



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Químicas  
Centro de Química-Instituto de Ciencias  
Posgrado en Ciencias Químicas

Evaluación de la expresión de Galectina-4 en  
suero y tejido de pacientes con cáncer  
cervicouterino e identificación de su ARNm en  
células de cérvix

Tesis presentada para obtener el grado de  
DOCTORADO

Presenta

M. C. Ileana Conde Rodríguez

Directores de tesis

D. C. José Gustavo López y López

D. C. Verónica Vallejo Ruiz

PUEBLA, PUEBLA

JULIO 2021

*Dedicado a mi padre con amor eterno*

*C.P. José R. Conde Cualla*

*Quien me dejó demasiado pronto*

“Las grandes mentalidades tienen sus fines, mientras que las menos enaltecidas solo tienen deseos. Esas mentalidades timoratas siempre están sujetas a experimentar desgracias, mientras que las elevadas y nobles las eluden”

Una finalidad dominante en nuestra mente nos hace avanzar hacia adelante. Es la finalidad de la vida. Pero ¿cómo podríamos vivirla sin derramar sobre el mundo lo mejor de nuestras habilidades, de nuestras virtudes y de nuestros afectos? Si vamos a mantener simples deseos de ganancia personal, o de propia satisfacción, no solo empobrecemos nuestras vidas, sino que frustramos la Ley Divina.

Debemos ser felices, Emilio Gocker

## Agradecimientos

### **FINANCIAMIENTO CONACYT**

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Proyecto CONACYT Infraestructura No. 300379

No. De Becario 553529



### **FINANCIAMIENTO IMSS**

El proyecto fue financiado por el Instituto Mexicano del Seguro Social FIS/IMSS/PROT/G17-2/1760

No. de Becario 98227566

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente-IMSS



Especial agradecimiento a los honorables miembros de comisión revisora por el tiempo invertido en la revisión de esta tesis

## Agradecimientos

Existe una lista larga de las personas que han estado como parte de mi formación profesional, pero aún más, las que me han acompañado en mi vida personal. A pesar de los cambios y del tiempo han estado a mi lado.

Puedo empezar por agradecer a mi familia, que siempre han sido un escalón firme en mi camino. Mi padre José, que con su vida y con su muerte me ha enseñado fortaleza, perseverancia y un propósito en cada día, además de su infinito amor. Mi madre Ofelia que es una mujer de carácter fuerte y gran corazón, siempre con mimos y algún regaño cuida de mí. Mis hermanos Fer y Luis que son la alegría de mi vida y han hecho este camino más y más llevadero. Mi amado esposo Luis que ha sido mi soporte, mi amigo, mi confidente de lágrimas y quien siempre cree en mí, incluso cuando yo misma me he perdido la fe.

Dra. Vero que con los años se ha convertido en una amiga y por supuesto mi tutora, hemos vivido muchas cosas juntas y siempre me ha mostrado ser una mujer fuerte e inteligente.

Dr. Gustavo que me conoció en la maestría y me abrigó en el doctorado. Gracias por el apoyo, por formarme como una profesionista completa y capaz de andar sola en el camino.

Q. Tony que me vio crecer, gracias por estar a mi lado y las largas pláticas de la vida, por ser una amiga.

Dra. Lupita, por el tiempo invertido en mi formación y su disposición, por todos los conocimientos que me compartió.

A mis compañeros de laboratorio con los que tuve la oportunidad de convivir, tengo de cada uno un recuerdo especial. Las largas horas de trabajo, cuando llegábamos al salir el sol y a veces volvíamos con la noche. Las pláticas y una que otra cerveza para relajarnos y también las travesuras.

Gracias a Jocelyn, Lupita, Ivonne, Denisse, Liliana siempre fueron un soporte, me brindaron aliento para continuar, cariño, comprensión, compasión y bondad. Gracias por su amistad sincera y por quedarse conmigo en los momentos difíciles que tuve que sopesar, a pesar de la distancia y las circunstancias están a mi lado. Gracias por siempre creer en mí y por las anorguesitas.

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	Epidemiología del cáncer cervicouterino .....	1
1.2.	Factores de riesgo.....	3
1.2.1.	Infecciones y cáncer cervicouterino .....	3
1.2.2.	Comportamiento sexual y cáncer cervicouterino .....	5
1.2.3.	Uso de anticonceptivos orales y el riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino .....	6
1.2.4.	Tabaquismo y cáncer cervicouterino.....	6
1.3.	Anatomía del cuello uterino .....	6
1.3.1.	Tipos epiteliales del cuello uterino.....	8
1.3.2.	Unión escamo-columnar .....	9
1.4.	Detección temprana de cáncer cervicouterino.....	10
1.4.1.	Detección y tratamiento de las lesiones premalignas .....	11
1.5.	Diagnóstico clínico y estadificación de cáncer cervicouterino .....	13
1.5.1.	Biomarcadores en cáncer cervicouterino .....	16
1.6.	Galectinas .....	18
1.6.1.	Generalidades de las galectinas .....	18
1.6.2.	Mecanismo de secreción de las galectinas .....	19
1.6.3.	Localización subcelular y unión a ligandos .....	20
1.6.4.	Funciones celulares de las galectinas .....	20
1.6.5.	Expresión de galectinas en tejidos.....	21
1.6.5.1.	Galectinas y el desarrollo de cáncer .....	22
1.6.6.	Galectinas séricas como biomarcadores en enfermedades .....	24
1.6.6.1.	Galectinas séricas en cáncer .....	24
1.7.	La participación de la galectina-4 en las funciones celulares y el cáncer .....	27
1.7.1.	Características generales .....	27
1.7.2.	Mecanismo de secreción y exporte de la galectina-4 .....	29
1.7.3.	Expresión de galectina-4 en tejido humano .....	30
1.7.4.	Funciones biológicas de galectina-4.....	30
1.7.5.	La desregulación de la expresión de galectina-4 y cambios asociados al desarrollo de cáncer	31
1.7.6.	Cambios de expresión de galectina-4 en tejido y su asociación con el desarrollo de cáncer	33

1.7.7.	Incremento de galectina-4 sérica en cáncer.....	34
2.	JUSTIFICACIÓN.....	36
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	36
4.	HIPÓTESIS.....	37
5.	OBJETIVOS .....	37
5.1.	Objetivo General .....	37
5.2.	Objetivos Específicos.....	37
6.	METODOLOGÍA .....	38
6.1.	Población en estudio.....	38
6.2.	Determinación de la concentración de galectina-4 en suero de pacientes.....	38
6.3.	Evaluación de la proteína galectina-4 en tejido cervical.....	39
6.4.	Localización de la galectina-4 en tejido cervical por inmunofluorescencia.....	40
6.5.	Características de las líneas celulares y su mantenimiento .....	41
6.6.	Cuantificación de la expresión del gen <i>LGALS4</i> en líneas celulares por PCR en tiempo real 42	
6.7.	Cuantificación de la proteína galectina-4 en líneas celulares por Western Blot .....	43
6.8.	Evaluación de la expresión y localización de la galectina-4 en líneas celulares por inmunofluorescencia.....	44
6.9.	Análisis estadístico.....	45
7.	RESULTADOS.....	47
7.1.	Características de la población de estudio.....	47
7.1.1.	Características sociodemográficas de las pacientes con cáncer con procesamiento de galectina-4 sérica.....	47
7.1.2.	Características de las pacientes a las que se evaluó la expresión en tejido de galectina- 4 49	
7.2.	Concentración de galectina-4 en suero de pacientes con cáncer cervicouterino.....	51
7.2.1.	Análisis de la concentración de galectina-4 sérica y las características clínico- patológicas en pacientes con cáncer cervicouterino.....	52
7.2.2.	Galectina-4 sérica como marcador diagnóstico en pacientes con cáncer cervicouterino 55	
7.3.	Expresión de galectina-4 en tejido de pacientes con cáncer cervicouterino.....	57
7.3.1.	Expresión de galectina-4 en epitelio escamoso.....	57
7.3.2.	Expresión de galectina-4 en epitelio columnar. ....	62
7.3.3.	Evaluación de la localización de galectina-4 en tejido cervical por inmunofluorescencia .....	63
7.4.	Concentración sérica de galectina-4 y la relación con su nivel de expresión en tejido de pacientes con cáncer cervicouterino .....	66

7.5.	Niveles de expresión del gen <i>LGALS4</i> y proteína en líneas celulares de cérvix .....	67
7.5.1.	Cuantificación de la expresión del gen <i>LGALS4</i> en líneas celulares.....	67
7.5.2.	Evaluación de la expresión de la proteína galectina-4 en líneas celulares. ....	68
7.5.3.	Localización de galectina-4 en líneas celulares.....	70
8.	DISCUSIÓN .....	71
9.	CONCLUSIONES .....	77
10.	PERSPECTIVAS .....	78
11.	REFERENCIAS .....	79
	ANEXO I: Preparación de soluciones y material.....	93
	Preparación de laminillas para histoquímica.....	93
	Buffer de citratos 10 mM, pH 6 .....	93
	PBS pH 7.2-7.4 .....	93
	BSA 1%    93	
	BSA 5%    93	
	Triton X-100 2% .....	93
	Poliacrilamida 30% .....	94
	Persulfato de amonio 10% .....	94
	Dodecilsulfato de sodio (SDS) 10% .....	94
	Tris base 0.5 M pH 6.8.....	94
	Tris base 1.5 M pH 8.0.....	94
	Buffer Laemmli.....	94
	Buffer de transferencia 0.06% pH 8.3-8.5 .....	94
	Solución de lavado TBS y TBS-T.....	95
	Buffer de carga para proteínas .....	95
	Buffer Stripping .....	95
	RIPA       95	
	Preparación de gel de poliacrilamida .....	96
	ANEXO II: Consentimiento informado .....	97
	ANEXO III: Publicación y congresos .....	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estimación de incidencia, mortalidad y prevalencia del CaCu en países de Latinoamérica y el Caribe. México se posiciona en el segundo lugar de incidencia, mortalidad y prevalencia en la población femenina de 0 a 74 años [3].	1
Figura 2. Estimación de incidencia, mortalidad y prevalencia por CaCu en países de Latinoamérica y el Caribe. En México el CaCu se posiciona en el segundo lugar de incidencia, mortalidad y prevalencia en la población femenina. [3].	2
Figura 3. Anatomía del aparato reproductor femenino. Se divide principalmente en tres partes, útero, cérvix y vagina. El cérvix está conformado por endocervix y exocervix, en la parte superior está delimitado por el orificio interno que conecta con el útero y en la parte inferior con el orificio externo conectando con la vagina. Creado con BioRender.com.	7
Figura 4. Epitelio escamoso, columnar y unión escamocolumnar. Creado con BioRender.com.	9
Figura 5. Representación esquemática de la región promotora del gen LGALS4. Se presentan los sitios putativos de unión a factores de transcripción. Imagen modificada de Huflejt &Leffler 2004.	27
Figura 6. Representación esquemática de los dominios de reconocimiento de Gal-4. Ambos dominios se componen de dos láminas antiparalelas, cada lámina está formada por seis hebras antiparalelas.	28
Figura 7. La concentración de Gal-4 sérica en mujeres con citología normal y mujeres con CaCu. Se muestra la concentración de Gal-4 (pg/ml) en suero de pacientes control (n= 13), y con CaCu (n= 39). Análisis de Mann-Whitney ** p=0.0061.	51
Figura 8. Niveles séricos de Gal-4 en pacientes con CaCu por tipo histológico p=0.0949.	53
Figura 9. Niveles séricos de Gal-4 por estadio clínico p=0.1997.	53
Figura 10. Niveles séricos de Gal-4 con respecto al tamaño de tumor p=0.1325.	54
Figura 11. Curva ROC de la concentración sérica de Gal-4 de pacientes con CaCu. La gráfica muestra un área bajo la curva de 0.7515, p=0.0071, 0.5900 a 0.9129 de 95% de intervalo de confianza, error estándar de 0.0823.	56
Figura 12. Inmunodetección de Gal-4 en epitelio escamoso de tejido normal y con CaCu. En el epitelio normal (A y B) la expresión de Gal-4 se encontró en el citoplasma de las células, mientras que en tejido tumoral (C y D) la expresión de Gal-4 se encontró tanto en citoplasma como en núcleo. Las fotos se tomaron en una amplificación de 20X y 40X.	58

Figura 13. Expresión de Gal-4 en tejidos respecto a queratinización. Expresión de Gal-4 en tumores queratinizantes (□ n=16) y no queratinizantes (■ n=5). Los niveles de expresión de Gal-4 en tumores fue mayor que en los que no presentan queratina, La media de la intensidad de la expresión de Gal-4 fue calculada con el programa Image-Pro. Análisis Mann-Whitney * p=0.0318. ....	60
Figura 14. Expresión de Gal-4 respecto a estadio FIGO. Se muestra la expresión de Gal-4 en tumores de pacientes con estadios FIGO I-II (● n=16) y III-IV (■ n=9). En estadios tempranos (I-II) se observó un menor nivel de expresión de Gal-4, con respecto a los estadios tardíos (III-IV). La media de intensidad de coloración en las biopsias se obtuvo con el programa Image-Pro. El análisis Mann-Whitney no mostró diferencias significativas (p=0.1868).....	60
Figura 15. Expresión de Gal-4 en tumores de pacientes con CCE de cérvix en diferentes estadios. La expresión de la Gal-4 se muestra en células epiteliales de tumores de pacientes con diferentes estadios, tanto en citoplasma como en núcleo, observando un nivel de expresión alto en algunas células tumorales. El análisis estadístico no mostró una relación entre la intensidad de coloración con el estadio clínico. ....	61
Figura 16. Inmunodetección de Gal-4 en epitelio columnar de muestras normales y con CaCu. Se muestra el epitelio columnar normal (A y B) y con CaCu (C y D). Se encontró que epitelios columnares normales tienen una baja expresión de Gal-4 a diferencia de los adenocarcinomas. En los tejidos de adenocarcinoma se observó principalmente en las células columnares. ....	62
Figura 17. Detección de Gal-4 por inmunofluorescencia en tejido de cérvix normal. La expresión de Gal-4 se muestra en color verde (Alexa Fluor 488) y los núcleos en color azul (DAPI). Figura A y D, se muestra la tinción de núcleos en aumento 10X y 20X. Figuras B y E se muestra la tinción de Gal-4 a un aumento de 10X y 20X. En las figuras C y F se muestra el merge de ambas señales.....	63
Figura 18. Localización de Gal-4 en el epitelio de un tejido con diagnóstico de CaCu. La expresión de Gal-4 se muestra en color verde y la tinción nuclear en color azul. Figuras A y D, se muestra la tinción de núcleos en aumento 10X y 20X. Figuras B y E se muestra la tinción de Gal-4 a un aumento de 10X y 20X. En las figuras C y F se muestra el merge de ambas señales.....	64
Figura 19. Localización de Gal-4 en un epitelio con características de una lesión escamosa intraepitelial de un tejido con diagnóstico de CaCu. La expresión de Gal-4 se muestra en color verde y los núcleos en color azul. Figuras A y D, se muestra la tinción de núcleos en aumento 10X y 20X. Figuras B y E se muestra la tinción de Gal-4 a un aumento de 10X y 20X. En las figuras C y F se muestra el merge de ambas señales. ....	65
Figura 20. Gal-4 en suero y tejido de pacientes. En el nivel de expresión en tejido se muestra con la densidad media de los niveles séricos, se muestran con la correlación de Spearman r, p=0.4918. ..	66

Figura 21. Niveles de expresión del gen LGALS4 en diferentes líneas celulares. La expresión fue analizada mediante PCR tiempo real, los niveles de expresión del gen LGALS4 fueron normalizados con el gen endógeno hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT), la expresión relativa fue obtenida empleando el método $\Delta\Delta Ct$ . ANOVA de una vía con un post-análisis de Dunnet, * $p < 0.05$ , **** $p < 0.001$ .....	67
Figura 22. Detección de Gal-4 en líneas celulares de cérvix. Se realizó Gal-4 mediante un western blot en líneas celulares SiHa y HaCat, como control positivo se usó yeyuno de rata. Como control de carga se usó un anticuerpo anti- $\beta$ -actina. ....	68
Figura 23. Identificación de la expresión de la Gal-4 en líneas celulares A. Nivel de expresión de Gal-4 en las células HaCaT, SiHa y Jurkat. Se muestran los resultados del análisis densitométrico de las bandas de Gal-4 normalizadas con respecto a $\beta$ -actina B. Ensayo de WB que muestra la detección de Gal-4 en líneas celulares mencionadas, para el ensayo fueron usados 100 $\mu$ g de proteína total para cada tipo celular. Se hizo un análisis de ANOVA de una vía con un post análisis de Dunn's, n=4. ....	69
Figura 24. Localización de Gal-4 en líneas celulares. En el panel se ejemplifica la expresión de Gal-4 en HaCat (control) y SiHa (CCE), en A y D se observa la tinción nuclear (DAPI), en B y E la expresión de Gal-4 y en C y F el merge de ambas señales. En las microfotografías se muestra la expresión de Gal-4 en color verde y la tinción nuclear en color azul, las imágenes de tomaron con un objetivo de 63X de inmersión .....	70

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Equivalencia de terminología entre displasia, NIC y el Sistema Bethesda.....	12
Tabla 2. Estadificación FIGO para CaCu [58].....	14
Tabla 3. Clasificación TNM para CaCu y FIGO [61].....	15
Tabla 4. Características de las líneas celulares.....	41
Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos y su tamaño de amplificación .....	43
Tabla 6. Características sociodemográficas y ginecológicas de las pacientes con CaCu y suero procesado.....	48
Tabla 7 Características de las pacientes con CaCu y estudio en biopsia.....	49
Tabla 8. Niveles séricos de Gal-4 y características clínico-patológicas.....	52
Tabla 9. Niveles séricos de Gal-4 en pacientes con carcinoma escamoso y características clínico- patológicas.....	55
Tabla 10. Nivel de expresión de Gal-4 en tejido y características clínico-patológicas de pacientes con CaCu.....	59
Tabla 11. Nivel de expresión de Gal-4 en suero y tejido de pacientes con CaCu.....	66

## RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas, aunque existen programas de prevención, la incidencia y nuevos casos van en aumento. Galectina-4 (Gal-4) es una proteína que presenta una expresión alterada en diferentes tipos de cáncer, estos cambios se han asociado a recurrencia temprana y metástasis lo que conlleva a un mal pronóstico. En el CaCu, no se ha estudiado la Gal-4. El objetivo del estudio fue determinar el nivel de expresión y localización subcelular de Gal-4 en tejido CaCu y la concentración en suero de pacientes con CaCu. Así como caracterizar la expresión de Gal-4 en líneas celulares cervicales.

La determinación de Gal-4 sérica se realizó con un ELISA. Para evaluar la expresión en tejido cervical, se realizó tinción inmunohistoquímica. Para analizar los niveles de expresión del gen LGALS4 en las líneas celulares se realizó un PCR en tiempo real, para la identificación de la proteína Gal-4 se realizaron ensayos de Western Blot e inmunocitoquímica.

Los resultados mostraron que la concentración de Gal-4 en el suero de pacientes con CaCu era mayor (647.9 pg/ml) que en el suero de mujeres con citología normal (382.1 pg/ml). Por otro lado, el análisis inmunohistoquímico de las muestras de CaCu mostró una mayor expresión de la proteína en los tumores queratinizantes con respecto a los no queratinizantes y una tendencia de mayor expresión en los tumores de pacientes con estadio clínico avanzado. Con respecto a su localización celular, en tejido cervical normal, la Gal-4 se detectó en el citoplasma, y en las células tumorales de carcinoma escamoso y adenocarcinoma, la presencia de Gal-4 se detectó tanto en el citoplasma como en el núcleo. El aumento de la concentración sérica y la localización diferente en las células tumorales sugieren un posible papel de la Gal-4 en el desarrollo de CaCu. Mediante un análisis ROC se determinó que Gal-4 sérica es un prometedor biomarcador para diagnóstico.

La línea celular SiHa fue la que presentó mayor expresión respecto a los controles HaCat y Jurkat. La proteína fue detectada en la línea celular SiHa, el análisis inmunocitoquímico mostró que la mayor expresión de Gal-4 se localiza en el núcleo a comparación de las células control HaCat que expresan principalmente en el citoplasma. Este cambio de localización podría asociarse con características más agresivas, aunque serán necesarios estudios funcionales.

## ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is the second leading cause of death in Mexican women, although there are prevention programs, the incidence and new cases are increasing. Galectin-4 (Gal-4) is a protein with altered expression in different types of cancer. These changes have been associated with early recurrence and metastasis, which result in poor prognosis.

Gal-4 has not been studied in CC. The objective of this study was to determine the levels of expression and subcellular localization of Gal-4 in tissue and serum levels of patients with CC. As well as characterizing the Gal-4 expression in cervical cell lines.

The determination of Gal-4 in serum was made with ELISA. To evaluate the expression in cervical tissue, an immunohistochemical staining was performed. To analyze the expression levels of *LGALS4* gene in cell lines, a real time PCR was performed. To identify the Gal-4 protein Western Blot and immunocytochemistry assays were performed.

The results showed that the serum Gal-4 concentration of patients with CC was higher (647.9 pg/ml) than that in the serum of women with normal cytology (382.1 pg/ml). The immunohistochemical analysis of the CC samples showed a higher expression of the protein in keratinizing tumors compared to non-keratinizing tumors and a trend of higher expression in tumors from patients with advanced clinical stage. About the Gal-4 cellular localization in CC samples, it was detected in the cytoplasm in normal tissues, while in tumor cells of squamous carcinoma and adenocarcinoma, Gal-4 was detected both in the cytoplasm and nucleus. A ROC analysis of serum Gal-4 showed that it is a promising diagnostic biomarker. The increased levels and the different localization in tumoral cells suggest a possible role of Gal-4 in CC development.

