreatic tissue: comparative study between cancer tissues and established tumoral cell lines. *Glycobiology*. Jun;8(6):605-13.
42. M Hirakawa, R Takimoto, F Tamura. **2014**. Fucosylated TGF- β receptors transduces a signal for epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer*. 110, 156–163
43. Tae Wook Chung, Seok Jo Kim, Hee Jung Choi. *et al.* **2014**. Hepatitis B virus X protein specially regulates the sialyl lewis a synthesis among glycosylation events for metastasis 2014. *Mol Cancer*. 2014; 13: 222.
44. Xiaomei Yan, Yingwei Lin, *et al.* **2015**. Fucosyltransferase IV (FUT4) as an effective biomarker for the diagnosis of breast cancer. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 70 (2015) 299–304
45. Zhang Z, Sun P, Liu J, Fu L, Yan J, Liu Y, *et al.* **2008**. Suppression of FUT1/FUT4 expression by siRNA inhibits tumor growth. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783(2):287–96.
46. Yang X, Zhang z, Jia S, Liu Y, Wang X, Yan Q. **2007** Overexpression of fucosyltransferase IV in A431 cell line increase cell proliferation. *Int J Biochem Cell Biol*;39(9):1722–30
47. C. Escrevente, E. Machado. **2006**. Different expression levels of -3/4 fucosyltransferases and Lewis determinants in ovarian carcinoma tissues and cell lines *international journal of oncology* 29: 557-566.
48. Ana I. Belo, Sandra J. van Vliet, *et al.* **2015**. Hypoxia inducible factor 1a down regulates cell surface expression of a1,2-fucosylated glycans in human pancreatic adenocarcinoma cells.

49. Na Gao, Juan juan Liu , Dawo Liu. **2014.** c-Jun transcriptionally regulates alpha 1, 2-fucosyltransferase 1 (FUT1) in ovarian cancer. *Biochimie* 107 286e292
50. Lin H, Wang D, Wu T, Dong C, Shen N, Sun Y, Xie H, Wang N, Shan L. **2011.** Blocking core fucosylation of TGF-beta1 receptors downregulates their functions and attenuates the epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 300(4): F1017–F1025. Core Fucosylation on T
51. Fujii H, Shinzaki S., Iijima H., **2016.** Cells, Required for Activation of T-Cell Receptor Signaling and Induction of Colitis in Mice, Is Increased in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 2016 Jun;150(7):1620-32.
52. Schmidt, G. **2007.** Ecografía de la imagen al diagnóstico. Editorial Médica Panamericana; p: 448
53. Kipps E, Tan DS and Kaye. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nature Reviews Cancer*; 2013 13: 273–282
54. PuiFFE ML, Filali MA, Zietarska M, Ouellet V. **2007.** Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia*; 9 (10): 820-829.
55. N Ahmed, C Riley1. *et al.*, **2005.** Ascites induces modulation of a6b1 integrin and urokinase plasminogen activator receptor expression and associated functions in ovarian carcinoma *British Journal of Cancer*. 92, 1475–1485.
56. Toledo Leyva A. **2013** Inducción de una molécula de 25 kDa por efecto del líquido ascítico en líneas celulares de cáncer de ovario. CINVESTAV
57. Villegas pineda JC. **2012.** Estudio comparativo de la expresión de las proteasas e integrinas entre líneas celulares, tumores primarios de

pacientes y ratones xenotransplantados con carcinoma ovárico. CINVESTAV.

58. Yvette van Kooyk, Hakan Kalay and Juan J. Garcia Vallejo. **2013**. Analytical tools for the study of cellular glycosylation in the immune system. doi: 10.3389/fimmu.
59. Zhao Y., Sato Y., Isaji T., *et al.* **2008**. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *Febs j* 2008;275:1939–1948.
60. Navarro S., Pérez M., *et al.* **2002**. Tratado de pancreas exocrine. Ediciones médicas S.L
61. Ferri Iglesias. **2012**. Moléculas sérica relacionada con la fisiopatología del adenocarcinoma pancreático como posibles marcadores tumorales. Tesis doctoral. Universidad de Girona.
62. Yang, X., Wang, J., Liu, S., Yan, Q. **2014**. HSF1 and SP1 are involved in the regulation of FUT4 gene expression and cell proliferation in breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 115, 168–178.
63. Pickard J., Maurice C., Kinnebrew M. *et al.*, **2014**. Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host commensal symbiosis in sickness. *Nature*; 514:638–641
64. Aziz S., Sherwani S., Akhtar S., Kazmi. **2014**. Development of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay based on surface whole cell antigen for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients with gastroduodenal ulcer disease
65. Roos C., Kolmer M., Mattila P., Renkonen R., **2002**. Composition of *Drosophila melanogaster* proteome involved in fucosylated glycan metabolism. *J. Biol. Chem.* 277:3168-3175.
66. Miyoshi E, Uozumi N, Noda K, *et al.* **1997**. Expression of alpha1-6 fucosyltransferase in rat tissues and human cancer cell lines. *Int J Cancer*;72:1117–1121.
67. Gonzalez Begne M., Lu B., Han X., Hagen F.K., Hand A.R., Melvin J.E., Yates J.R. **2009**. Proteomic analysis of human parotid gland

exosomes by multidimensional protein identification technology
(MudPIT). J. Proteome Res. 8:1304-1314.