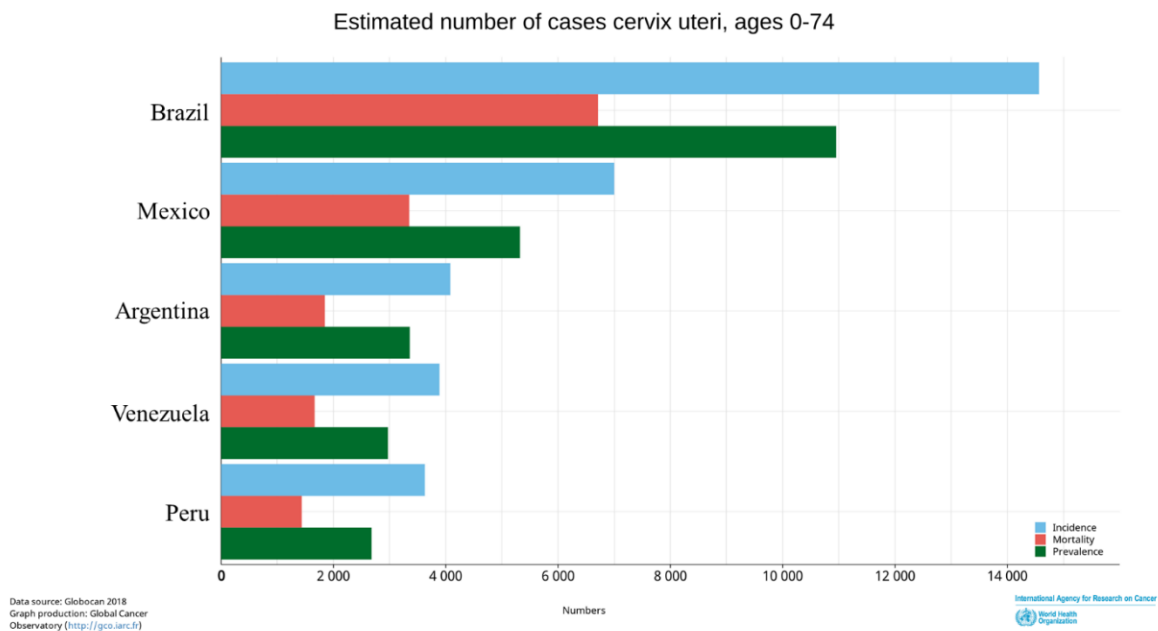
The SiHa cell line had the highest expression compared to the HaCat and Jurkat controls. The protein expression was detected in SiHa, the immunochemistry showed that the highest Gal-4 expression is in the nucleus compared to HaCat cells, where it was found mainly in the cytoplasm. This localization change could be associated with more aggressive characteristics, although functional studies will be necessary.

# 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cérvix que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, las cuales progresan a un cáncer *in situ* o un cáncer invasor en donde las células con transformación maligna traspasan la membrana basal. El CaCu es considerado un problema de salud pública que se presenta principalmente en la población de nivel socioeconómico bajo y en países con bajos ingresos. Existen varios programas de detección de la enfermedad pre-invasora, sin embargo, los diagnósticos por lo general se realizan cuando el estadio está avanzado y por lo tanto deriva a un mal pronóstico.

## 1.1. Epidemiología del cáncer cervicouterino

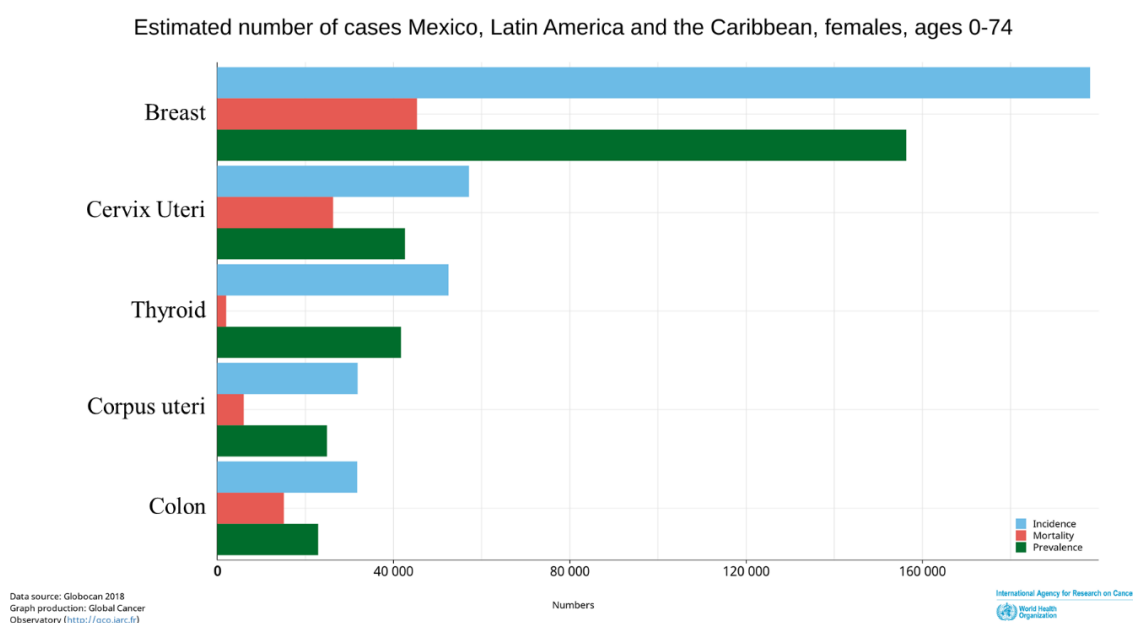
El CaCu es el cuarto tipo más común en la población femenina a nivel mundial, en 2018 se estimaron más de 570,000 casos y 311,000 muertes [1, 2].



*Figura 1. Estimación de incidencia, mortalidad y prevalencia del CaCu en países de Latinoamérica y el Caribe. México se posiciona en el segundo lugar de incidencia, mortalidad y prevalencia en la población femenina de 0 a 74 años [3].*

En los países de Latinoamérica y el Caribe, México ocupa el segundo lugar en incidencia, mortalidad y prevalencia, superado por Brasil que se sitúa en el primero [3] (Figura 1).

En México el CaCu se encuentra en el segundo lugar de incidencia, mortalidad y prevalencia, [3, 4]. En 2018 se estimó una incidencia de 57 000 casos, 26 000 muertes y una prevalencia de 42,000 (Figura 2) que representa una tasa de incidencia estandarizada por edad de 22.6 y una tasa estandarizada por edad de 10.5 casos (por cada 100,000 por año) [3].



*Figura 2. Estimación de incidencia, mortalidad y prevalencia por CaCu en países de Latinoamérica y el Caribe. En México el CaCu se posiciona en el segundo lugar de incidencia, mortalidad y prevalencia en la población femenina. [3].*

En el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en el año 2000 se reportó una tasa de mortalidad por CaCu de 13.3 muertes por 100, 000, en 2011 de 5.3 por cada 100, 000 mujeres [5] y en 2018 la tasa de mortalidad fue de 4.4 por cada 100, 000 mujeres [6]. La disminución de los casos en los últimos años, es atribuida a los programas de prevención y detección temprana, el IMSS invierte más de 75,787 millones de pesos para la detección y tratamiento

de CaCu [6]. Los datos estadísticos mostrados, indican que el CaCu es un problema de salud pública en México y que debe atenderse por los sistemas de salud, además debe fomentar la investigación básica y clínica, a fin de que se implementen nuevas estrategias para la detección temprana y seguimiento de la respuesta a tratamiento.

## 1.2. Factores de riesgo

El desarrollo de CaCu está asociado al estatus socioeconómico, el 85% de los casos se presenta en los países con bajos ingresos [7] y con un índice de desarrollo humano bajo (HDI, Human Development Index) [1]. La incidencia más alta se encuentra en América Central y del Sur, Asia y África [7]. Otros factores que se han vinculado con el desarrollo de CaCu son las infecciones persistentes por algunos genotipos de VPH, el comportamiento sexual que está relacionado con el número de parejas sexuales, el número de partos, el uso de anticonceptivos, las infecciones vaginales como la clamidia y herpes, el tabaquismo, el estado del sistema inmunológico, la infección por VIH y el consumo de dietilestilbestrol (DES) [8]. A continuación, se describen algunos de estos factores de riesgo.

### 1.2.1. Infecciones y cáncer cervicouterino

Algunas de las infecciones que se transmiten por contacto sexual se han clasificado como factores de riesgo para desarrollar CaCu como la clamidia, el herpes y el VPH. Estas infecciones modifican la estructura epitelial y la respuesta del sistema inmunológico, predisponiendo a que las pacientes desarrollen CaCu, además algunas co-infecciones con VPH se encuentran presentes.

#### 1.2.1.1. Infecciones vaginales y cáncer cervicouterino

La clamidia es una patología causada por la bacteria *Chlamydia trachomatis*, frecuentemente es asintomática, esta infección ocasiona cervicitis, hipertrofia e inflamación prolongada, esto predispone a que otros patógenos como el VPH infecten el epitelio, debido al daño en la integridad del epitelio de la zona de transformación [9, 10].

La infección de *C. trachomatis* se ha identificado como un factor de riesgo para desarrollar CaCu [10, 11], mujeres con infecciones de *C. trachomatis* presentaron un mayor riesgo de desarrollar carcinoma de células escamosas cervicales, aunque para adenocarcinoma el riesgo fue menor [10, 11]. Las pacientes que presentan infección por *C. trachomatis* y que son positivas a VPH-16 tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad respecto a los controles [10]. Se desconoce el mecanismo biológico por el que esta bacteria incrementa el riesgo de desarrollar CaCu, pero uno probable, es la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), el incremento de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, disminución de la inmunidad celular, que en conjunto ocasionan daños al ADN y alteran la reparación del mismo [11].

El herpes es ocasionado por la infección con el virus del herpes simple (VHS), este virus se ha asociado al desarrollo de CaCu[12], además se encontró que la carga viral del VHS-2 incrementó desde la cervicitis (inflamación del cuello uterino) hasta las lesiones y carcinoma de células escamosas (CCE) y adenocarcinoma (AC) [13]. La co-infección de VHS-2 y VPH podría tener una asociación con el desarrollo de CaCu [14], este tipo de infección es aún controvertida, ya que algunos autores no han encontrado el virus en muestras de CaCu[15], sin embargo, esto puede atribuirse al método de detección utilizado [16].

#### *1.2.1.2. Infecciones persistentes de VPH y el cáncer cervicouterino*

El VPH es el principal agente etiológico del CaCu, del 95 al 99 % de los casos de cáncer presentan infecciones persistentes por VPH oncogénicos [17-20]. Los VPH son capaces de infectar tejido cutáneo o mucosas, aproximadamente 40 genotipos tienen tropismo por mucosas anogenitales [21]. Estos virus se clasifican de acuerdo con su capacidad oncogénica en genotipos de alto y bajo riesgo [22]. A nivel mundial los VPH de alto y bajo riesgo con mayor prevalencia son -16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56 y -58 [22, 23] y -6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, -81 y -CP6108 [22] respectivamente.

Se estima que aproximadamente el 40% de las mujeres tienen al menos una infección anual, esta infección puede tener una duración de 8-10 meses, alrededor del 90% de las mujeres infectadas es capaz de resolver la infección por sí misma [24], mientras que el 10 % restante presentan infecciones persistentes. La prevalencia de VPH de alto riesgo es un factor

determinante para la progresión, mantenimiento y desarrollo de lesiones premalignas y finalmente CaCu [25].

Con respecto a la población mexicana, varios autores han reportado que los VPH de alto riesgo que están presentes en pacientes con CaCu son el -16, -18, -51 y el -45 [26-29], mientras que los VPH de bajo riesgo -6 y -11 están presentes en verrugas genitales y lesiones de bajo grado [26, 28], la prevalencia de estos genotipos depende de la ubicación geográfica de la población y el método de detección.

Actualmente el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (*IARC*, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud han propuesto que la vacunación contra VPH es un mecanismo sumatorio de prevención para el desarrollo de CaCu, pero con las discrepancias respecto a la identificación de los genotipos más prevalentes en la población mexicana [30], se sugiere que se desarrollen vacunas de acuerdo a los genotipos de VPH más prevalentes en la población en la que se aplicarán, ya que existen algunos genotipos que no se encuentran presentes en las vacunas actuales.

### 1.2.2. Comportamiento sexual y cáncer cervicouterino

El inicio de una vida sexual a temprana edad es un factor importante que contribuye al desarrollo de CaCu [24, 31], debido al mayor tiempo de exposición a infecciones por VPH y a que durante la adolescencia existe una inmadurez del tejido cervical, donde la lámina basal de la zona de transformación se encuentra en constante exposición [32]. [32][32][32][32][32][32] Mujeres con una inicio de la vida sexual  $\leq 16$  años tiene un riesgo de 2.3 - 2.5 veces mayor de presentar carcinoma invasivo comparado con las que iniciaron su vida sexual de los 17 a los 20 años (1.5 – 2.1 veces) [31]. Por otra parte, los embarazos a una edad temprana también representan un riesgo mayor para desarrollar CaCu, debido a los cambios físicos como la exposición a hormonas esteroideas del embarazo [31].

El inicio de relaciones a temprana edad es un factor de riesgo importante ya que durante la adolescencia existe una inmadurez del tejido cervical, por lo que la capa basal de la zona de transformación se encuentra en constante exposición [32].

### 1.2.3. Uso de anticonceptivos orales y el riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino

Las mujeres que usan anticonceptivos orales tienen un mayor riesgo de desarrollar lesiones de alto grado [33] y una mayor probabilidad de desarrollar CaCu [31], reportándose un riesgo de 1.29 y 2.54 veces mayor riesgo de padecer carcinoma invasivo e *in situ* respectivamente [34]. Con un mayor tiempo de exposición a los anticonceptivos orales se incrementa el riesgo de desarrollar esta patología [35]. Por otro lado, las pacientes que además presentan infecciones con VPH tienen un incremento del 2.82 veces mayor que las que no usaron anticonceptivos [34].

### 1.2.4. Tabaquismo y cáncer cervicouterino

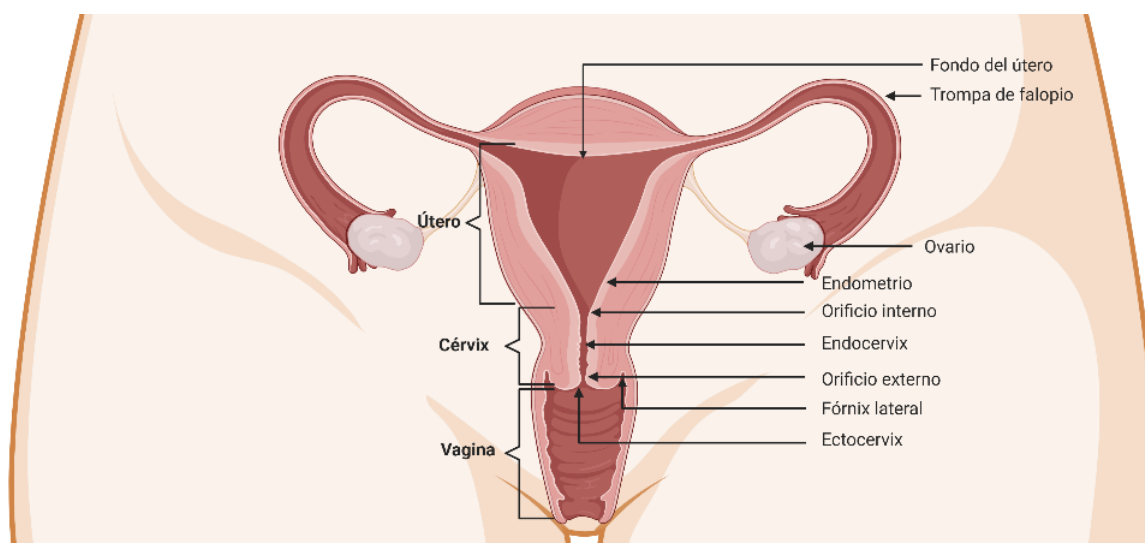
El desarrollo de CaCu se asoció con el uso de tabaco, fumar se considera un factor de riesgo independiente [36]. Las mujeres que fuman tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar carcinoma de células escamosas [37, 38] y el riesgo incrementa aún más con la cantidad de cigarrillos que fuman por día y con un inicio a una edad más temprana [39]. Además, también se considera como un factor de riesgo para desarrollar lesiones de alto grado, carcinoma *in situ*, pero no para adenocarcinoma [40].

Respecto a las infecciones por VPH se determinó que las mujeres fumadoras requieren de un tiempo menor para desarrollar lesiones y cáncer, esto sugiere que el VPH y la duración del tabaquismo tienen una interacción sinérgica [40], las mujeres fumadoras positivas a VPH 16/18 presentan un mayor riesgo de desarrollar CEE [36]. Se ha encontrado nicotina en la mucosa cervical de mujeres fumadoras [36], los químicos presentes en el tabaco ocasionan daños en el ADN de las células epiteliales cervicales.

## 1.3. Anatomía del cuello uterino

El conocimiento de la anatomía del cuello uterino y de los tipos epiteliales que lo conforman es importante para el adecuado proceso de toma de muestra y el diagnóstico clínico, por lo que a continuación describimos generalidades de estos dos aspectos.

El cuello uterino o cérvix se localiza en la parte más baja del útero, está dividido desde la parte superior por la unión fibromuscular, el orificio interno separa el cuello uterino del cuerpo muscular (útero) [41], conecta el útero con la vagina, tiene forma cilíndrica de aproximadamente 3-4 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro (Figura 3). Durante la vida de una mujer ocurren cambios de tamaño y forma, relacionados con la edad, paridad y estado hormonal [42]. El cérvix se mantiene en su posición debido al sostén de los ligamentos uterosacral y lateral, estos consisten en tejido fibroso y músculo liso, contiene en su interior nervios, vasos sanguíneos y linfáticos [41]. Por debajo del epitelio cervical se encuentra el estroma que se compone principalmente de tejido elástico con una menor porción de músculo liso, además tiene suministros vasculares, linfáticos y nerviosos [41, 42].



*Figura 3. Anatomía del aparato reproductor femenino. Se divide principalmente en tres partes, útero, cérvix y vagina. El cérvix está conformado por endocérvix y exocérvix, en la parte superior está delimitado por el orificio interno que conecta con el útero y en la parte inferior con el orificio externo conectando con la vagina. Creado con BioRender.com.*

Anatómicamente el cuello uterino se divide en endocérvix y ectocérvix. El endocérvix es una cavidad luminal recubierta de epitelio columnar que sirve de pasaje entre el orificio externo e interno; el orificio interno o isthmus es el límite superior donde se marca la transición del endocérvix a endometrio (en la cavidad uterina), el canal tiene una forma fusiforme de 7 a 8 mm en su parte más ancha en mujeres en edad reproductiva. En el orificio externo se localiza

el ectocérvix que se recubre de epitelio escamoso estratificado no queratinizante y continúa hasta la vagina, esta zona es visible durante la revisión con espéculo. La unión escamocolumnar (UEC) se localiza en el orificio externo donde se unen el endo y ectocérvix, en esta unión se encuentra la zona de transformación (ZT) en donde se desarrollan la mayoría de los cambios asociados al desarrollo de CaCu [41, 42].

### 1.3.1. Tipos epiteliales del cuello uterino

#### 1.3.1.1. *Epitelio columnar*

La mucosa endocervical normal consiste en túbulos y criptas productoras de moco, éstas están recubiertas de epitelio columnar (también denominado epitelio glandular), se dispone como una sola lámina ordenada de células epiteliales altas y columnares cercanas a la membrana basal, debido a que comprende una sola fila de células es más corta en altura respecto al epitelio escamoso (Figura 4). En la fase proliferativa temprana los núcleos se encuentran ordenados hacia la membrana basal y en la fase proliferativa tardía el citoplasma contiene abundante moco (que sirve de lubricación para el cérvix y vagina). Por debajo de las células columnares se encuentra una lámina simple de células columnares de reserva y a simple vista es de apariencia rojiza debido a una mayor permeación vascular [42]. La parte superior del cuello uterino está fusionado con el tejido endometrial en el cuerpo del útero y la parte inferior se une al epitelio escamoso en la UEC. El canal endocervical no tiene una superficie plana, sino que forma pliegues longitudinales hacia la luz del canal, criptas (a menudo nombradas glándulas endocervicales) que pueden tener una longitud de 5-6 mm [42-44]. El crecimiento excesivo del epitelio columnar puede verse como una masa rojiza que sobresale del orificio externo en una examinación visual del cérvix. Este tipo de epitelio no produce glucógeno, por lo que no se tiñe con yodo [43].

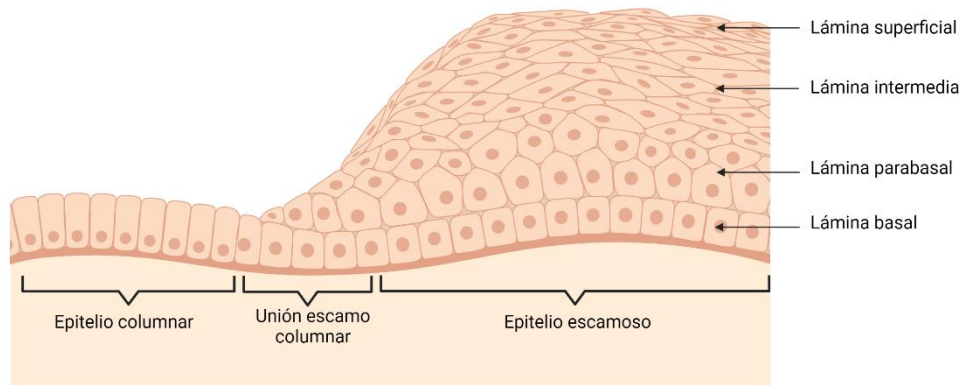


Figura 4. Epitelio escamoso, columnar y unión escamocolumnar. Creado con BioRender.com.

### 1.3.1.2. Epitelio escamoso estratificado

El ectocérvix está recubierto de epitelio escamoso estratificado no queratinizante bien diferenciado, tiene entre 15-20 capas de células es de color rosa pálido cuando se observa en una examinación visual. Este epitelio está organizado desde una membrana basal que son células redondeadas con núcleos grandes y poco citoplasma, esta membrana separa el epitelio del estroma. El proceso de diferenciación comienza en la lámina basal, donde las células se dividen y forman las láminas parabasales, intermedias y superficiales, la diferenciación está acompañada de un incremento de citoplasma y reducción del tamaño de núcleo. Las células de la lámina intermedia y superficial tienen abundante glucógeno, el cual es fácilmente teñido por yodo dando una coloración marrón o caoba. En mujeres postmenopáusicas las células de la lámina parabasal no maduran, en consecuencia, el epitelio escamoso es delgado y atrófico, se vuelve pálido y frágil, por lo que es propenso a traumatismos [42, 44].

### 1.3.2. Unión escamo-columnar

La UEC se observa como un escalón bien trazado que se encuentra entre el endo y ectocérvix (Figura 4), y su localización varía dependiendo de la edad, estado hormonal, afecciones o embarazo [41]. Durante la infancia y antes de la primera menarquia se encuentra muy cerca del orificio externo del cuello uterino, durante la pubertad y periodo reproductivo los órganos sexuales crecen debido a la presencia de estrógeno, el cérvix se agranda y el canal se prolonga, esto en ocasiones produce la eversión del epitelio columnar hacia el ectocérvix, lo que se

conoce como ectropión; erróneamente llamado erosión o úlcera [42]. El moco de las células columnares es destruido cuando el epitelio columnar sufre eversión hacia el ambiente ácido de la vagina, entonces el epitelio es remplazado por epitelio escamoso metaplásico. La metaplasia se refiere al cambio o remplazo de un epitelio por otro [45].

Durante la vida de una mujer, desde la edad reproductiva hasta la perimenopausia la ubicación de la unión escamo columnar se “mueve” del ectocérvix hacia el orificio externo, como consecuencia de la formación de nuevo tejido escamoso metaplásico en las zonas expuestas de epitelio columnar. La formación de epitelio escamoso metaplásico inmaduro evoluciona hasta un epitelio escamoso metaplásico maduro, este es muy similar al epitelio escamoso estratificado original. El desarrollo del epitelio metaplásico inmaduro puede tener dos caminos, el primero de ellos es cuando se forma el epitelio metaplásico maduro que produce glucógeno, esto sucede en la mayoría de las mujeres, sin embargo, en una minoría de mujeres el epitelio metaplásico inmaduro puede evolucionar a una displasia (epitelio que muestra células atípicas con anomalías en núcleo y citoplasma), estos cambios pueden estar asociados a infecciones con algún genotipo de VPH. El crecimiento desmedido puede conducir a la formación de un epitelio displásico e incluso encaminarse a un cáncer invasor [44, 45].

La zona de transformación (ZT) se conoce como la porción del cuello uterino en donde se remplazó o se está remplazando el epitelio columnar por escamoso metaplásico. Es importante reconocer la importancia de la zona de transformación ya que aquí es donde se desarrolla la mayoría de las displasias o lesiones premalignas [44]. La detección temprana es el primer paso para la prevención del desarrollo de CaCu.

#### **1.4. Detección temprana de cáncer cervicouterino**

Las células en la zona de transformación cambian gradualmente, cuando el tejido escamoso metaplásico inmaduro presenta características atípicas como cambios en la proporción núcleo-citoplasma y un crecimiento (proliferación) descontrolado, esto permite la formación de displasias, neoplasias o lesiones premalignas que pueden evolucionar a carcinoma in situ

y al cabo de varios años a CaCu. Estos cambios graduales permiten la detección oportuna mediante citologías cervicales (Papanicolau) y colposcopias.

#### 1.4.1. Detección y tratamiento de las lesiones premalignas

La citología cervical es la prueba estándar para la detección de displasias o lesiones premalignas y CaCu. El Papanicolaou (Pap) es una prueba de análisis citológico, que con una adecuada toma de muestra se pueden detectar anomalías celulares tanto en el endo y ectocérvix. A pesar de ser una prueba de bajo costo y fácil procesamiento presenta resultados falsos negativos o falsos positivos, de un 50 a 60% de estos resultados es debido a una toma de muestra inadecuada [46, 47].

El término de carcinoma y adenocarcinoma *in situ* fue definido por Broders en 1932, lo describió como zonas en el epitelio en donde las células cancerígenas no han invadido el estroma ni estructuras linfáticas y se encuentra aún delimitado por la membrana basal y puede avanzar a un carcinoma invasor [48, 49]. Después fue necesario diferenciar la atipia cervical que se encontraba entre un epitelio con características normales y el carcinoma *in situ*. Reagan en la década de los cincuenta las denominó displasias que categorizó en tres grupos: leve, moderada y severa [45, 50], se observó que algunos casos de displasia podían retroceder, persistían o progresaban a carcinoma *in situ*, proceso en el que los cambios del epitelio son continuos y evolutivos, por lo que en 1967 Richart determinó una nueva clasificación, la cual tomaba en cuenta estos cambios, las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) se agruparon en tres grados NIC 1, 2 y 3, las NIC 1 correspondían a las displasias leves, NIC 2 a las displasias moderadas y las NIC 3 a las displasias severas y carcinoma *in situ* [45, 51, 52]. Años después se comenzaron a describir más alteraciones que incluían células coilocíticas y condilomas asociados a infecciones por el VPH y en 1990 para incluir estos nuevos hallazgos se reformuló la terminología de las neoplasias intraepiteliales cervicales NIC de bajo grado: células coilocíticas y NIC 1, y NIC de alto grado: NIC 2, NIC 3 y carcinoma *in situ* [45, 53]. Fue necesario unificar las pruebas de laboratorio y la forma en que se reportaban los resultados de las citológicas cervicales. En diciembre de 1988 el National Cancer Institute (NCI) formuló la primera versión el Sistema Bethesda, este se fundamentó en tres principios básicos para la terminología que debía ser (1) clínicamente

relevante, (2) razonablemente reproducible y flexible y (3) que refleje la comprensión más actual de neoplasia cervical [46].

Por primera vez para las lesiones escamosas se introdujeron dos términos nuevos las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG), que incluye infección por VPH / displasia leve / NIC 1 y las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG), incluye displasia moderada y grave / carcinoma *in situ* / NIC 2 y NIC 3. Para las “atipias” de células escamosas: atípicas de significado indeterminado (ASC-US, por sus siglas en inglés) y en las que no se puede excluir LEIAG (ASC-H, por sus siglas en inglés) [54-56].

Para las células glandulares se usó una terminología diferente debido a la naturaleza del tejido, el adenocarcinoma endocervical *in situ*, adenocarcinoma: endocervical, endometrial, extrauterino y NOS (*not otherwise specified*), para las “atipias” se clasifica como células glandulares atípicas (AGC, por sus siglas en inglés) y las células glandulares atípicas que favorecen la neoplasia. La “atipia” fue definida para los casos en que las características citológicas no eran suficientes para clasificarlas como lesiones [54-56]. La correlación entre los diferentes sistemas y terminología de lesiones premalignas se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Equivalencia de terminología entre displasia, NIC y el Sistema Bethesda

(1953)	NIC (1967)	NIC modificada DISPLASIA (1990)	Sistema Bethesda (2014)
Normal	Normal	Normal	Negativo para lesión intraepitelial o malignidad Cambios celulares benignos (infección o reparación) ASCUS/AGC
Atipia	Atipia coilocítica, condiloma plano, sin cambios epiteliales	NIC de bajo grado	LEIBG
Displasia leve	NIC 1	NIC de bajo grado	LEIBG
Displasia moderada	NIC 2	NIC de alto grado	LEIAG
Displasia severa	NIC 3	NIC de alto grado	LEIAG
Carcinoma <i>in situ</i>	NIC 3	NIC de alto grado	LEIAG
Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

*NIC: neoplasia intraepitelial cervical, LEIBG: lesión escamoso intraepitelial de bajo grado, LEIAG: lesión escamosa intraepitelial de alto grado. ASCUS: atipia de células escamosas de significado indeterminado, AGC atipia de células glandulares de significado indeterminado*

La prevención del CaCu se lleva a cabo a través de la citología cervical, las pruebas moleculares que permiten la identificación del VPH y la vacunación profiláctica [46].

La colposcopia es un método para examinar el cuello uterino, es un método complementario para la detección de CaCu y rutinariamente esta prueba es solicitada cuando existe una LEIBG o LEIAG en el reporte citológico [57].

En México existe la Norma Oficial NOM-014-SSA2-1994 Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvicouterino, en esta norma se ha establecido el protocolo que sirve de guía para que el médico determine el tratamiento a seguir con base en el resultado el reporte de la citología cervical.

En México la prueba de Papanicolaou es la principal herramienta para la detección de lesiones premalignas y CaCu (IMSS 2011, Granados-García, Flores et al. 2014). Desde 2013 se han realizado entre 2.7 y 3 millones de pruebas de Papanicolau de primera vez cada año (IMSS 2019), sin embargo, los falsos negativos resultan en altos costos de tratamiento al no detectar a las mujeres con lesiones precursoras y cáncer (Granados-García, Flores et al. 2014).

### **1.5. Diagnóstico clínico y estadificación de cáncer cervicouterino**

El diagnóstico de cáncer se realiza tomando una biopsia, mediante esta se determinan las características histológicas del tumor y posteriormente el oncólogo evalúa el reporte patológico y características clínicas de las pacientes para determinar el estadio en el que se encuentra de acuerdo con la clasificación de la Federación de Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) [58].

A finales de 1920 la Radiological Sub-Commission of the Cancer Commission of the Health Organization of the League of Nations dictó las primeras reglas para clasificar y estadificar los cánceres genitales entre ellos el de cuello uterino. Después en 1958 la International Federation of Gynecology and Obstetrics lo adoptó, desde entonces estadificar los tumores cervicales se volvió de gran importancia, ya que con esto se busca tener una terminología uniforme para facilitar el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de las pacientes, además del intercambio de conocimiento entre personal de la salud [58, 59].

Actualmente las directrices para determinar el estadio clínico en el que se encuentra una paciente con CaCu se basan en la última actualización FIGO [58], en esta se han incorporado estudios de imagenología y evaluación patológica de tejidos pélvicos y la evaluación de nódulos linfáticos pélvicos y para-aórticos, a diferencia de la clasificación de 2009 en la que se solo se incluían la observación macroscópica y la profundidad de la invasión estromal.

La estadificación FIGO se encuentra fundamentada en el tamaño de tumor, invasión estromal, a nódulos linfáticos, pélvicos y para-aórticos así como la invasión a órganos distantes, se muestra en la Tabla 2.

*Tabla 2. Estadificación FIGO para CaCu [58].*

<b>Estadio I</b>	
El carcinoma se encuentra estrictamente confinado al cuello uterino, la invasión lateral no modifica el estadio.	
<b>IA</b>	La invasión solo fue diagnosticada por microscopía, con una profundidad de invasión < 5.0 mm (los espacios vasculares y linfáticos no cambian el estadio)
<b>IA1</b>	Invasión estromal de < 3 mm
<b>IA2</b>	Invasión estromal de ≥ 3 mm y < 5 mm
<b>IB</b>	La invasión tiene una profundidad de ≥ 5 mm y está limitada al cuello uterino
<b>IB1</b>	Carcinoma invasor con una profundidad de ≥ 5 mm y < 2 cm en la mayor dimensión
<b>IB2</b>	Carcinoma invasor con una profundidad de ≥ 2 cm y < 4 cm en su mayor dimensión
<b>IB3</b>	Carcinoma invasor con una profundidad de ≥ 4 cm en su mayor dimensión
<b>Estadio II</b>	
El carcinoma invadió la parte baja del útero, pero no se extendió al tercio inferior de la vagina o a las paredes pélvicas	
<b>IIA</b>	Implicación limitada a los dos tercios superiores de la vagina sin invasión parametrial
<b>IIA1</b>	Carcinoma invasivo < 4 cm en su mayor dimensión
<b>IIA2</b>	Carcinoma invasivo ≥ 4 cm en su mayor dimensión
<b>IIB</b>	Con invasión en parametrios, pero no en pared pélvica
<b>Estadio III</b>	

El carcinoma afecta el tercio inferior de la vagina y/o se extiende hasta la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o disfunción del riñón y/o involucra nódulos linfáticos pélvicos o para-aórticos

- IIIA** El carcinoma involucra el tercio inferior de la vagina, pero no tiene extensión a la pared pélvica
- IIIB** Extensión a la pared pélvica y/o hidronefrosis o disfunción del riñón (a menos que se sepa que se debe a otra causa)
- IIIC** Involucra nódulos linfáticos pélvicos y para-aórticos, independientemente del tamaño de tumor y extensión
  - IIIC1** Metástasis únicamente en nódulo linfático pélvico
  - IIIC2** Metástasis en nódulo linfático para-aórtico

<b>Estadio IV</b>	
El carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis o ha involucrado (probado por biopsia) la mucosa de vejiga o recto. Un edema ampolloso no permite que un caso se asigne a estadio IV	
<b>IVA</b>	Propagación de crecimiento a órganos adyacentes
<b>IVB</b>	Propagación a órganos distantes

La clasificación UICC TNM Classification of Malignant Tumors (Tabla 3), es un sistema basado en la extensión ganglionar primaria y regional del tumor, así como la ausencia o presencia de metástasis, esta clasificación tiene tres categorías T: describe el sitio del tumor primario, N: describe los nódulos linfáticos afectados y M: presencia o ausencia de la diseminación de metástasis a distancia [58, 60]. Esta clasificación se usa con menos frecuencia en el diagnóstico de CaCu, además no se ha unificado con la reciente actualización de FIGO.

Tabla 3. Clasificación TNM para CaCu y FIGO [61]

TNM	FIGO	
<b>TX</b>		
<b>El tumor primario no se puede evaluar</b>		
<b>T0</b>		
<b>No existe evidencia del tumor primario</b>		
<b>Tis</b>	<b>0</b>	
<b>Carcinoma <i>in-situ</i> (carcinoma pre-invasivo)</b>		
<b>T1</b>	<b>I</b>	
<b>Carcinoma confinado al cuello uterino</b>		
<b>T1a</b>	<b>IA</b>	Carcinoma invasivo diagnosticado sólo por microscopia
<b>T1a1</b>	<b>IA1</b>	Invasión estromal $\leq 3.0$ mm de profundidad y $\leq 7.0$ mm en diseminación horizontal
<b>T1a2</b>	<b>IA2</b>	Invasión estromal $> 3$ mm y $\geq 5$ mm
<b>T1b</b>	<b>IB</b>	Lesión clínicamente visible confinada al cérvix o lesión microscópica más grande que T1a2/IA2
<b>T1b1</b>	<b>IB1</b>	Lesión clínicamente visible, 4 cm o menos en su mayor dimensión

<b>T1b2</b>	<b>IB2</b>	Lesión clínicamente visible > 4 cm en su mayor dimensión
<b>T2</b>	<b>II</b>	
<b>El tumor invade más allá del útero, pero no la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina</b>		
<b>T2a</b>	<b>IIA</b>	Sin invasión parametrial
<b>T2b</b>	<b>IIB</b>	Con invasión parametrial
<b>T3</b>	<b>III</b>	
<b>El tumor se ha extendido a la pared pélvica, involucra el tercio inferior de la vagina o causa hidronefrosis o mal funcionamiento del riñón</b>		
<b>T3a</b>	<b>IIIA</b>	El tumor involucra el tercio inferior de la vagina, pero no extensión a la pared pélvica
<b>T3b, N1</b>	<b>IIIB</b>	El tumor se extiende a la pared pélvica o causa hidronefrosis o mal funcionamiento del riñón
<b>T4</b>	<b>IVA</b>	
<b>El tumor invade la mucosa del vejiga o recto o se extendió más allá de la pelvis</b>		
<b>M1</b>	<b>IVB</b>	Propagación a órganos distantes

### 1.5.1. Biomarcadores en cáncer cervicouterino

El principal método de prevención y detección para CaCu es el Pap y el análisis histológico de muestras cervicales. Sin embargo, el Pap tiene limitantes en la sensibilidad y especificidad, debido a errores de muestreo, interpretación de los resultados y a los falsos positivos/negativos. Por otro lado, el análisis histológico que se obtiene mediante una biopsia del cuello uterino está limitado a la experiencia del personal que lo analiza. Con el tiempo se han buscado nuevos marcadores específicos de la enfermedad, con poco éxito, algunos de estos se describen a continuación.

CEA, CA19-9, CA125 se han estudiado como biomarcadores séricos en CaCu. Se encontró que incrementaban en el suero de las pacientes, CEA y CA 19-9 correlacionaron con el estadio clínico y fueron aún más elevados en pacientes con adenocarcinoma [62].

La identificación del genoma de VPH se ha propuesto como un marcador temprano de CaCu, un resultado positivo siempre requiere de seguimiento. La identificación de los genotipos, así como de las oncoproteínas E6 y E7 son importantes, ya que son capaces de modificar funciones fundamentales como regulación de la transcripción, reparación del ADN, evasión del sistema inmune, están implicadas en la organización y diferenciación epitelial, control del ciclo celular, promueven la proliferación, polaridad, y contactos célula-célula [63].

La proteína p16<sup>INK4a</sup> que actúa como un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina en células normales y es un integrante del control del ciclo celular. El incremento de los niveles de p16<sup>INK4a</sup> resulta en la hiperfosforilación de pRB y la liberación del factor de transcripción E2F, permitiendo la progresión del ciclo celular en la fase S [64]. En tejidos cervicales normales no es evidente la presencia de p16<sup>INK4a</sup> por el contrario en muestras de lesiones de alto grado se identifica con una sensibilidad de 99.9% y especificidad de 100%, sin embargo, el valor pronóstico de p16<sup>INK4a</sup> ha sido poco explorado en biopsias cervicales [63].

La expresión de Ki-67 se asocia con la proliferación celular, se presenta durante la fase activa G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y mitosis, pero no en G<sub>0</sub>. El marcaje de Ki-67 en tejidos correlaciona con peores pronósticos de la enfermedad [65]. Se ha estudiado en cáncer de mama y próstata. Ki-67 en muestras de tejido cervical no fue detectada en tejido normal, pero fue positiva en lesiones de bajo y alto grado y carcinoma escamoso, y correlacionó positivamente con el grado de lesión. Ki-67 presentó una sensibilidad de 95.2% y una especificidad de 86.7%. Posteriormente se evaluó el valor diagnóstico de la combinación de p16 y Ki-67. Los datos correlacionaron significativamente. La sensibilidad de la combinación fue de 94.8% y la especificidad de 93.2% [66].

El antígeno de células escamosas (SCC-Ag), es una glicoproteína usada como marcador tumoral temprano para diagnóstico y valoración de la respuesta a tratamiento en la práctica clínica. Los niveles séricos de SCC-Ag se correlacionaron con el estadio clínico [63] y la alta expresión de SCC-Ag se asoció estadios clínicos más avanzados, tumor primario de mayor tamaño, afectación ganglionar y linfática [67], mal pronóstico y menor supervivencia [68].

A pesar de existir una batería amplia de biomarcadores tanto para diagnóstico como seguimiento de tratamiento del CaCu, no han sido usados como parte de la práctica clínica. Por lo que es importante continuar con la búsqueda y en el futuro la aplicación de estos en el campo de la medicina.

## 1.6. Galectinas

### 1.6.1. Generalidades de las galectinas

Las galectinas son una familia de proteínas cuya principal función es el reconocimiento de glicoconjugados que presentan en su estructura arreglos glicánicos con galactosa. Estas lectinas se unen a glicoconjugados que en su estructura tienen  $\beta$ -galactósidos Gal  $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc [69]. Los glicoconjugados pueden encontrarse unidos a péptidos, proteínas o lípidos [70]. Las galectinas son proteínas que pertenecen a lectinas tipo S; se denominaron así ya que el primer miembro descubierto dependía de la solubilidad en sulfidrilo [71], también son denominadas S-Lac ya que son solubles y reconocen lactosa [72].

Las galectinas tiene la capacidad de reconocer glicoconjugados gracias a su dominio de reconocimiento a carbohidratos (*carbohydrate-recognition domain*, CDR por sus siglas en inglés), y tienen una extensión aproximada de 130 aminoácidos [73]. El CDR estructuralmente se compone de 5-6 cadenas en  $\beta$ -hojas antiparalelas en configuración  $\beta$ -sandwich [72] algunos miembros están unidos por un péptido de unión y otros tienen un extremo peptídico. El reconocimiento e interacción con los carbohidratos se realiza mediante puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de Van der Waals [70]. Se han identificado 15 galectinas; 12 de las cuales han sido identificadas en humanos, estas se clasifican de acuerdo con el CDR y se agrupan en tres subtipos:

Las galectinas prototipo comprenden a las galectinas con un único CDR, este puede asociarse con otro CDR para formar homodímeros. Las galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 y 15 pertenecen a este grupo.

El subtipo quimérico que se caracteriza por tener un único CDR y un extremo no lectina en el extremo amino terminal. A través del CDR en el carboxilo terminal es capaz de interactuar con carbohidratos y el extremo amino interactúa con otros ligandos, como polipéptidos y polinucleótidos, este extremo es rico en prolina, glicina y tirosina, y contribuye a la auto-agregación y oligomerización, además es sensible a metaloproteinasas. El único miembro de este grupo es la galectina-3.

Repetición en tándem: este grupo tiene dos CDRs unidos mediante un pequeño dominio peptídico de 5-50 aa, este grupo es capaz de formar oligómeros con otras galectinas u otras moléculas de diferente naturaleza, incluye a las galectinas 4, 6, 8, 9 y 12 [70]

La organización genética de las galectinas en mamíferos se ha conservado a través de la evolución, con el paso del tiempo ocurrió una duplicación de un gen mono-CDR, resultando en un gen bi-CDR. Los N-CDR y C-CDR se bifurcaron en dos subtipos: F4-CDR y F3-CDR, así las galectinas con un CDR pertenecen al subtipo F3 (galectinas-1, 2, 3, 5) o F4 (galectinas 7, 10, 13, 14) y las de repetición en tándem tienen ambos genes [70, 74]. Algunos transcritos de las galectinas son procesadas por *splicing* alternativo, generándose diferentes formas de ARNm [70] que dan origen a variantes de ARN mensajero o proteicas como es el caso de la galectina-8 en humano [75], la galectina-9 (Gal-9) en humano [76] o la galectina-4 (Gal-4) en cerdo [77].

### 1.6.2. Mecanismo de secreción de las galectinas

Las galectinas son sintetizadas en el citosol, en polisomas libres donde son acumuladas antes de la secreción [70]. Sobre el mecanismo de secreción de la familia de las galectinas se ha descrito muy poco, estas proteínas carecen de secuencia de señalización y de exporte, además no presentan dominios de anclaje a la membrana, por todas las características anteriores se ha propuesto que son secretadas por una vía no clásica, además no atraviesan el retículo endoplasmático ni el aparato de Golgi, por lo que no presentan modificaciones postraduccionales como glicosilación [78]. [78]. Las galectinas son exportadas hacia la superficie celular mediante vesículas (exosomas, que se producen mediante protuberancias en la membrana, donde se ha acumulado la proteína) [79], después de secretarse las galectinas pueden re-ingresar a la célula por endocitosis y ayudar a remodelar el citoesqueleto para modular la propagación y adhesión celular a través de la recirculación de integrinas [80].

El mecanismo de secreción de las galectinas -1 y -3 se han estudiado en comparación con el resto de las galectinas. La secreción en mioblastos de la galectina-1 (Gal-1) puede ocurrir por evaginaciones de la membrana plasmática en forma de vesículas enriquecidas [70]. La galectina-3 (Gal 3) tiene la capacidad de formar oligómeros que permiten su secreción mediante la vía no convencional esto es dependiente de su dominio N-terminal [81], cuando se eliminaron los primeros 12 residuos del N-terminal se bloqueó su exporte al sobrenadante celular [82]. Gal-3 puede interactuar con lípidos de la membrana y moverse espontáneamente a través de la bicapa lipídica, una translocación directa que no requiere de proteínas membranales. La interacción de Gal-3 con la membrana plasmática puede

involucrar dominios ricos en colesterol, donde Gal-3 se concentra y forma multímeros o interactúa con enlaces covalentes con otras proteínas [83, 84].

### 1.6.3. Localización subcelular y unión a ligandos

La localización subcelular de las galectinas depende del tipo celular en que se expresa, se ha detectado en citoplasma, en núcleo, formando parte de la matriz extracelular e interactuando con receptores anclados en la membrana, también en circulación en torrente sanguíneo [70, 85]. En condiciones fisiológicas las galectinas se pueden encontrar en forma monomérica, algunas pueden formar entramados con los glicoconjugados provocando agregaciones [85], además las galectinas con CDR diferentes pueden formar dímeros no covalentes para incrementar su valencia, esta multivalencia permite llevar a cabo funciones extracelulares eficientemente. La Gal-9 regula su multivalencia mediante la formación de entramados (*galectin-ligand lattices*) con glicanos de alta afinidad en la superficie celular [86]. Las galectinas se unen a ligandos que presentan en su estructura  $\beta$ -galactósidos, como moléculas componentes de la matriz extracelular: laminina, fibronectina celular y plasmática, vitronectina, pueden modificar la remodelación de la matriz extracelular (MEC) y en consecuencia las interacciones células-células o células-MEC [87].

Las galectinas también pueden formar interacciones proteína-proteína, como se ha reportado para la Gal-1 [87]. El reconocimiento e interacción con sus ligandos es complejo, este depende de varios factores como: la afinidad de unión, la presentación espacial de los glicanos [88], ya que esto puede dar origen a la formación de especies multivalentes [86, 89].

### 1.6.4. Funciones celulares de las galectinas

Las galectinas se han conservado a través de la evolución, lo que apoya su participación en procesos celulares importantes. Se ha reportado su participación en el desarrollo temprano de organismos, en la regeneración y mantenimiento de tejidos, participan en la modulación de la respuesta inmune y en el control o progresión del cáncer mediante interacciones extra, intra e intercelulares [90].

En la superficie celular pueden modular funciones como adhesión celular, regulación del crecimiento celular, apoptosis [91], inflamación, embriogénesis, diseminación tumoral,

pueden interactuar con ligandos para regular las funciones celulares e intervenir en procesos fundamentales como la expresión génica [70, 73] y el *splicing* del pre-ARNm (Gal-1 y Gal-3 [91]) [70].

La modulación de la adhesión celular a través de la participación de las galectinas se debe al reconocimiento de glicoproteínas presentes en la membrana y matriz extracelular (MEC), estas proteínas son capaces de reconocer poli-N-acetilactosamina, el glicano de mayor presencia en la MEC, también reconoce laminina, fibronectina, proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP 1 y 2) y CD45, las galectinas modulan interacciones célula-célula y célula-MEC [92]. La Gal-1 inhibe la interacción de mioblastos con laminina, mediante el bloqueo del receptor de laminina.

#### 1.6.5. Expresión de galectinas en tejidos

Las galectinas se expresan en una amplia variedad de tejidos de mamíferos, algunas galectinas tienen expresión tejido-específica que puede ser regulada durante la diferenciación celular. Las galectinas son capaces de regular procesos como el desarrollo de órganos y tejidos, en algunas ocasiones la expresión se modifica bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas [93].

Las galectinas se expresan en diferentes tejidos humanos, algunas coexisten en el mismo tejido, mientras otras son tejido específicas [73, 93], en algunos tejidos las galectinas se expresan en ciertas etapas del desarrollo como la embriogénesis o son características de alguna etapa de desarrollo [92]. Algunos ejemplos de la expresión de galectinas en tejidos se muestran a continuación: Gal-1 se expresa en músculo esquelético, corazón, placenta, tejido linfático; la Gal-3 se expresa especialmente en macrófagos y células epiteliales; Gal-4 se expresa principalmente en intestino, estómago, neuronas, vasos sanguíneos; galectina-6 (Gal-6) en tracto digestivo; galectina-7 (Gal-7) en tracto gastrointestinal, epitelio, corazón fetal; galectina-8 (Gal-8) hígado, riñón, músculo cardíaco, pulmón y cerebro; galectina-9 (Gal-9) en linfocitos-T, intestino delgado, hígado, epitelios; galectina-14 (Gal-14) en eosinófilos [85, 93].

### 1.6.5.1. Galectinas y el desarrollo de cáncer

Los sellos distintivos del cáncer “Hallmarks of cancer” descritos por Hanhan y Weinberg, están relacionados con los procesos para el crecimiento, supervivencia, invasión y metástasis del tumor [94-96]. Las galectinas han ganado cada vez más importancia debido a que participan en procesos como proliferación, invasión y metástasis, angiogénesis, control de ciclo celular entre otras. Hablar de galectinas y cáncer es un tema amplio, sin embargo, se proporcionarán ejemplos de algunas de éstas.

La capacidad que presentan las células cancerígenas para invadir otro tipo de tejidos a distancia se conoce como metástasis, en primer lugar la célula maligna invade el tejido circundante del tumor primario, entra en la microvasculatura linfática y sanguínea (lo que se conoce como intravasación), si es capaz de sobrevivir se traslada mediante el torrente sanguíneo a los microvasos de tejidos distantes y sale del torrente sanguíneo (extravasación), se adapta al microambiente nuevo, comienza a proliferar y forma el tumor secundario macroscópico ( la colonización) [97].

La sobre regulación de Gal-1 promueve la migración e invasión en células de cáncer de ovario. En tejido de pacientes se encontró una mayor expresión tanto del ARNm y como de la proteína, y se identificó en el citoplasma y en células del estroma. La expresión de Gal-1 se asoció con invasión, estadio avanzado, metástasis y mayor recurrencia [98]

En cáncer colorrectal se producen cantidades considerables de mucina en la superficie celular, esta es una glicoproteína altamente glicosilada [99]. Mucina-1 (MUC1) es una proteína transmembrana, el 50%-80% de su peso está representado por glicanos O-GalNAc [100]. MUC1 está incrementada en diferentes tipos de cáncer y se asocia con malignidad y mal pronóstico [101]. MUC1 presenta un incremento de oligosacáridos cortos, como el antígeno oncofetal Thomsen-Friedenreich (TF), este se encuentra oculto por la glicosilación y sialilación, sin embargo, se revela en procesos de cáncer. MUC1 es un ligando natural de Gal-3 y mediante el antígeno TF induce la polarización de MUC1 incrementando así la adhesión. La sobreexpresión de MUC1 en la superficie celular sirve de protector para inhibir la adhesión entre células cancerosas y endotelio, la interacción de MUC1 con Gal-3 reduce el efecto protector debido al agrupamiento/polarización y la exposición de moléculas de

adhesión como CD44 y el ligando para E-selectina endotelial y en consecuencia promueve la metástasis [102].

El reconocimiento de Gal-3 con polilactosaminas permite las interacciones homotípicas y heterotípicas que se encuentran involucradas en el desarrollo de cáncer [103]. Además, Gal-3 reconoce a  $\beta$ -galactosa en posición terminal en el antígeno T, promoviendo la adhesión de las células cancerígenas al endotelio y en consecuencia la metástasis; esto fue suprimido mediante una inhibición con P-30, un péptido capaz de enmascarar al antígeno-T [104].

La interacción del gangliósido GM1 y Gal-1 en la superficie celular de neuroblastoma humano modula la proliferación celular, por otro lado, la Gal-4 tiene la capacidad de unirse independientemente del gangliósido GM1, pero no actúa como un regulador del crecimiento [105].

En muestras de tejido de pacientes con CaCu la expresión de Gal-9 se asoció con el tamaño de tumor. Particularmente las biopsias con alta expresión de Gal-9 se correlacionaron positivamente con un mayor tamaño de tumor. El tamaño de tumor se considera un factor crítico para establecer el tratamiento y es un factor pronóstico independiente en cada etapa de CaCu. La alta expresión de Gal-9 se asoció con estadios más avanzados (III-IV). Gal-9 podría estar involucrada con el desarrollo tumoral ya que en otros tipos de cáncer facilita la proliferación y progresión del ciclo celular [106].

En tejidos de pacientes con carcinoma hepatocelular, Gal-9 tuvo una menor expresión respecto su contraparte saludable, además en pacientes con alta expresión de Gal-9 el pronóstico fue desalentador [107].

La expresión de Gal-9 tanto el ARNm como la proteína en tejido de muestras de pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal fue mayor respecto a tejidos sanos, se expresó tanto en células tumorales como en leucocitos intratumorales. Aunque no se asoció con el tamaño de tumor, después de una quimioterapia neoadyuvante la expresión de Gal-9 se redujo significativamente. Adicionalmente se encontró que las células infiltradas en el tumor tienen una mayor expresión de Gal-9 respecto a las células de muestras sanguíneas del mismo paciente, como las células T, especialmente las TCD4+ TCD8+ [108].

### 1.6.6. Galectinas séricas como biomarcadores en enfermedades

Las galectinas son de naturaleza soluble, por lo que pueden encontrarse en circulación, suero y/o plasma [85], los niveles séricos o plasmáticos de estas proteínas podrían fungir como marcadores para diagnóstico de cáncer.

Los niveles de Gal-1 y Gal-3 en suero fueron más altos en los pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (EII). La concentración óptima de Gal-1 para diferenciar pacientes con EII de los sanos, fue de 4.1 ng/ml con una sensibilidad de 71% y una especificidad de 87% por otro lado, Gal-3 tuvo un límite de 38.5 ng/ml con una sensibilidad de 53% y especificidad de 87%. Estas galectinas pueden inducir la secreción de citocinas proinflamatorias al endotelio, epitelio o células T. La interacción de estas galectinas promueve la secreción endotelial de IL-6, G-CSF y GM-CSF y la epitelial de IL-10, IL-25 Y TGF- $\beta$ 1. Por sí misma la condición inflamatoria de la EII se asocia directamente con la secreción de citocinas, el incremento de los niveles Gal-1 y -3 en suero puede participar en la progresión y su detección tiene un potencial de utilidad clínica como biomarcador [109].

En pacientes con accidentes cerebrovasculares ateroscleróticos, los niveles séricos de Gal-3, Gal-9 y Gal-3BP (*galectin-3 binding protein*) fueron más altos respecto a los controles. Los niveles más altos de Gal-3 sérica permiten predecir de forma independiente un resultado desfavorable en el día 90 después de un accidente isquémico cardiovascular. Gal-3 podría funcionar como un blanco terapéutico para este tipo de patología [110].

#### 1.6.6.1. Galectinas séricas en cáncer

En diferentes tipos de cáncer los cambios de concentración de las galectinas circulantes se ha asociado con malignidad y características clínico-patológicas. Aún se desconoce si su presencia en suero y/o plasma es debido a la secreción desde el tejido o la respuesta del sistema inmune.

En pacientes con cáncer de ovario epitelial y metástasis, la concentración de Gal-1 en suero incrementó y luego de la cirugía de resección este disminuyó. Es posible que la presencia de Gal-1 circulante sea producida y secretada por los tumores, aunque también células peri tumorales, como las estromales son capaces de secretarla (en estudios *in vitro*). Gal-1 puede

favorecer la metástasis mediante las interacciones entre las células tumorales y las proteínas de la matriz extracelular y promoviendo la permeabilidad vascular del tumor [98].

El nivel de Gal-3 plasmático y sérico incrementó en los pacientes con cáncer de mama [111, 112]. En los pacientes con tumores de bajo grado (I y II) y los sometidos a quimioterapia la concentración en plasma fue aún mayor. Después de 84 meses libres de enfermedad los pacientes presentaron concentraciones hasta 5 veces mayor respecto a los niveles antes de la quimioterapia, los niveles de Gal-3 en plasma podrían ser un predictor de la respuesta a la quimioterapia [111]. En suero de pacientes se determinó el punto de corte para predecir el desarrollo de cáncer de mama en 3.17 ng/ml con una sensibilidad de 75% y especificidad de 65.71% [112]. Por otro lado, Gal-1 sérica incrementó en pacientes con estadios avanzados y se correlacionó con tamaño de tumor. Se mostró que la combinación de los marcadores CA15-3 y Gal-1 mejoró la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico y pronóstico de cáncer de mama [113].

Los pacientes con cáncer pancreático mostraron una correlación positiva de Gal-3 sérica con los parámetros clínicos de sexo, edad, tamaño de tumor, localización de tumor metástasis ganglionar, metástasis a distancia y estadio TNM. Los niveles de Gal-3 sérica disminuyeron después de la resección radical y el seguimiento de seis meses mostró que la tasa de metástasis y recurrencia fue menor en este grupo, mientras el nivel de Gal-3 sérica sea mayor la supervivencia disminuye. Gal-3 sérica podría servir como un marcador predictivo para pacientes de alto riesgo, ya que en el estadio III presentó una mejor sensibilidad y especificidad [114].

En cáncer gástrico Gal-3 sérica incrementó y se correlacionó significativamente con metástasis en los ganglios linfáticos y metástasis a distancia. La capacidad para distinguir entre un paciente con cáncer gástrico de uno sano fue de 0.843 con un valor de corte de 13,30 ng/ml, una sensibilidad del 77% y la especificidad de 82,7%. Gal-3 podría ser biomarcador sérico potencial para el diagnóstico de cáncer gástrico [115].

Gal-9 es una de las proteínas que se ha estudiado recientemente y se ha reportado un incremento en la concentración sérica de pacientes con cáncer. Los niveles séricos de Gal-9 en pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal fueron más elevados respecto a los

controles sanos, con una capacidad discriminativa de 0.776, Gal-9 tiende a incrementar en estadios I-III, pero en el estadio IV disminuyó, en este estadio los pacientes supervivientes a largo plazo (>12 meses) los niveles de Gal-9 fueron más bajos respecto a los de corto plazo (<12 meses). Este tipo de cáncer presenta una supervivencia a 5 años del 9%, actualmente y CA19-9 es el único biomarcador aprobado para este tipo de cáncer. Los pacientes podrían estratificarse como supervivientes a largo o a corto plazo en función a los niveles séricos de Gal-9 [108].

En pacientes con carcinoma hepatocelular Gal-9 plasmática tuvo una mayor concentración que en los controles sanos, el análisis mostró que Gal-9 puede ser un predictor independiente de recurrencia, metástasis y de pronóstico [107]. En pacientes con leucemia linfocítica crónica se encontró un incremento de Gal-9 sérica que se asoció con progresión de la enfermedad, los factores pronósticos negativos y la respuesta al tratamiento, se proponen más estudios para considerarlo como un marcador pronóstico [116].

Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado a la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y respuesta a tratamiento. Gal-9 sérica incrementó la concentración en pacientes con CaCu respecto a los controles sanos y lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado [117, 118]. Al analizar las características clínico-patológicas inherentes de la enfermedad se observó que Gal-9 sérica tiende a incrementar con etapas clínicas más avanzadas. Respecto al tratamiento de CaCu se observó que Gal-9 sérica incrementó en las pacientes después de recibirlo, las pacientes que respondieron al tratamiento sin presentar recaídas mostraron una menor concentración de Gal-9 sérica después de seis meses respecto a las no respondedoras, por lo que Gal-9 sérica podría ser un indicador de progresión de la enfermedad [117].

## 1.7. La participación de la galectina-4 en las funciones celulares y el cáncer

### 1.7.1. Características generales

La Gal-4 es una proteína codificada por el gen *LGALS4*, el cual se encuentra en el locus 19q13.2 (ID: 3960), tiene un tamaño aproximado de 12 Kb, y se transcribe a un ARNm de 1.3 Kb, el mensajero maduro está formado por 10 exones [119]. Mediante un análisis *in silico* se han identificado algunos sitios putativos de inicio de la transcripción, el principal sitio de inicio se localizan en el nucleótido (nt) -55 a 33 bases río debajo de la caja TATA; otros sitios de inicio de la transcripción se han identificado en las posiciones -184, -65 y -58, presentando niveles más bajos de transcripción [120]. En la región promotora se han reportado sitios putativos de unión a factores de transcripción como: HNF-4, MyoD, c-Rel, HNF-3 $\beta$ , CAAT, C/EBP, estos factores se han asociado al desarrollo epitelial, diferenciación y transformación maligna, también se encontró un sitio de unión para la proteína de unión potenciadora (*enhancer binding protein*) y otro para HFH-2 (Figura 5). CAAT y C/EBP se expresan en células diferenciadas de hígado, en células epiteliales de intestino, también se expresan durante la diferenciación de queratinocitos y en epitelio escamoso [120].

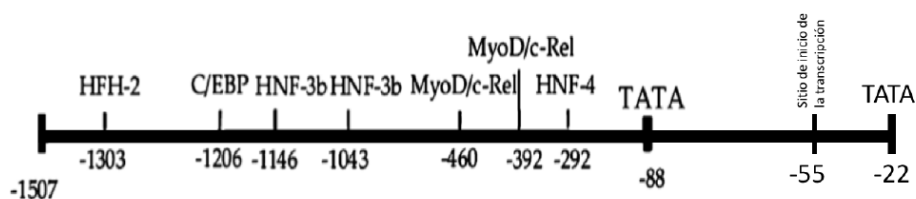


Figura 5. Representación esquemática de la región promotora del gen *LGALS4*. Se presentan los sitios putativos de unión a factores de transcripción. Imagen modificada de Huflejt & Leffler 2004.

La Gal-4 es una proteína que pertenece al subtipo de repetición en tándem, tiene dos CDR distintos en el extremo N-terminal y en el C-terminal, estos dominios se encuentran conectados por un péptido enlazador [120]. La proteína tiene un peso aproximado de 36 kDa y se conforma de 323 residuos de aminoácidos (aa). El dominio N-terminal comprende los aminoácidos 1 a 150 aa, el péptido enlazador 151 - 178 aa y el dominio C-terminal 179 - 323 aa [121].

Ambos CDRs tiene estructura de  $\beta$  sándwich en una topología de *jellyroll*, cada monómero está formado por dos láminas  $\beta$  antiparalelas, cada lámina está compuesta por seis cadenas antiparalelas  $\beta$ -hebras (F0-F5 / F0'-F5' y S1-S6 / S1'- S6) (Figura 6) [121-123]. En solución a pH fisiológico la distribución de carga del dominio C terminal es principalmente positiva y en el N-terminal tiene una carga más heterogénea en el lado cóncavo existe una carga positiva en donde se encuentra el sitio de unión [122]. El sitio de unión se encuentra en un bolsillo poco profundo de las cadenas S4/S4', S5/S5' y S6/S6' y el bucle adyacente S5/S5'. Las cadenas S2/S2' y S3/S3' en los dominios N- y C- terminal presentan variaciones en los aminoácidos, éstas contribuyen a la selectividad de las interacciones con ligandos [121].

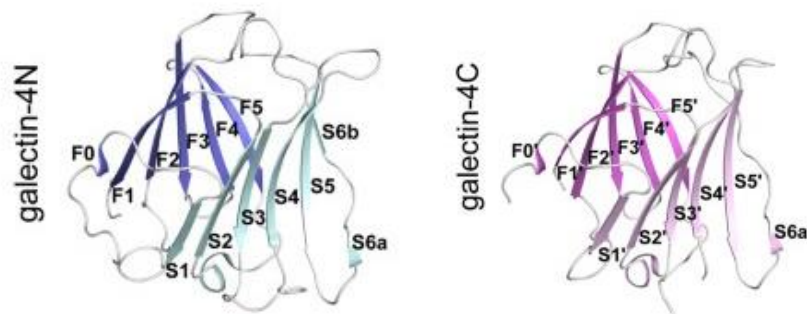


Figura 6. Representación esquemática de los dominios de reconocimiento de Gal-4. Ambos dominios se componen de dos láminas  $\beta$  antiparalelas, cada lámina está formada por seis hebras antiparalelas

Los CDRs y el péptido enlazador son capaces de interactuar entre sí mediante interacciones débiles (puentes de hidrógeno y enlaces no covalentes), estas interacciones son transitorias, por lo que la Gal-4 se encuentra en constante dinamismo [121]. El péptido enlazador tiene un alto contenido de prolina (28.6%) que limita el movimiento de esta región y proporciona estabilidad a la proteína, esta es una característica de las galectinas de repetición en tándem que les proporciona dinámicas únicas y así mismo funciones únicas [124]. Debido a que el péptido enlazador es susceptible a sufrir proteólisis, existen pocos estudios en los que se ha caracterizado la estructura completa de Gal-4 [121]. La longitud del péptido enlazador modifica el reconocimiento de las estructuras glicánicas; la reducción de la longitud y/o eliminación del péptido enlazador disminuye la capacidad de reconocimiento de Gal-4

debido a que modifica la topología de dos sitios de reconocimiento que adoptan un diferente modo de presentación espacial [88, 105].

La identidad de secuencia de los CDRs de Gal-4 es de 34-40 % [125], justo las diferencias entre las secuencias de los CDRs les confieren diferente capacidad de reconocimiento y afinidad por estructuras que tienen galactosa en diferentes arreglos glicánicos e incluso de moléculas que no la tienen.

Gal-4 tiene afinidad por lactosa (Gal $\beta$ 1-4Glc) [120], MUC1 (proteína que tiene O- y N-glicosilaciones) [21], los glicanos que conforman el sistema de grupos sanguíneos ABH; como al tetrasacárido A tipo 1 (GalNAc $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2) Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ ) y tipo 2 (GalNAc $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ ) y en menor medida los tetrasacáridos B y el trisacárido H (tipo 1 Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ ) [126]. Sin embargo, cada DRC presenta diferente afinidad por estructuras de glicanos; solo por mencionar algunos ejemplos, el DRC-C tiene afinidad por T $\beta\beta$  (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ ), TF (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ ), antígeno T (Gal $\beta$ 1-3GalNAc), el DRC-N reconoce el glicano LN (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ ) y glicanos con el motivo Lec (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ ) [120, 126].

### 1.7.2. Mecanismo de secreción y exporte de la galectina-4

Existen pocos estudios acerca del mecanismo de secreción o exporte de la Gal-4, al igual que otros miembros de la familia, la Gal-4 carece de secuencia de señal para su transporte a retículo endoplásmico (RE) y tampoco atraviesa el aparato de Golgi, por lo que es una proteína no glicosilada [73, 127]. La Gal-4 puede localizarse tanto en el núcleo, como en el citoplasma de las células, así como en el espacio extracelular [73].

Recientemente se encontró que la Gal-4 presenta en su secuencia péptidos que pueden ser fosforilados por la familia de cinasa Src, la cual es capaz de fosforilar a la Gal-4 en la tirosina 320 del extremo C-terminal, siendo esta tirosina determinante para su secreción [128], demostrándose que el estado de fosforilación es importante para la secreción de esta proteína. Similarmente la Gal-3 es fosforilada en residuos de tirosina, y posteriormente es secretada en presencia de calpaína-4 [129], aún se desconoce la ruta de secreción de la Gal-4, pero podría ser similar a la Gal-3.

### 1.7.3. Expresión de galectina-4 en tejido humano

La Gal-4 se identificó por primera vez en el tracto digestivo: en intestino delgado, colon y recto [125]; posteriormente se reportó en otros tipos de tejidos, identificándose tanto el ARNm como la proteína. En bases de datos el ARNm se ha reportado en islotes de Langerhans, tejido embrionario, colon, recto, apéndice, vejiga, hígado [130, 131] y cérvix [132]. La expresión de la proteína se ha reportado en tejido de colon, mama, ovario, pulmón [120], vesícula biliar, hígado, páncreas y apéndice [130].

### 1.7.4. Funciones biológicas de galectina-4

La Gal-4 participa en la estabilización de las balsas lipídicas, éstas son un tipo de plataformas compuestas de esfingolípidos y colesterol que se proyectan hacia el exterior de las células sobre la membrana [133], inicialmente la Gal-4 se encontró como un componente de la porción soluble en detergente de intestino delgado junto a glicoproteínas de membrana, después se co-localizó en el borde del cepillo (brush border membrane) de la zona apical de enterocitos junto a sus ligandos aminopeptidasa-N y sacarasa-isomaltasa [134, 135], enzimas que están altamente glicosiladas [136, 137]. La Gal-4 se externaliza y permanece en la superficie de las balsas lipídicas, estabilizándolas mediante la formación de entramados con las glicoproteínas y glicolípidos, ayudando a proteger estas enzimas de la solubilización [135].

La Gal-4 funciona de guía en el tráfico vesicular, en estas vesículas se transportan proteínas provenientes del aparato de Golgi hacia la superficie apical de células, cuando Gal-4 se encuentra ausente, estas proteínas son acumuladas intracelularmente [138].

También se ha reportado que la Gal-4 participa en el cierre de heridas intestinales, Gal-4 y -2 exógenas promueven la migración celular mediante la interacción con E-cadherina y  $\beta$ -catenina, estas son importantes para la adhesión, transducción de señales, y morfología epitelial, además estas dos galectinas no indujeron la apoptosis de células epiteliales a comparación de Gal-1 que la indujo; en conjunto la capacidad de promover la migración celular y no inducir la apoptosis proporcionan una homeostasis en el tejido que permite el cierre de herida [139].

La Gal-4 es una proteína necesaria para el adecuado desarrollo neuronal, cuando se comienzan a definir los axones la Gal-4 se localiza de manera homogénea en ellos, conforme maduran las neuronas, la Gal-4 se polariza hacia los extremos de los axones. Se ha reportado que la ausencia de esta retrasa la elongación del axón [140].

Si bien Gal-4 es una proteína que ha sido descrita recientemente, interviene en funciones que son importantes tanto para el desarrollo de organismos como en el mantenimiento de estos, ya sea regulando el transporte hacia la membrana y otorgándole estabilidad, como en el desarrollo de procesos vitales en las neuronas.

#### 1.7.5. La desregulación de la expresión de galectina-4 y cambios asociados al desarrollo de cáncer

La Gal-4 se ha asociado a varias funciones celulares como proliferación descontrolada, crecimiento tumoral, adhesión, invasión, migración, metástasis, adhesión a endotelio vascular entre otras, todas estas funciones se han asociado como características de malignidad en el desarrollo de cáncer. Aunque no existe un consenso sobre su expresión entre los diferentes tipos celulares estudiados, en algunos de ellos se ha encontrado que la disminución o silenciamiento de la expresión de Gal-4 se asocia con un fenotipo más agresivo.

La sobreexpresión de la proteína Gal-4 en diferentes líneas celulares parece tener un efecto protector. En células de cáncer hepatocelular la sobreexpresión se asoció con una disminución en su capacidad de invasión y migración [141]. Por otro lado, en células de cáncer pancreático, PaTu-S que presentaron la mayor expresión tanto de ARN como de proteína exhibe propiedades migratorias y metastásicas menores. En estas células Gal-4, se localizó en el citosol, con una mayor presencia en la membrana de células individuales y en los contactos célula-célula. Las células con alta expresión de Gal-4 tienen menor potencial de metástasis en xenoinjertos. Se analizó también la secreción de Gal-4 encontrando que es secretada y luego se une a su superficie celular, esta unión es dependiente de los glicanos, ya que fue abatida por lavados con lactosa [142].

En células de cáncer hepatocelular la expresión forzada de Gal-4 es capaz de incrementar la viabilidad y la proliferación celular. Se sugirió que este incremento se debe al aumento de

ciclina D1 y la disminución de P21. También se encontró una inhibición de la apoptosis celular debido a una menor expresión de Bax pro-apoptótica y un incremento de Bcl-2 anti apoptótica. Gal-4 favorece la adhesión celular ya que incrementa la expresión de E-cadherina y  $\beta$ -catenina en las interacciones célula-célula. Todas las características previamente mencionadas tienen como consecuencia un mayor crecimiento tumoral, el cual fue comprobado mediante ensayos *in vivo* y el marcador de proliferación Ki-67 en los tumores generados [143].

En células de cáncer colorrectal que sobre expresaban Gal-4 y fueron tratadas con camptotecina (fármaco usado como anti-proliferativo) se encontró una mayor muerte celular (apoptosis) respecto a las células que no tenían una sobreexpresión de Gal-4, lo que sugiere que esta proteína podría funcionar como un sensibilizador para una mejor respuesta al tratamiento [144].

En una situación contraria, el silenciamiento de Gal-4 en células de cáncer colorrectal incrementó la proliferación celular y favoreció el crecimiento de tumores en xenoinjertos. Este silenciamiento resultó en la sobre regulación de NOTCH, TGF- $\beta$ 1 y SOX4, también mejoró la expresión de IL-6 y COX-2 y la fosforilación de Akt lo cual promueve las señales de supervivencia. Adicionalmente se conoce que IL-6 es un activador de STAT3, NF- $\kappa$ B y Akt que promueve la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [145].

La Gal-4 extracelular favorece la adhesión. En células de cáncer colorrectal que fueron pre-incubadas con Gal-4 y posteriormente co-cultivadas con endotelio vascular, la adhesión incrementó respecto a las no pre-incubadas, el aumento en la adhesión se relacionó con el incremento de la concentración de Gal-4. [146]. Por otro lado, se exploró la capacidad de adhesión de células de cáncer a glóbulos rojos; se incubaron glóbulos rojos con células tumorales de cáncer de colón que sobre-expresaban Gal-4, se encontró que Gal-4 favorece la adhesión de estos tipos celulares, además la morfología de los glóbulos rojos se deforma y en las células de cáncer colorrectal la Gal-4 se acumuló en la membrana en las zonas de contacto, este patrón se repitió en células de cáncer de páncreas [147].

### 1.7.6. Cambios de expresión de galectina-4 en tejido y su asociación con el desarrollo de cáncer

Como se ha mencionado, la expresión de Gal-4 puede cambiar en procesos tumorales. En lo que se refiere a pacientes con algún tipo de cáncer se ha encontrado una desregulación en la expresión de Gal-4, que se asoció con la progresión de la enfermedad.

En pacientes con cáncer colorrectal se examinó la expresión de Gal-4 en tumores y su tejido adyacente, la expresión del ARNm de Gal-4 se encontró regulada a la baja en procesos de carcinogénesis [125].

La expresión de Gal-4 en tejido tumoral de pacientes con cáncer hepatocelular incrementó con respecto al tejido peri tumoral [143, 148]. Se propone que la sobreexpresión de Gal-4 puede incrementar la proliferación e inhibir la apoptosis en tumores primarios de hígado, por otro lado, en estadios avanzados su menor expresión podría asociarse con recurrencia y metástasis, por lo que se sugiere como un posible biomarcador pronóstico para este tipo de cáncer [143]. En pacientes con cáncer hepatocelular que presentaron recurrencia y metástasis temprana se identificó que tanto el ARNm como la proteína de Gal-4 estaba disminuida [141]. Adicionalmente, se encontró que esta menor expresión se asoció con tamaños tumorales  $\geq 5$ , deficiente diferenciación tumoral, invasión microvascular y un TNM más avanzado. Se identificó la menor expresión de Gal-4 como un factor de mal pronóstico, una mayor tasa de recurrencia/metástasis, menor tiempo de supervivencia, sugiriendo que Gal-4 puede ser un marcador pronóstico.

La expresión de Gal-4 en tejido de pacientes con cáncer de colon, adenocarcinoma y mucosa inflamada exhibió niveles más bajos respecto a mucosa normal [145].

En biopsias de pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal el 79.3% fueron positivos para Gal-4, se expresó en los compartimientos citoplasmáticos, membranosos y nuclear. Esta expresión se asoció con tamaño de tumor y el grado de diferenciación. La expresión se correlacionó con recurrencia temprana y muerte durante el primer año después de la resección, Gal-4 se asoció con la supervivencia global a 1 año y los pacientes con expresión positiva de Gal-4 presentó un mejor tiempo de supervivencia libre de enfermedad. [149], en

un análisis con líneas celulares también se identificó a Gal-4, se validó como una diana específica para terapia [150].

En cáncer gástrico se determinó que Gal-4 se expresa en tejido tumoral a comparación del tejido no tumoral [151] aunque no se analizó la implicación biológica, en otro estudio, mediante un análisis de Northern blot en líneas celulares se observó una regulación positiva de Gal-4 junto con otros genes asociados con diseminación e invasión [152].

Se analizó Gal-4 en muestras de tejidos de pacientes con adenocarcinoma de pulmón y se mostró que Gal-4 está asociada con características clínico-patológicas como tamaño tumoral, invasión pleural, estado ganglionar, y estadio TNM, se reveló como un factor independiente para la metástasis ganglionar y podría servir como un biomarcador para predecir metástasis a nódulo linfático [153]

En nuestro grupo de trabajo se analizó un microarreglo de expresión en el que se compararon muestras de tejido con diagnóstico de CaCu y con diagnóstico normal, encontrando una menor expresión del gen *LGALS4* en muestras de CaCu ([154] GSE159976)), este resultado fue similar cuando se comparó la expresión del gen en líneas celulares de CaCu y tejido de CCE respecto a muestras normales [132].

#### 1.7.7. Incremento de galectina-4 sérica en cáncer

Gal-4 sérica se ha encontrado en mayor concentración en el suero de pacientes con algunos tipos de cáncer. Este incremento se ha asociado con el estadio de la enfermedad y con la progresión de esta, ya que los pacientes con metástasis presentaron concentraciones más elevadas respecto a los que tuvieron tumores localizados. A continuación, se explican estos hallazgos.

En cáncer de colon la concentración de Gal-4 sérica incrementó hasta de 11.1 veces, en los pacientes que presentaron metástasis la concentración incrementó en 25.3. [146, 155]. El incremento de Gal-4 sérica podría jugar un papel importante en la diseminación de células tumorales a otros órganos. Los pacientes con altos niveles séricos de Gal-3/-4 presentaron una menor supervivencia a 10 años [155].

Para los pacientes con cáncer de mama Gal-4 sérica tuvo un aumento de 11 veces y se observó una tendencia de incremento respecto al estadio clínico [146]

Por otro lado, se encontró que los pacientes con cáncer hepatocelular no tienen una diferencia significativa en la concentración de Gal-4 sérica respecto a los controles, pero en los pacientes con cáncer que además presentaron infección por virus de hepatitis B (VHB) la concentración fue mayor. [141].

En el suero de paciente con adenocarcinoma gástrico Gal-4 mostró un incremento de 5.9 veces respecto al control, también evaluaron la capacidad diagnóstica de Gal-4 con un análisis Roc, en el que encontraron un AUC de 0.924 y el mejor punto de corte de 420 pg/ml, los pacientes con concentraciones iguales o superiores pueden ser diagnosticados correctamente con un 62.5% de confianza [156].

Los estudios realizados en suero de pacientes y la implicación clínica que tiene el incremento de Gal-4 son pocos, pero análisis *in vitro* han determinado que la Gal-4 circulante podría estar involucrada en una mayor adhesión de las células de cáncer al endotelio vascular promoviendo así la angiogénesis y metástasis [102, 157].

## 2. JUSTIFICACIÓN

El CaCu ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad de mujeres en México, el método de tamizaje para la detección de CaCu es el Papanicolaou, que reporta una alta tasa de falsos negativos, lo que repercute en el diagnóstico tardío de la enfermedad, generando un alto número de casos en estadios avanzados y una alta tasa de mortalidad. Actualmente no existe un marcador para este tipo de cáncer que permita dar seguimiento y/o evaluación de la respuesta al tratamiento de las pacientes. La Gal-4 es una proteína que muestra una expresión alterada en diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, el aumento en la expresión de la Gal-4 en tejido de pacientes con cáncer colorrectal se asoció con estadios avanzados de la enfermedad. Respecto al CaCu se desconoce la expresión de esta proteína. Resultados preliminares de nuestro grupo, generados a partir de un microarreglo de expresión, mostraron que el gen que codifica para Gal-4 disminuye su expresión en los tumores de CaCu. La finalidad de este trabajo de investigación es evaluar la expresión de la proteína Gal-4 y su vinculación con la progresión del CaCu con el fin de aportar evidencias que indiquen si esta proteína pudiera ser utilizada como un biomarcador de progresión para las pacientes con CaCu.

## 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCu representa la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer mexicana. La búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico-pronóstico, evaluación de la respuesta al tratamiento y seguimiento, así como la búsqueda de blancos terapéuticos ha adquirido gran importancia para este tipo de cáncer. La Gal-4 ha mostrado ser un prometedor marcador de progresión, metástasis y recurrencia temprana en otros tipos de cáncer. A la fecha se desconoce si la concentración sérica de Gal-4 se modifica en pacientes con CaCu, adicionalmente se desconoce si su expresión se modifica en tejido de cérvix durante la transformación maligna, resultados preliminares del grupo de trabajo muestran una disminución de los niveles de ARNm en biopsias de CaCu. Por lo anterior en el presente trabajo se determinará si la concentración sérica y el nivel de expresión en tejido tumoral de Gal-4 se modifica en las pacientes con CaCu.

## 4. HIPÓTESIS

- ✦ El nivel expresión de la proteína galectina-4 disminuye en tejido de pacientes con cáncer cervicouterino
- ✦ La concentración de galectina-4 incrementa en suero de pacientes con cáncer cervicouterino
- ✦ El incremento de la concentración de galectina-4 en suero de pacientes se asocia con características clínico-patológicas
- ✦ Galectina-4 sérica es marcador discriminativo de la enfermedad
- ✦ El gen de galectina-4 se expresa en líneas celulares de cáncer cervicouterino, teniendo niveles de ARNm menores que una línea celular no tumoral

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

- ✦ Evaluar la expresión de galectina-4 en suero y tejido de pacientes con cáncer cervicouterino e identificar su ARNm en células de cérvix

### 5.2. Objetivos Específicos

- ✦ Determinar la concentración de galectina-4 en el suero de pacientes con cáncer cervicouterino
- ✦ Determinar si la concentración de galectina-4 se relaciona con las características clínico-patológicas
- ✦ Determinar si galectina-4 sérica es un potencial biomarcador diagnóstico
- ✦ Identificar la presencia de galectina-4 en biopsias de cérvix
- ✦ Cuantificar el nivel de expresión de galectina-4 en biopsias de cáncer cervicouterino
- ✦ Determinar si el nivel de expresión de galectina-4 en tejido de cáncer cervicouterino se relaciona con las características clínico-patológicas
- ✦ Evaluar si existe un cambio de localización de galectina-4 en biopsias de pacientes con cáncer cervicouterino
- ✦ Determinar si existe una relación entre la concentración sérica y el nivel de expresión en tejido de galectina-4
- ✦ Identificar y cuantificar el ARNm de galectina-4 en células de cérvix

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Población en estudio**

Este estudio se realizó bajo las directrices de la Declaración de Helsinki [158] y el Comité de Ética e Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). El proyecto fue registrado en el Comité de Ética e Investigación en Salud contando con el número de registro R-2016-2106-1.

Las pacientes incluidas en el estudio fueron usuarias del Servicio de Radioterapia del Centro Médico Nacional Manuel Ávila Camacho, IMSS ubicado en la ciudad de Puebla, México, durante el periodo comprendido de febrero de 2017 a enero de 2020. Todas las pacientes incluidas en el estudio firmaron el consentimiento informado (ANEXO II: Consentimiento informado). A partir de los expedientes clínicos se obtuvo la historia clínica de las pacientes, así como datos sociodemográficos. El diagnóstico de CaCu fue realizado por el médico patólogo adscrito al Departamento de Patología y el estadio clínico fue determinado de acuerdo con los criterios de FIGO [58] por el médico radio-oncólogo. A cada paciente se le tomó una muestra de sangre previa al tratamiento. En el grupo control se incluyeron mujeres mayores de 18 años que contaban con un diagnóstico citológico negativo a lesión intraepitelial escamosa y a malignidad y que aceptaron participar en el estudio firmando la carta de consentimiento informado.

### **6.2. Determinación de la concentración de galectina-4 en suero de pacientes**

En el presente estudio fueron procesadas 52 muestras de suero, de las cuales 13 correspondieron al grupo control y 39 al grupo de CaCu. El suero fue obtenido mediante flebotomía, la muestra de sangre se centrifugó a 3500 rpm por 10 min a temperatura ambiente y las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. La concentración sérica de Gal-4 fue determinada mediante la técnica de ELISA usando el Human Galectin-4 ELISA Kit (IRKTAH5118, Innovative Research, Inc., Plymouth, MN, US) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los ensayos de ELISA los sueros fueron diluidos 1:2 y para determinar la concentración de Gal-4 la placa fue leída a una absorbancia de 450 nm en el lector de

micro-placa SYNERGY (BioTek Instruments, Inc Winooski, VT, US), la concentración fue calculada con base en la curva estándar.

### **6.3. Evaluación de la proteína galectina-4 en tejido cervical**

Las biopsias de cérvix embebidas en parafina fueron obtenidas del Departamento de Patología del Centro Médico Nacional Manuel Ávila Camacho, IMSS. Se procesaron un total de 35 biopsias de las cuales 6 fueron tejido de cérvix normal y 29 con diagnóstico de CaCu. A partir de los bloques de parafina se hicieron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor que fueron colocados en portaobjetos previamente tratados con APES al 2% (3-Aminopropyltriethoxysilane, A3648, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US), posteriormente fueron desparafinadas por 60 min a 60°C, para la hidratación se realizaron 3 baños consecutivos de xilol durante 10 min cada uno, 3 baños de etanol absoluto por 5 min, 2 baños de etanol al 95% por 5 min, etanol al 80% por 5 min y un baño de agua. La recuperación antigénica fue realizada en buffer de citratos 10 mM pH 6.0 (C9999, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US) por 15 min a 90°C. Posteriormente después de cada paso que se realizó a continuación, se hicieron 3 lavados con buffer de fosfatos (PBS 1X), excepto en la incubación con BSA al 5%. Para el bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena, los cortes se incubaron con 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PBS 1X durante 15 min. Posteriormente para evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario se realizó un bloqueo con 5% de albúmina sérica bovina (BSA, P6154, Biowest, Riverside, MO, US.) en PBS 1X, los tejidos fueron incubados toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal anti-Gal4 (ab170638, Abcam, Cambridge, UK) diluido 1:100 en solución de BSA al 5% en PBS 1X. Posteriormente los tejidos fueron incubados con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG-HRP (ab6721, Abcam, Cambridge, UK) diluido 1:1000 en solución de BSA al 5% en PBS 1X; finalmente la reacción colorimétrica se realizó empleando el kit ImmPACT® DAB Peroxidase Substrate (SK-4105, Vector Labs, Burlingame, CA, US), siguiendo las recomendaciones del fabricante, el tiempo de incubación correspondió a 10 seg. La tinción de núcleos se realizó incubando por 10 seg con una solución de hematoxilina (HX87960674 Merck, Darmstadt, Hesse, DE), se lavaron con agua corriente. Los cortes fueron montados con el medio VectaMount® Permanent Mounting Medium (H-5000, Vector Labs, Burlingame, CA, UU). Los controles negativos fueron procesados de igual manera que los experimentales, excluyendo únicamente la incubación con el anticuerpo primario.

Las imágenes de cada muestra fueron tomadas con el sistema de captura VENTANA DP200 scanner (Roche Diagnostics, Switzerland, CH). Posteriormente para llevar a cabo la cuantificación de la intensidad de coloración de las muestras, se tomaron 4 fotografías en áreas correspondientes al diagnóstico histopatológico, para cada fotografía se realizó la cuantificación de 5 campos, finalmente para obtener la densidad media de coloración (lúmenes) para cada muestra, los valores en lúmenes de las 4 fotografías se promediaron. La intensidad de coloración fue evaluada con Image-Pro software (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, US).

#### **6.4. Localización de la galectina-4 en tejido cervical por inmunofluorescencia**

A partir de los bloques de parafina se hicieron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor que fueron colocados en portaobjetos previamente tratados con APES, posteriormente fueron desparafinados por 60 min a 60 °C, la hidratación y recuperación antigénica se realizó como se mencionó.

Se realizó la permeabilización de la membrana con una solución de 0.2% Tritón X-100 (T8787 Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US) en PBS 1X. Para evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario se realizó un bloqueo con 1% de BSA (P6154, Biowest, Riverside, MO, US.) en PBS 1X por 2 hrs, posteriormente los tejidos fueron incubados toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal anti-Gal4 (ab170638, Abcam, Cambridge, UK) diluido 1:100 en solución 1% de BSA en PBS 1X. Después los tejidos fueron incubados con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG H&L (Alexa Fluor 488) (ab150077, Abcam, Cambridge, UK) diluido 1:1000 en solución 1% de BSA en PBS 1X. La tinción de núcleos se realizó incubando con DAPI 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (4883S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US), por 50 seg. Los cortes fueron montados con el medio VectaShield® Antifade Mounting Medium (H-1000, Vector Labs, Burlingame, CA, US), las laminillas fueron almacenadas a 4°C protegidas de la luz. Los controles negativos fueron procesados de igual manera que los experimentales, excluyendo únicamente la incubación con el anticuerpo primario. Las microfotografías fueron tomadas con un microscopio Axio Observed.Z1 ZEISS PALM MicroBeam (Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, DE) acondicionado con el sistema Apotome, se usaron los objetivos 10X y 20X, la longitud de onda de excitación fue

de 390-420 y de 455-495 para DAPI y Alexa Flour 488 respectivamente. Las imágenes fueron analizadas con el programa ZEN (blue edition) versión 10.0 (Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, DE).

### 6.5. Características de las líneas celulares y su mantenimiento

Las líneas celulares usadas en el desarrollo experimental fueron SiHa (HTB-35, ATCC, Manassas, VA, US.), HeLa (CCL-2, ATCC, Manassas, VA, US.), CasKi (CRL-1550, ATCC, Manassas, VA, US.), C33-A (HTB-31, ATCC, Manassas, VA, US.), que corresponden a células derivadas de tumores de cérvix, la línea celular Jurkat (TIB-152, ATCC, Manassas, VA, US.) que corresponde a linfocitos-T de una leucemia linfoblástica aguda y HaCaT que son queratinocitos inmortalizados de piel (donados por Dra. Adriana Aguilar Lemarroy del banco de células del Centro de Investigación Biomédica de Occidente) Las células Jurkat y las HaCaT fueron usadas como controles (Tabla 4).

Las líneas celulares SiHa, HeLa, C33-A y HaCaT fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM (P0103, Biowest, Riverside, MO, US.), Caski y Jurkat en RPMI (P0860, Biowest, Riverside, MO, US.), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB, S1560, Biowest, Riverside, MO, US.), antibiótico-antimicótico (L0010, Biowest, Riverside, MO, US.) en botellas de cultivo T-25 (90025, TPP, Zollstrasse, Trasadingen, CH), los subcultivos se realizaron disociando la monocapa de células con 300 uL de tripsina-EDTA 1X (L0930-500, Biowest, Riverside, MO, US.) e incubando a 37°C por 5 min, posteriormente se colectaron y centrifugaron a 1500 RPM por 5 min, se lavaron dos veces con PBS 1X, se re-suspendieron en 1 ml de medio y se hizo un pase con 200 µl de células, manteniéndose a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células Jurkat crecen en suspensión por lo que se tomaron los 5 ml de medio de cultivo y se centrifugaron a 1500 RPM por 5 min, se lavaron con PBS 1X y se sembraron 1 millón de células para mantenimiento del cultivo.

Tabla 4. Características de las líneas celulares.

	Origen celular	Genotipo de VPH
HaCat	Queratinocitos de piel	neg
Caski	Carcinoma de células escamosas de cérvix	16

SiHa	Carcinoma de células escamosas de cérvix	16
C33-A	Carcinoma de células escamosas de cérvix	neg
HeLa	Adenocarcinoma	18
Jurkat	Linfocitos T de leucemia linfoide aguda	neg

## 6.6. Cuantificación de la expresión del gen *LGALS4* en líneas celulares por PCR en tiempo real

Para la extracción del ARN total y posterior cuantificación del gen *LGALS4* las líneas celulares fueron cultivadas hasta el 80 % de confluencia en placas de cultivo P100 (430167, Corning, NY, US.), para su disociación de la monocapa las células fueron incubadas con 500 µl de tripsina EDTA 1X (L0930-500, Biowest, Riverside, MO, US.) durante 5 min a 37°C, centrifugadas a 1500 rpm, posteriormente fueron lavadas con PBS 1X. La extracción de ARN mensajero (ARNm) se realizó usando el Kit Nucleospin RNA (740955.50, Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, US.) siguiendo las instrucciones del fabricante, para eluir el ARN total de la columna se usaron 30 µl de agua libre de nucleasas. Posteriormente para eliminar cualquier resto de ADN contaminante, 3 µg de ARN total fueron incubados con ADNasa, usando el kit (DNase I, RNase-free, EN0523, Waltham, MA, USA), finalmente se determinó la concentración y pureza del ARN en el equipo Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US), la concentración se determinó a partir de la lectura a 260 nm y la pureza se determinó obteniendo la relación de 260/280 nm, considerando una adecuada pureza de las muestras cuando presentaba un valor cercano a 2.0. Para determinar la integridad de ARN total se realizó una electroforesis de agarosa al 0.8 % (V3121, Promega, Madison, WI, US) y se corrió a 70 V por 1 hr.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó con el kit Thermo Scientific RevertAid RT, (K1691, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) usando 2 µg de ARN total, y empleando oligonucleótidos dT. Para verificar que la síntesis del ADNc se realizó un PCR punto final amplificando el gen de ciclofilina (Tabla 5).

Para cuantificar la expresión del gen *LGALS4* se realizó un análisis de expresión relativa mediante un PCR tiempo real, usando los oligonucleótidos reportados previamente por Cai [141] (Tabla 5). El gen endógeno que se usó para validar el método fue hipoxantina-guanina

fosforibosiltransferasa (HPRT) (Tabla 5). Para determinar la eficiencia de amplificación se realizó una curva de concentraciones de 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.312 ng/μl de ARN total. Considerando los valores obtenidos en la curva de concentración, los ensayos de cuantificación relativa se realizaron usando 5 ng/μl para cada una de las líneas celulares y el programa de amplificación fue 40 ciclos de 95°C por 30 seg y 55° por 1 min. La cuantificación de la expresión se realizó con el método  $\Delta\Delta C_t$  mediante la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos y su tamaño de amplificación

Gen	Oligonucleotido sentido	Oligonucleotido antisentido	Producto
<i>Ciclofilina</i>	5'-ATG GTC AAC CCC ACC GTG TT-3'	5'CGT GTG AAG TCA CCA CCC-3'	150 pb
<i>LGALS4</i>	5'-CCC TTC TAT GAG TAC GGG CAC-3'	5'-TGG CCT CCG ATG AAG TTG ATT-3'	101 pb
<i>HPRT</i>	5'-CCT GGC GTC GTG ATT AGT GAT GAT-3'	5'-CGA GCA AGA CGT TCA GTC CTG TC-3'	136 pb

## 6.7. Cuantificación de la proteína galectina-4 en líneas celulares por Western Blot

La detección de Gal-4 en líneas celulares se llevó a cabo con un *Western Blot* (WB). A partir de un cultivo de células en placas p100 (430167, Corning, NY, US.) al 80% de confluencia se colectó el pellet celular como anteriormente se describió, se re-suspendió en 100 μl de buffer RIPA frío (Tris HCl pH 7.4 50 mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 2 mM) adicionado con inhibidor de proteasas (78430, Thermo Scientific, Waltham, MA, US), se realizó la extracción de proteínas totales incubando 60 min en hielo mezclando en vórtex por 1 min cada 10 min hasta completar el tiempo, finalmente se centrifugó a 14,000 g durante 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se desechó el pellet. La cuantificación de proteínas totales se realizó con el kit DC Protein Assay (BioRad, Hercules, CA, US), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Para los ensayos de WB, 100 μg de proteína fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % SDS-PAGE, la sección concentradora del gel que se preparó al 5% de poliacrilamida se corrió a 70 V por 20 min, posteriormente el gel separador se corrió a 120 V por 130 min, al término de la electroforesis la proteína fue transferida a una membrana

PVDF de 0.2  $\mu\text{m}$  (1620177, BioRad, Hercules, CA, US) en cámara húmeda por 16 hrs a 90 mA. La membrana fue bloqueada con BSA al 5% en PBS 1X (BSA, P6154, Biowest, Riverside, MO, US.) por 2 hr. Posteriormente la membrana fue incubada durante toda la noche a 4°C, con el anticuerpo policlonal anti-Gal4 (ab170638, Abcam, Cambridge, UK) en una dilución de 1:100 en una solución de BSA al 5% en PBS 1X, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG-HRP (ab6721, Abcam, Cambridge, UK) en una dilución de 1:1,000 en una solución de BSA al 5% en PBS 1X. Como control de carga de proteína fue utilizada la proteína  $\beta$ -actina, para su detección se utilizó el anticuerpo anti- $\beta$ -actina (ab8224, Abcam, Cambridge, UK). Los controles de inespecificidad fueron procesados únicamente con el anticuerpo secundario.

La detección de Gal-4 y  $\beta$ -actina fue realizada a través de un ensayo de quimioluminiscencia (WBKLS0500, Millipore, Darmstadt, DE); la membrana se incubó por 5 min en la solución del kit y posteriormente se reveló por 6 min en el equipo C- Digit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, US). La densidad de las bandas fue procesada con el software Image Studio 5 Lite (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, US). La densidad de las bandas de  $\beta$ -actina fue utilizada para normalizar las densidades obtenidas para Gal-4.

### **6.8. Evaluación de la expresión y localización de la galectina-4 en líneas celulares por inmunofluorescencia**

Para el análisis de expresión de galectina 4 en las líneas celulares SiHa y HaCat fueron sembradas 50,000 células por pozo en cámaras de cultivo de 8 pozos Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System (177402, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US), se incubaron por 24 hrs, posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X y se fijaron con formaldehído al 4 % en PBS 1X por 15 min a temperatura ambiente. Las células fueron permeabilizadas con una solución de 0.2% Tritón X-100 (T8787 Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US) en PBS 1X, se realizaron 5 lavados con PBS 1X frío por 5 min cada uno. Posteriormente para evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario se realizó un bloqueo con 1% de BSA (P6154, Biowest, Riverside, MO, US.) en PBS 1X por 1 hr. Las células fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal anti-Gal4 (ab170638, Abcam, Cambridge, UK) diluido 1:100 en solución 1% de BSA en PBS 1X, se realizaron 5

lavados con PBS 1X. Después fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG H&L (Alexa Fluor 488) (ab150077, Abcam, Cambridge, UK) dilución 1:500 en 1% de BSA en PBS 1X por 1.5 hrs a temperatura ambiente protegido de la luz. Se realizaron 5 lavados con PBS 1X y se procedió a la tinción de núcleos incubando con DAPI 0.1 µg/ml (4883S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US), por 50 seg. Las laminillas fueron montadas con el medio VectaShield® Antifade Mounting Medium (H-1000, Vector Labs, Burlingame, CA, US) y almacenadas a 4°C protegidas de la luz. Los controles negativos fueron procesados de igual manera que los experimentales, excluyendo únicamente la incubación con el anticuerpo primario. Las microfotografías fueron tomadas con un microscopio Axio Observed.Z1 ZEISS PALM MicroBeam (Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, DE) acondicionado con el sistema Apotome, se usó el objetivo de inmersión 63X, la longitud de onda de excitación fue de 390-420 y de 455-495 para DAPI y Alexa Fluor 488 respectivamente. Las imágenes fueron procesadas con el programa ZEN (blue edition) versión 10.0 (Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, DE).

### 6.9. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron hechos usando el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, US). En la sección de paciente la diferencia de la concentración sérica de Gal-4 entre grupos se determinó mediante la prueba estadística de Mann-Whitney. La asociación entre la concentración de Gal-4 sérica y cada una de las características clínico-patológicas fue determinada con el análisis Mann-Whitney, cuando se compararon tres o más características o grupos se empleó la prueba de Kruskal Wallis con un post análisis de Dunn's. La diferencia en intensidad de tinción de Gal-4 en los tejidos de pacientes fue evaluada con el análisis Mann-Whitney.

Para determinar la capacidad de Gal-4 sérica de ser un biomarcador diagnóstico se realizó un análisis de la curva ROC (*Receiver-operating characteristic*). Las curvas ROC son útiles en las primeras etapas de la evaluación de una nueva prueba diagnóstica, las curvas ROC no varían con respecto a la prevalencia de la enfermedad, pero depende las características del paciente y la enfermedad, proporcionan la precisión diagnóstica de la prueba y la identificación de los puntos de corte óptimos. Un área bajo la curva (AUC) de 1 refleja una

prueba perfectamente precisa [159, 160]. Un AUC de 0.5 indica que no hay discriminación, de 0.7 a 0.8 es considerada aceptable, de 0.8 a 0.9 es excelente y más de 0.9 es sobresaliente [161]. El mejor punto de corte fue hecho con el índice Youden ( $J$ ) [162] el cual permite dar el mismo peso a la sensibilidad y a la especificidad y determinar la concentración de Gal-4 sérica para distinguir entre pacientes enfermos y sanos. El índice se calcula con la diferencia entre la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y la tasa de falsos positivos (1-especificidad) [163].

Para la sección de experimentos *in vitro* la diferencia del nivel de expresión del gen *LGALS4* y la cuantificación de la proteína Gal-4 por WB en las líneas celulares se analizó con un ANOVA de dos vías y post-análisis de Dunn's.

Para todos los análisis estadísticos un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como una diferencia estadísticamente significativa.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Características de la población de estudio

En este estudio fueron incluidas muestras de suero y/o tejido de pacientes con CaCu y de mujeres con citología negativa a lesión intraepitelial escamosa y a malignidad. Las muestras de tejido fueron diagnosticadas por un patólogo y el estadio fue determinado por el médico tratante y/o el patólogo, en función del estadio clínico. Se incluyeron mujeres mayores de 18 años. Para el grupo control las mujeres debían contar con un reporte de citología negativo a malignidad menor a 1 año y para el caso de las pacientes con CaCu se incluyeron mujeres mayores de 18 años, sin antecedentes de otro tipo de cáncer, y que no hubieran recibido tratamiento previo.

#### 7.1.1. Características sociodemográficas de las pacientes con cáncer con procesamiento de galectina-4 sérica

Se incluyeron 52 muestras séricas, la media de edad de la población total fue de 50 años ( $\pm 15.58$  (SD)), la media de edad de las mujeres del grupo control fue de 32.92 años ( $\pm 9.29$  (SD)) y del grupo con CaCu de 55.26 años ( $\pm 13.19$  (SD)).

Se realizó un análisis de las características sociodemográficas de las pacientes con cáncer los resultados se muestran en la Tabla 6. Cabe resaltar que más del 40% de las pacientes tienen una escolaridad baja o no tienen estudios, el tabaquismo y alcoholismo no presentaron prevalencia. Los riesgos asociados al desarrollo de CaCu como el comportamiento sexual fueron analizados en la población de estudio, el 12.82% iniciaron su vida sexual antes de los 16 años y el 58.97% reportaron una única pareja sexual, por lo que estos factores de riesgo no parecen ser determinantes en nuestra población. En cuanto al número de hijos el 25.64% tienen menos de 3 hijos, siendo de llamar la atención que el 51.28% de las pacientes tienen más de tres hijos, lo que resalta que el número de embarazos representa un factor de riesgo prevalente en nuestra población. El 15.38% negó haber usado un método de planificación familiar, mientras que el 15.38% usó un método hormonal, el 12.82% utilizó el DIU y el 7.69% la salpingoclasia.

Tabla 6. Características sociodemográficas y ginecológicas de las pacientes con CaCu y suero procesado.

Característica	n	Porcentaje
<b>Escolaridad</b>		
Sin estudios	1	2.56
Básica	15	38.46
Media Superior	1	2.56
Superior	6	15.38
Sin datos	16	41.03
<b>Ocupación</b>		
Labores del hogar	20	51.28
Empleada/obrero	7	17.95
Administrativas	4	10.26
Sin datos	8	20.51
<b>Tabaquismo</b>		
No	17	43.59
Si	8	20.51
Sin datos	14	35.90
<b>Exfumadoras</b>		
Exfumadora >10 años	3	7.69
Exfumadora <10 años	7	17.94
Niega ser exfumadora	18	46.15
Sin datos	11	28.21
<b>Alcoholismo</b>		
No	20	51.28
Si	4	10.26
Sin datos	15	38.46
<b>Inicio de menstruación</b>		
< 12 años	15	38.46
> 12 años	16	41.03
Sin datos	8	20.51
<b>Inicio de vida sexual</b>		
≤ 16 años	5	12.82
> 16 años	24	61.54
Sin datos	9	23.08
<b>No. de parejas sexuales</b>		
1	23	58.97
>1	7	17.95
Sin datos	9	23.08
<b>Número de hijos</b>		
Ninguno	1	2.56
1 - 3	10	25.64
>3	20	51.28
Sin datos	8	20.51
<b>Abortos</b>		
No	21	53.85
Si	10	25.64

Sin datos	8	20.51
<b>Menopausia</b>		
No	4	10.25
Si	21	53.84
Sin datos	14	20.51
<b>Método de planificación familiar</b>		
Hormonal	6	15.38
Salpingoclasia	3	7.69
DIU	5	12.82
Ninguno	6	15.38
Sin datos	19	48.72

### 7.1.2. Características de las pacientes a las que se evaluó la expresión en tejido de galectina-4

Se incluyeron 35 biopsias de tejido de pacientes, 6 con diagnóstico normal y 29 con diagnóstico de CaCu. El grupo de pacientes con CaCu tienen una media de edad de 54.69 años ( $\pm 11.56$  (SD)) y una mediana de 52 años (rango 37-80). Respecto a las características sociodemográficas del grupo de CaCu, el 50% tienen educación básica, el tabaquismo y alcoholismo no presentaron prevalencia (Tabla 7). En cuanto a las características gineco-obstétricas: la mayoría de la población inició su vida sexual después de los 16 años y más del 60% reportaron una única pareja sexual. El método de planificación familiar de mayor uso fue el DIU 24.14%, luego el hormonal con 20.69% y la salpingoclasia con el 10.34%, estas características no representan un factor de riesgo respecto a lo reportado previamente.

Tabla 7 Características de las pacientes con CaCu y estudio en biopsia

Característica	n	Porcentaje
<b>Escolaridad</b>		
Básica	16	55.17
Media Superior	2	6.90
Superior	6	20.69
Sin datos	5	
<b>Ocupación</b>		
Labores del hogar	20	68.97
Empleada/obrero	6	20.69
Administrativas	1	3.45

Comerciante	2	6.90
<b>Tabaquismo</b>		
No	21	72.41
Si	5	17.24
Sin datos	3	10.34
<b>Exfumadora</b>		
>10 años	2	6.90
Negado	23	79.31
Sin datos	4	
<b>Alcoholismo</b>		
No	23	79.31
Si	2	6.90
Sin datos	4	
<b>Inicio de menstruación</b>		
< 12 años	7	24.14
> 12 años	22	75.86
<b>Inicio de vida sexual</b>		
≤ 16 años	9	31.03
> 16 años	20	68.97
<b>No. de parejas sexuales</b>		
1	20	68.97
>1	9	31.03
<b>Número de hijos</b>		
1-3	12	41.38
>3	17	58.62
<b>Abortos</b>		
No	13	44.83
Si	16	55.17
<b>Menopausia</b>		
No	10	34.48
Si	19	65.52
<b>Método de planificación familiar</b>		
Hormonal	6	20.69
OTB	3	10.34
DIU	7	24.14
Ninguno	7	24.14
Sin datos	6	

## 7.2. Concentración de galectina-4 en suero de pacientes con cáncer cervicouterino

Las 52 muestras se agruparon en mujeres con reporte citológico normal que conformaron el grupo control (n=13) y con CaCu (n=39). La mediana de la concentración de Gal-4 sérica en el grupo control fue de 382.14 pg/ml, mientras que en el grupo con CaCu fue de 507.08 pg/ml. El incremento en la concentración en el grupo de mujeres con cáncer fue estadísticamente significativo ( $p=0.0061$ ) (Figura 7).

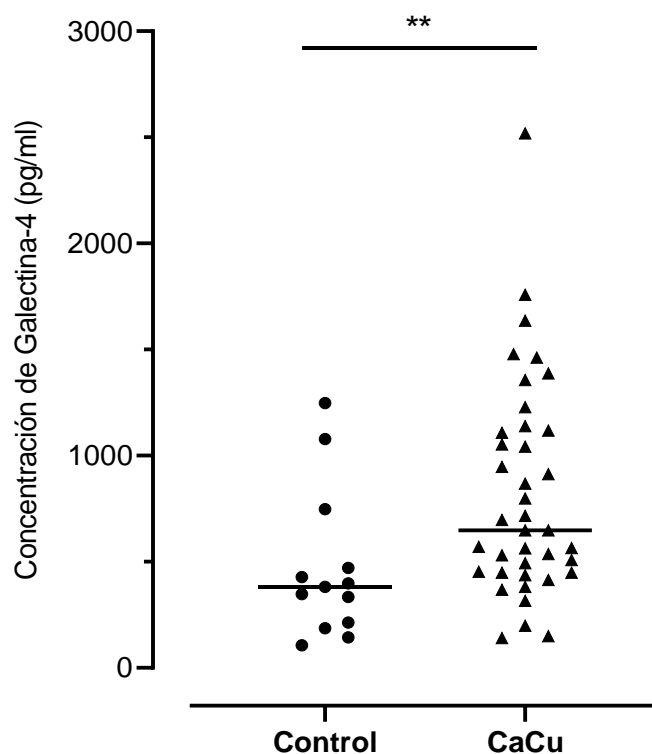


Figura 7. La concentración de Gal-4 sérica en mujeres con citología normal y mujeres con CaCu. Se muestra la concentración de Gal-4 (pg/ml) en suero de pacientes control (● n= 13), y con CaCu (▲ n= 39). Análisis de Mann-Whitney \*\*  $p=0.0061$ .

### 7.2.1. Análisis de la concentración de galectina-4 sérica y las características clínico-patológicas en pacientes con cáncer cervicouterino

Las pacientes con CaCu tienen características histológicas y clínicas importantes que se relacionan con el pronóstico y con la respuesta al tratamiento. Por esta razón nos interesó evaluar si existía una asociación entre la concentración de Gal-4 en suero con respecto al tipo histológico, la estadificación FIGO y el tamaño del tumor.

Tabla 8. Niveles séricos de Gal-4 y características clínico-patológicas.

Cáncer cervicouterino	n	Gal-4 en suero (pg/ml)			Valor de p <sup>a</sup>
		Media (SD)	Mediana	Rango	
<b>Tipo Histológico</b>					
Carcinoma Escamoso	32	878.23 (517.17)	757.06	141.13-2518.00	0.0949
Adenocarcinoma	7	563.39 (389.59)	493.63	149.88-1388.00	
<b>Estadificación FIGO</b>					
I-II	17	625.39 (423.48)	563.63	141.13-1462.14	0.1997
III-IV	10	779.65 (321.39)	681.99	453.63-1356.42	
No clasificable	12				
<b>Tamaño de tumor en su máxima extensión (cm)</b>					
≤5.1	8	815.63 (531.37)	613.15	198.63-1636.43	0.1325
>5.1	6	395.42 (206.99)	448.63	141.13-647.86	
Sin tamaño	24				

<sup>a</sup> valor de p fue calculada con un análisis Mann-Whitney.

Encontramos que los valores de la concentración la Gal-4 en suero del grupo de las pacientes con carcinoma escamoso no presentaron diferencia significativa con los valores del grupo de las pacientes con adenocarcinoma (Tabla 8) Pero podemos observar que el grupo de las pacientes con carcinoma escamoso mostró una mediana mayor que el que presenta el grupo de las pacientes con adenocarcinoma (Figura 8). Con relación al estadio clínico, encontramos que los valores de la concentración la Gal-4 en suero del grupo de las pacientes con estadios I-II no presentaron diferencia significativa con los valores del grupo de las pacientes con estadios III-IV, pero se puede observar que el grupo de las pacientes con estadios III y IV mostró una mediana mayor que el que presenta el grupo de las pacientes con estadios I y II (Figura 9). Por otra parte, encontramos que los valores de la concentración la Gal-4 en suero del grupo de las pacientes con un tamaño de tumor menor o igual a 5.1 centímetros no

presentaron diferencia significativa con los valores del grupo de las pacientes con un tamaño de tumor mayor a 5.1 centímetros, pero podemos observar que el grupo de las pacientes con un tamaño de tumor menor o igual a 5 centímetros mostró un promedio mayor que el que presenta el grupo de las pacientes con un tamaño de tumor mayor a 5.1 centímetros (Figura 10).

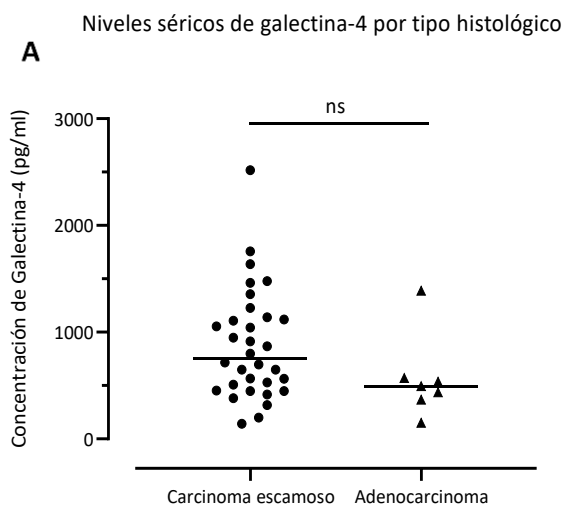


Figura 8. Niveles séricos de Gal-4 en pacientes con CaCu por tipo histológico  $p=0.0949$ .

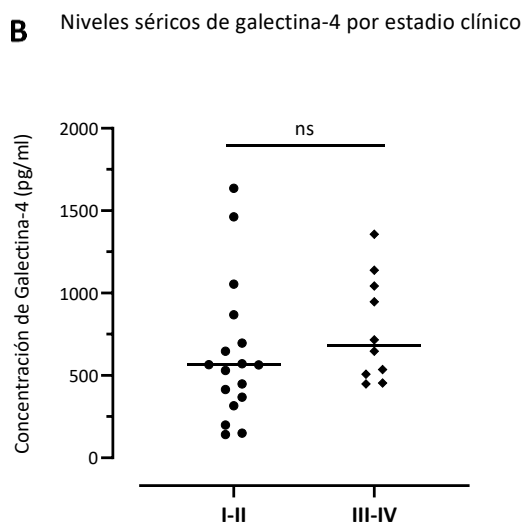


Figura 9. Niveles séricos de Gal-4 por estadio clínico  $p=0.1997$ .

**C** Niveles séricos de galectina-4 por tamaño de tumor

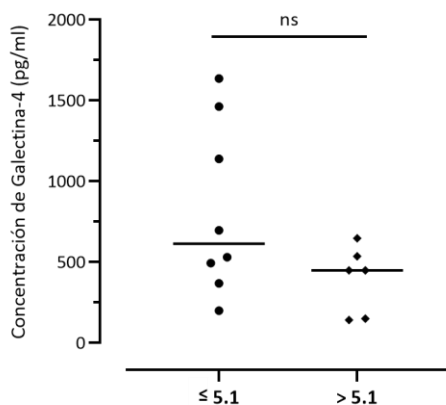


Figura 10. Niveles séricos de Gal-4 con respecto al tamaño de tumor  $p=0.1325$ .

Adicionalmente en el tipo histológico de carcinoma escamoso se analizó si existía alguna relación entre la concentración de Gal-4 y las características clínico-patológicas como grado de diferenciación, estadio clínico, tamaño tumoral, tipos queratinizante y no queratinizante (Tabla 9), no se realizó este análisis para adenocarcinoma ya que el grupo estuvo conformado sólo por 7 muestras.

Observamos una tendencia a la disminución de la concentración de Gal-4 conforme el tumor se va desdiferenciando, puesto que la mediana de la concentración de los pacientes con tumores bien diferenciados fue de 1813.00 pg/ml, la mediana de la concentración de los pacientes con tumores moderadamente diferenciados fue de 672.14 pg/ml, mientras que la mediana de los pacientes con tumores pobremente diferenciados fue de 507.86 pg/ml. Por otro lado, encontramos que la mediana de la concentración sérica de los estadios I-II fue de 564.31 pg/ml, y en los estadios clínicos III-IV fue de 716.13 pg/ml, observando una tendencia al incremento conforme avanza el estadio, sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Con respecto al tamaño de tumor no encontramos diferencias estadísticamente significativas, pero observamos que existe una tendencia al decremento de la concentración sérica con respecto al incremento al tamaño del tumor, puesto que obtuvimos una mediana de 917.86 pg/ml de las pacientes con tumores de  $\leq 5.1$  cm, mientras

que obtuvimos una mediana de 448.63 pg/ml del grupo de pacientes con tumores >5.1 cm. El análisis de la concentración sérica realizado entre los tumores queratinizantes y no queratinizantes no presentó diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 9. Niveles séricos de Gal-4 en pacientes con carcinoma escamoso y características clínico-patológicas.

Gal-4 en suero (pg/ml)						
	n	Media (SD)	Mediana	Rango		Valor de p <sup>a</sup>
<b>Diferenciación</b>						
Pobre	5	612.01 (317.89)	507.86	448.63-1139.29	Pobre vs moderada	>0.9999 <sup>a</sup>
Moderada	16	755.44 (391.97)	672.14	198.63-1636.43	Moderada vs bien	0.2625 <sup>a</sup>
Bien	2	1813.00 (997.02)	1813.00	NA	Bien vs pobre	0.1390 <sup>a</sup>
No reportado	9					
<b>Queratinización</b>						
No	13	733.84 (384.90)	696.43	141.13-1462.14		0.8960 <sup>b</sup>
Si	9	810.51 (404.66)	716.13	381.13-1478.00		
No reportado	10					
<b>Estadificación FIGO</b>						
I-II	14	681.60 (441.16)	564.31	141.13-1636.43		0.3280 <sup>b</sup>
III-IV	9	806.67 (328.62)	716.13	453.63-1356.42		
No clasificable	9					
<b>Tamaño de tumor en su máxima extensión (cm)</b>						
≤5.1	6	943.80 (561.15)	917.86	529.88-1636.43		0.1048 <sup>b</sup>
>5.1	4	421.56 (209.22)	448.63	141.13-647.86		
Sin tamaño	29					

<sup>a</sup> valor de *p* fue calculada con Kruskal Wallis y post análisis de Dunn's, <sup>b</sup> *p-value* fue calculada con un análisis Mann-Whitney.

### 7.2.2. Galectina-4 sérica como marcador diagnóstico en pacientes con cáncer cervicouterino

Para evaluar si Gal-4 sérica podría ser una proteína candidata para biomarcador diagnóstico, que permitiera diferenciar entre pacientes con CaCu y mujeres con citología normal, se realizó un análisis ROC (*Receiver-operating characteristic*) considerando las concentraciones séricas de ambos grupos. La gráfica que se generó muestra el equilibrio entre la sensibilidad (detectar pacientes enfermos) y la especificidad (detectar la ausencia de la enfermedad). El área bajo la curva ROC para la Gal-4 sérica fue de 0.7515 con una significancia de  $p=0.0071$ , con un 95% de intervalo de confianza 0.5900 a 0.9129, error estándar de 0.0823. En la Figura 11 se muestra la curva ROC de Gal-4 sérica, el valor de

corte (índice Youden) fue de 432.14 pg/ml. Considerando este valor de corte se detectan el 82.1% de verdaderos positivos (pacientes con CaCu) y una especificidad del 69.2% (verdaderos negativos), obteniendo un 30.8% de falsos positivos.

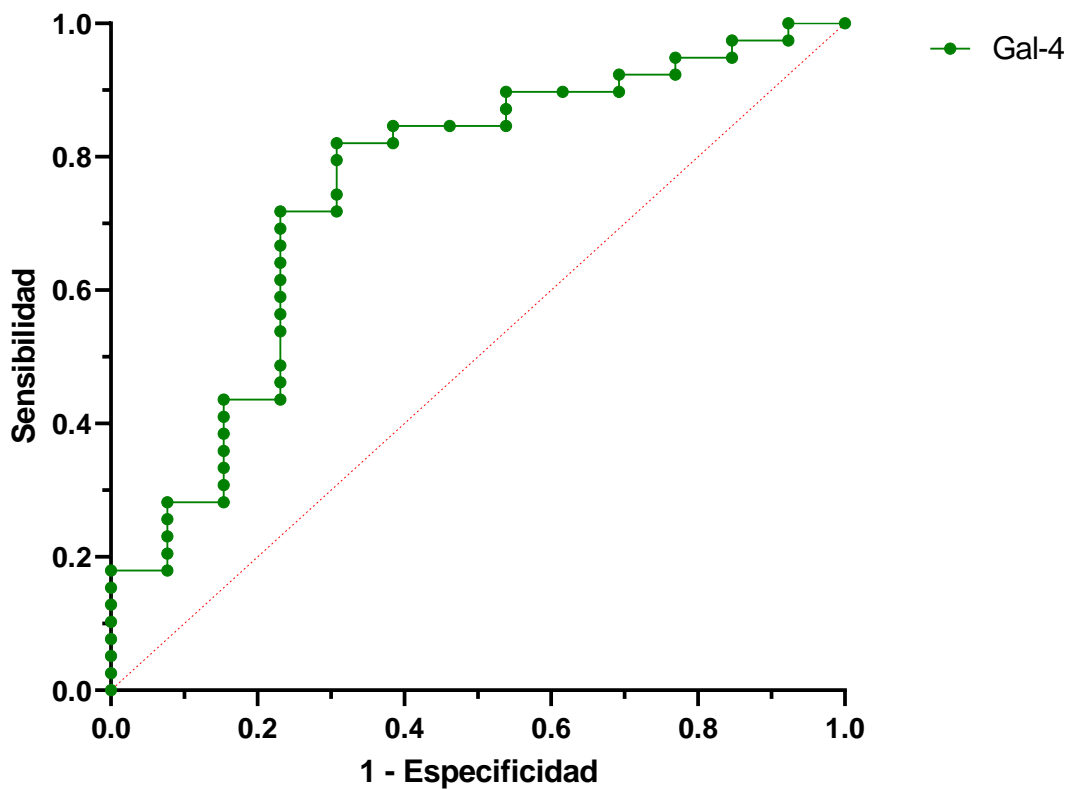


Figura 11. Curva ROC de la concentración sérica de Gal-4 de pacientes con CaCu. La gráfica muestra un área bajo la curva de 0.7515,  $p=0.0071$ , 0.5900 a 0.9129 de 95% de intervalo de confianza, error estándar de 0.0823.

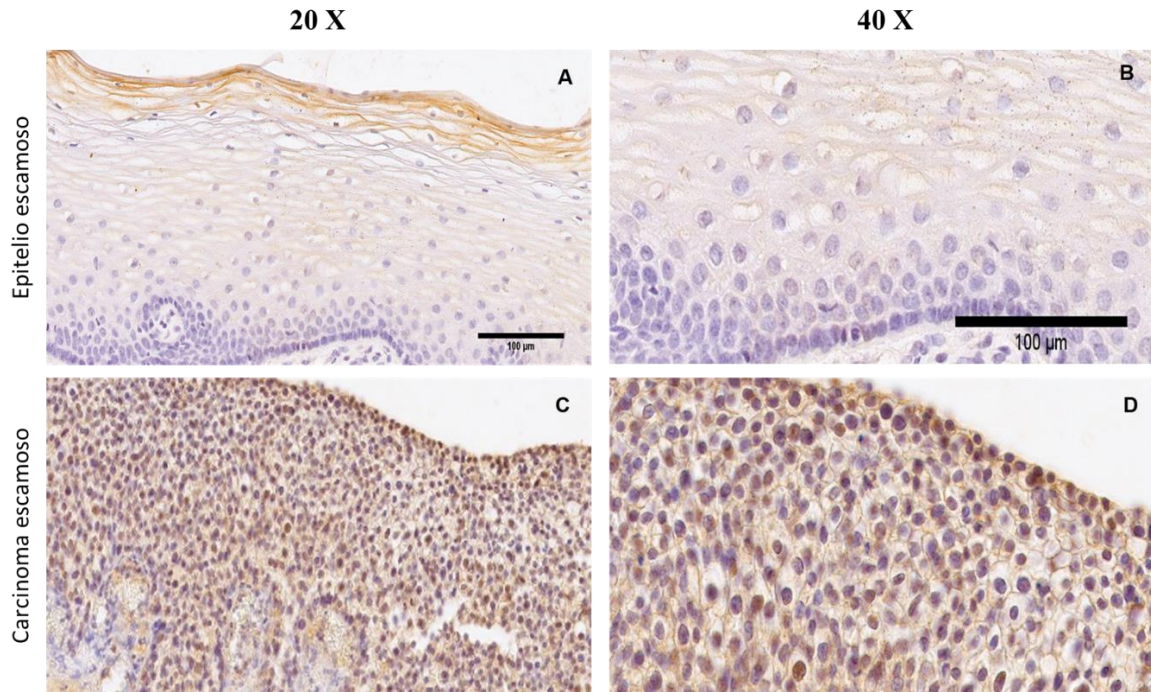
## **7.3. Expresión de galectina-4 en tejido de pacientes con cáncer cervicouterino**

### **7.3.1. Expresión de galectina-4 en epitelio escamoso**

La expresión de la Gal-4 no había sido reportada en tejido de cérvix, así que nuestro primer interés fue determinar si estaba presente en epitelio cervical, por lo que en primera instancia realizamos ensayos inmunohistoquímicos en epitelio de tejido normal. Se utilizaron 6 muestras de pacientes con diagnóstico normal y 29 con CaCu (23 diagnosticadas con CEE, 5 con adenocarcinoma y 1 con carcinoma adenoescamoso).

Los resultados mostraron la presencia de la proteína Gal-4 tanto en epitelio normal como en el tejido de pacientes. El patrón de expresión en epitelio cervical normal mostró diferencias en cuanto a los estratos del epitelio. Al respecto, encontramos que las células de la lámina basal no mostraron presencia de Gal-4, sin embargo, ésta fue detectada en las células diferenciadas de las láminas parabasales, intermedia y superficial, con una expresión predominante en la lámina superficial. Además, observamos la expresión de Gal-4 en las células del estroma. A nivel celular observamos que la expresión de Gal-4 se encuentra localizada principalmente en el citoplasma de las células, (Figura 12A y Figura 12B).

También encontramos que el patrón de expresión de la Gal-4 en los tejidos de CCE, fue diferente al del tejido normal. Observamos que los niveles de expresión de la Gal-4 fueron mayores en algunas biopsias de tumores con respecto al tejido normal, y que su presencia no se limitó al citoplasma, mostrando una importante expresión en el núcleo de las células tumorales (Figura 12C y Figura 12D). Al igual que en tejido normal se observó la presencia de Gal-4 en el estroma.



*Figura 12. Inmunodetección de Gal-4 en epitelio escamoso de tejido normal y con CaCu. En el epitelio normal (A y B) la expresión de Gal-4 se encontró en el citoplasma de las células, mientras que en tejido tumoral (C y D) la expresión de Gal-4 se encontró tanto en citoplasma como en núcleo. Las fotos se tomaron en una amplificación de 20X y 40X.*

Con la finalidad de determinar si el nivel de expresión de Gal-4 se modificaba en relación con las características clínico-patológicas, evaluamos los niveles de expresión con respecto al estadio clínico, el tipo histológico, el grado de diferenciación del tumor y si éste era de tipo queratinizante o no queratinizante (Tabla 10). Encontramos que los tumores queratinizantes mostraron un aumento estadísticamente significativo en la expresión de Gal-4 respecto a los no queratinizantes (Figura 13 y Tabla 10). Se encontró una tendencia de incremento en la expresión de Gal-4 en los tumores correspondientes a estadios avanzados de la enfermedad, sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (Figura 12).

Tabla 10. Nivel de expresión de Gal-4 en tejido y características clínico-patológicas de pacientes con CaCu

Cáncer cervicouterino	n	Niveles de expresión de Gal-4 (lum)		Valor de p <sup>a</sup>
		Mediana	Rango	
<b>Tipo histológico</b>				
Carcinoma escamoso	23	72.216	4.129-151.793	Carcinoma escamoso vs Adenocarcinoma 0.3272
Adenocarcinoma	5	61.985	11.779-90.595	
Carcinoma adenoescamoso	1	22.053	NA	
<b>Diferenciación</b>				
Pobre	2	80.560	NA	Pobre vs moderada 0.6403
Moderada	21	71.028	4.129-151.793	
Bien	1	90.575	NA	
No reportado	5			
<b>Queratinizante</b>				
No	16	62.226	4.129-129.247	0.0318
Si	5	102.896	55.008-110.984	
No reportado	8			
<b>Estadificación FIGO</b>				
I-II	16	57.434	4.129-151.793	0.1868
III-IV	9	78.020	19.747-120.247	
No clasificable	4			
<b>Tamaño de tumor (cm)</b>				
≤5.1	9	61.985	4.129-90.575	0.1797
>5.1	10	62.115	9.532-77.060	
Sin tamaño	10			

<sup>a</sup> valor de p fue calculado con el análisis Mann-Whitney.

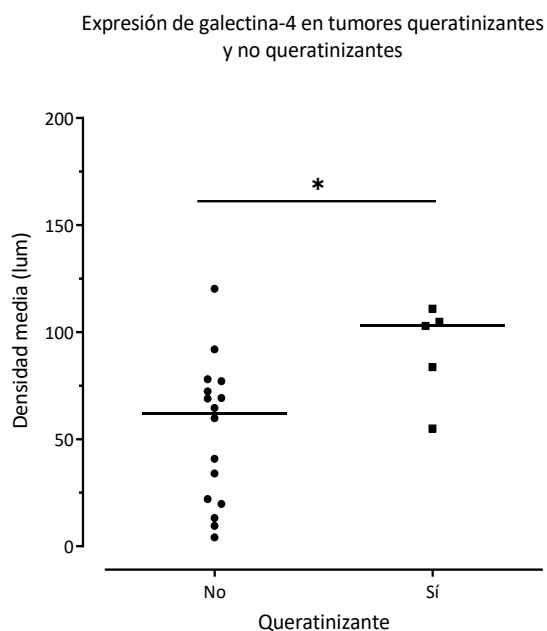


Figura 13. Expresión de Gal-4 en tejidos respecto a queratinización. Expresión de Gal-4 en tumores queratinizantes (● n=16) y no queratinizantes (■ n=5). Los niveles de expresión de Gal-4 en tumores fue mayor que en los que no presentan queratina, La media de la intensidad de la expresión de Gal-4 fue calculada con el programa Image-Pro. Análisis Mann-Whitney \* p=0.0318.

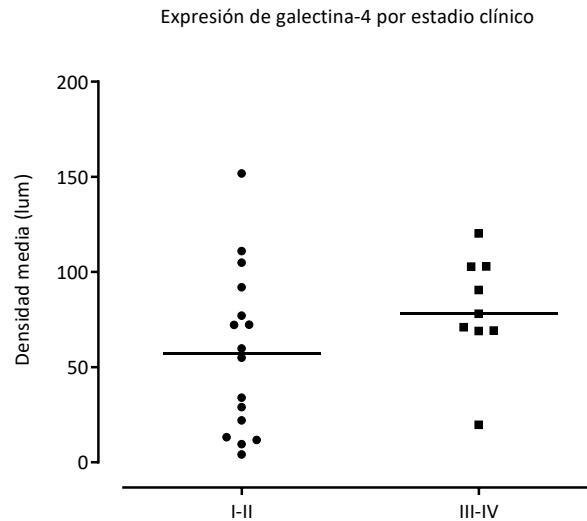
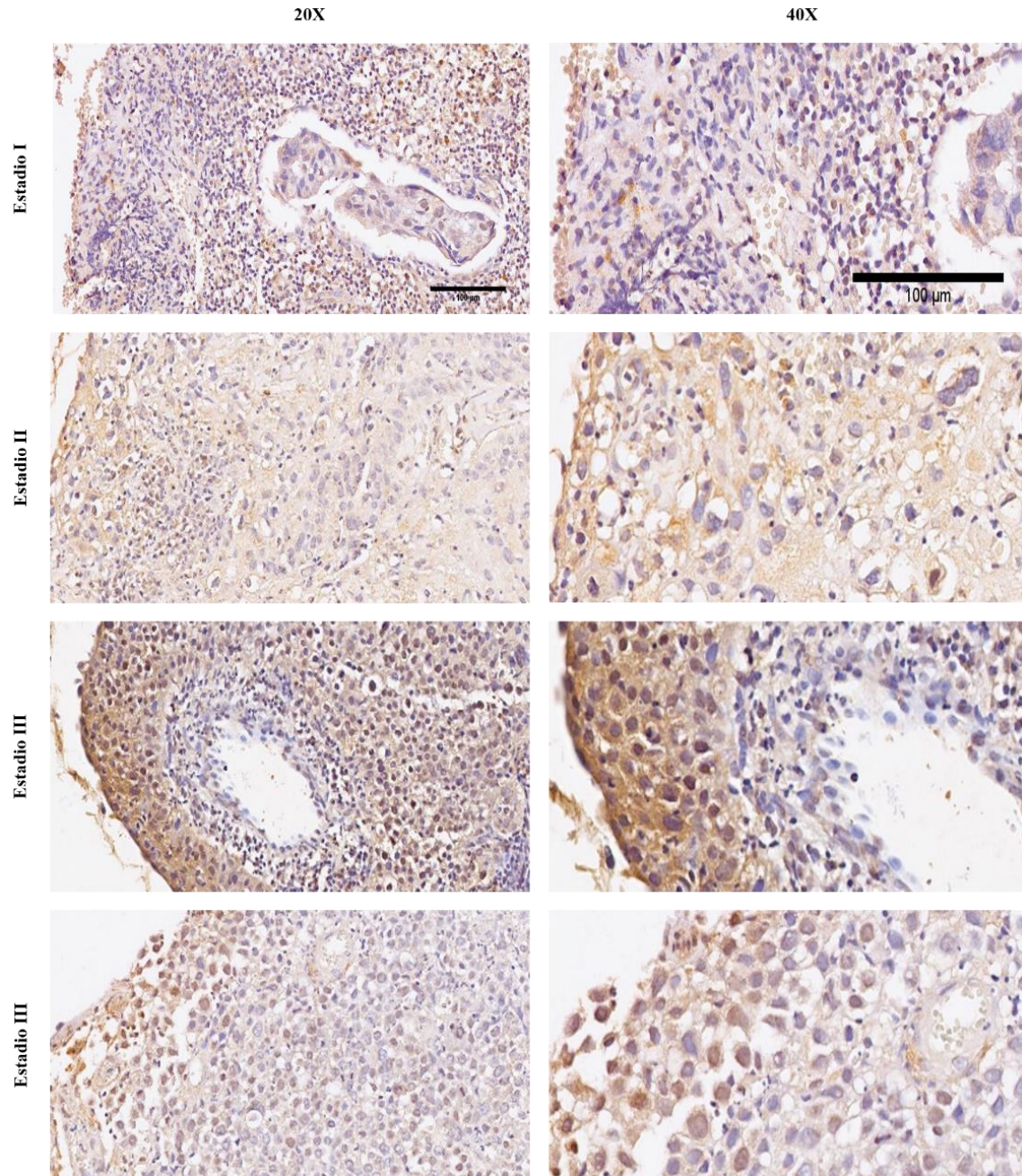


Figura 14. Expresión de Gal-4 respecto a estadio FIGO. Se muestra la expresión de Gal-4 en tumores de pacientes con estadios FIGO I-II (● n=16) y III-IV (■ n=9). En estadios tempranos (I-II) se observó un menor nivel de expresión de Gal-4, con respecto a los estadios tardíos (III-IV). La media de intensidad de coloración en las biopsias se obtuvo con el programa Image-Pro. El análisis Mann-Whitney no mostró diferencias significativas (p=0.1868).

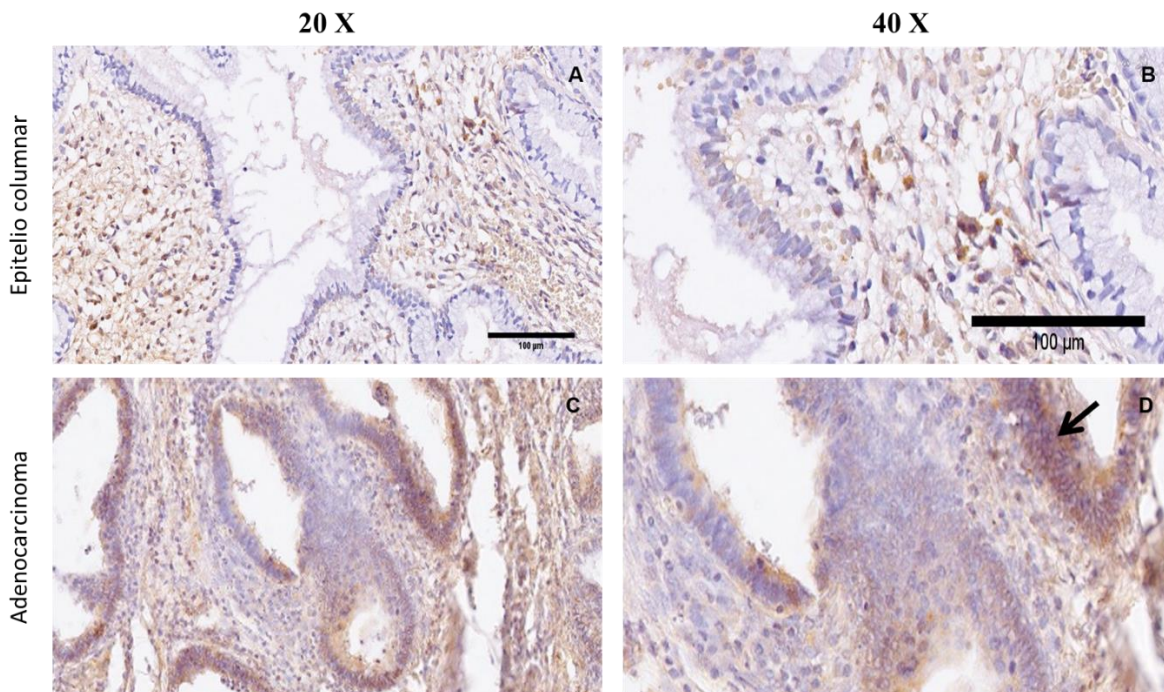
Posteriormente evaluamos la expresión de Gal-4 con relación al estadio clínico en tumores con diagnóstico histológico de CEE. La expresión de la Gal-4 se observó en las células epiteliales de los tumores de pacientes en los cuatro estadios, tanto en citoplasma como en núcleo, además el nivel de expresión fue mayor en algunas células tumorales. (Figura 15). El nivel de expresión de Gal-4 y localización no muestran tener una relación con el estadio clínico, incluso muestras de diferentes estadios presentaron un nivel de expresión similar entre ellas. Así mismo, la localización nuclear no parece estar asociada a la progresión del cáncer, sin embargo, se requiere analizar un mayor número de muestras.



*Figura 15. Expresión de Gal-4 en tumores de pacientes con CCE de cérvix en diferentes estadios. La expresión de la Gal-4 se muestra en células epiteliales de tumores de pacientes con diferentes estadios, tanto en citoplasma como en núcleo, observando un nivel de expresión alto en algunas células tumorales. El análisis estadístico no mostró una relación entre la intensidad de coloración con el estadio clínico.*

### 7.3.2. Expresión de galectina-4 en epitelio columnar.

La expresión de Gal-4 se evaluó en el epitelio columnar normal y adenocarcinoma, para ello fueron procesadas 2 biopsias de epitelio columnar normal y 5 de adenocarcinomas. Encontramos que el nivel de expresión de Gal-4 en células columnares de tejido normal fue bajo, localizándose en el citoplasma, (Figura 16A y Figura 16B). En las muestras de adenocarcinoma encontramos que el nivel de expresión de Gal-4 mostró un incremento, detectando su presencia tanto en núcleo como en el citoplasma (Figura 16C y Figura 16D), además observamos que las zonas de alta proliferación tienen una mayor expresión de la Gal-4 (en la Figura 16D se señala con una flecha).



*Figura 16. Inmunodetección de Gal-4 en epitelio columnar de muestras normales y con CaCu. Se muestra el epitelio columnar normal (A y B) y con CaCu (C y D). Se encontró que epitelios columnares normales tienen una baja expresión de Gal-4 a diferencia de los adenocarcinomas. En los tejidos de adenocarcinoma se observó principalmente en las células columnares.*

### 7.3.3. Evaluación de la localización de galectina-4 en tejido cervical por inmunofluorescencia

La localización de Gal-4 en epitelio escamoso con diagnóstico normal y con diagnóstico de CaCu, fue determinada mediante ensayos de inmunofluorescencia, la expresión de Gal-4 se muestra en color verde y los núcleos en color azul.

En el epitelio normal, se observa la membrana basal que delimita perfectamente el epitelio escamoso del estroma, en el aumento 20X se puede observar con mayor detalle el orden que mantienen las capas epiteliales (Figura 17). La localización de Gal-4 se detectó principalmente en el citoplasma, sin embargo, también observamos la expresión de Gal-4 en los núcleos (Figura 17C y F). Respecto al estroma, la expresión de Gal-4 se encuentra predominantemente en el citoplasma y su presencia en algunos núcleos. En los vasos sanguíneos se observa que Gal-4 tiene una fuerte señal en los glóbulos rojos.

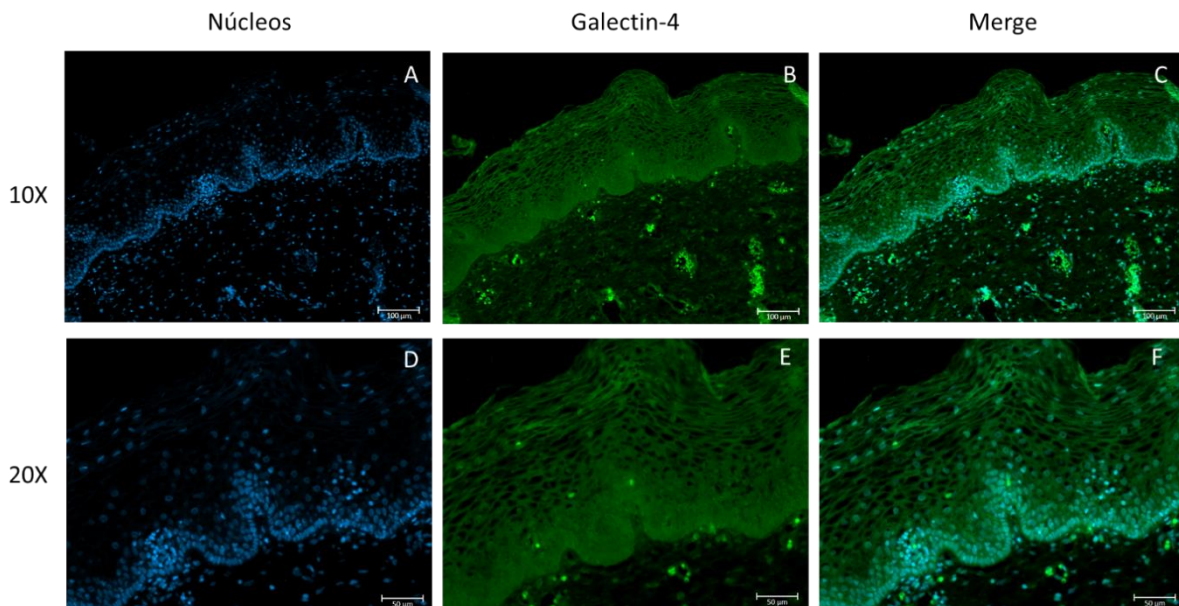
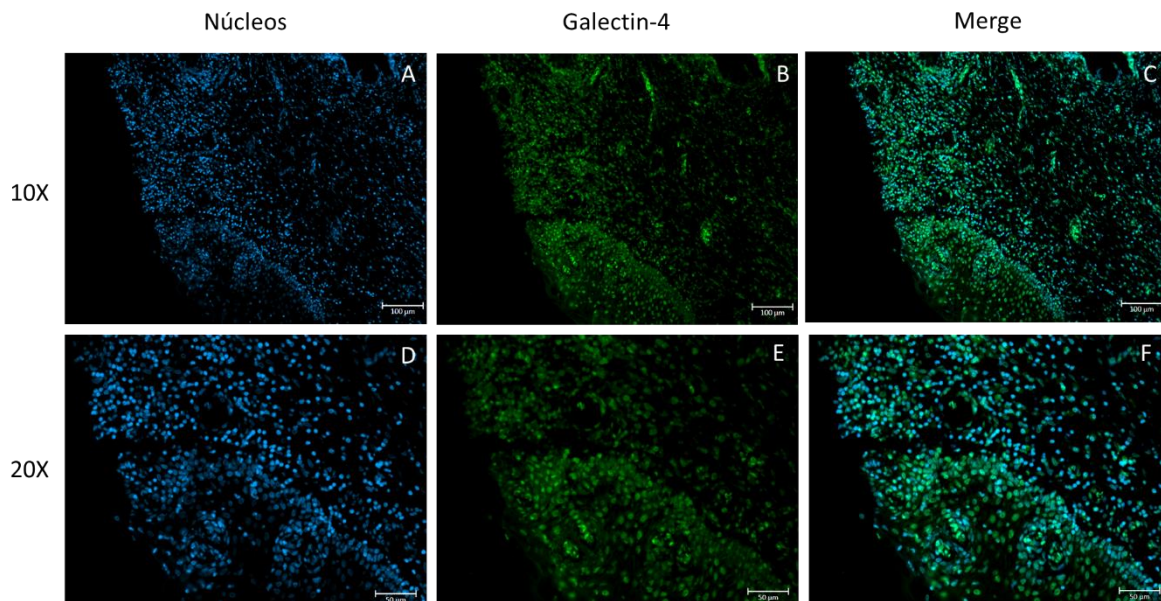


Figura 17. Detección de Gal-4 por inmunofluorescencia en tejido de cérvix normal. La expresión de Gal-4 se muestra en color verde (Alexa Fluor 488) y los núcleos en color azul (DAPI). Figura A y D, se muestra la tinción de núcleos en aumento 10X y 20X. Figuras B y E se muestra la tinción de Gal-4 a un aumento de 10X y 20X. En las figuras C y F se muestra el merge de ambas señales.

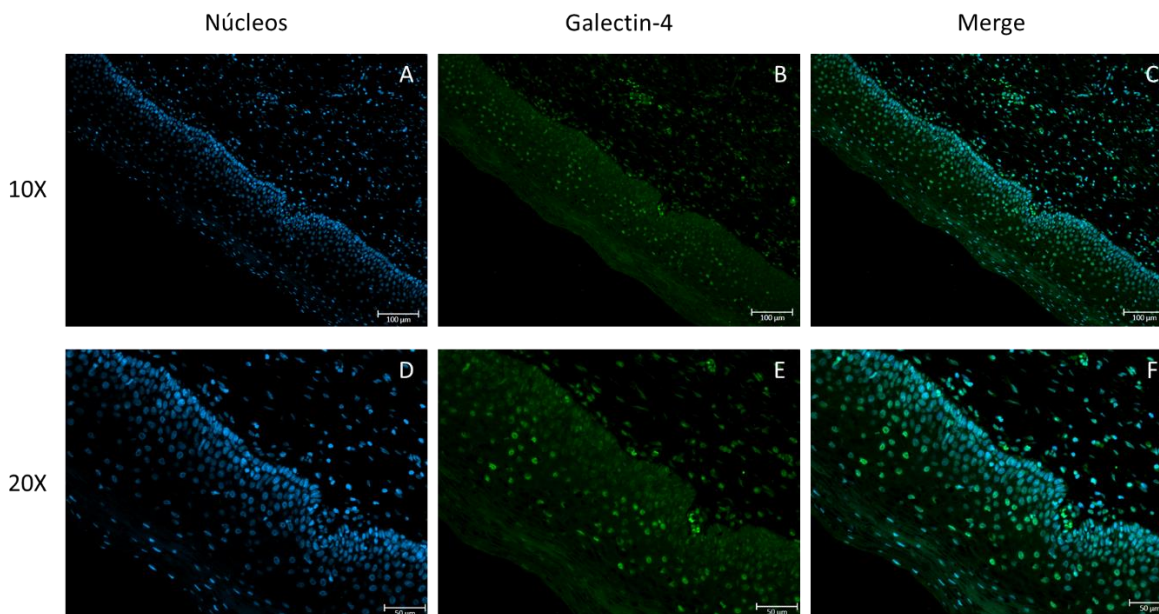
En el tejido con CaCu podemos ver que el epitelio perdió el orden en la estructura de las láminas, no es posible observar a la lámina basal que naturalmente delimitaría con el estroma, así como tampoco en las láminas superiores del epitelio escamoso (Figura 18). Se observa en la Figura 18E que la proteína Gal-4 se localiza principalmente en los núcleos y con menor presencia en el citoplasma, contrario a lo que se observó en epitelio normal. El cambio de localización de Gal-4 también se observa en el estroma donde es predominantemente nuclear.



*Figura 18. Localización de Gal-4 en el epitelio de un tejido con diagnóstico de CaCu. La expresión de Gal-4 se muestra en color verde y la tinción nuclear en color azul. Figuras A y D, se muestra la tinción de núcleos en aumento 10X y 20X. Figuras B y E se muestra la tinción de Gal-4 a un aumento de 10X y 20X. En las figuras C y F se muestra el merge de ambas señales.*

En la biopsia de tejido con CaCu identificamos una zona que muestra características de una lesión escamosa intraepitelial, con la lámina basal delimitada y con una pérdida moderada en el orden en las láminas del epitelio (Figura 19). La localización de Gal-4 se encuentra en el citoplasma, sin embargo, observamos núcleos con una alta tinción, a diferencia del epitelio

normal de la Figura 18. Estos resultados sugieren que el cambio de localización de la Gal-4 hacia el núcleo de las células empieza a observarse en lesiones precursoras. En el estroma se observa una expresión de Gal-4 en la mayoría de los núcleos, pero no en el citoplasma.



*Figura 19. Localización de Gal-4 en un epitelio con características de una lesión escamosa intraepitelial de un tejido con diagnóstico de CaCu. La expresión de Gal-4 se muestra en color verde y los núcleos en color azul. Figuras A y D, se muestra la tinción de núcleos en aumento 10X y 20X. Figuras B y E se muestra la tinción de Gal-4 a un aumento de 10X y 20X. En las figuras C y F se muestra el merge de ambas señales.*

## 7.4. Concentración sérica de galectina-4 y la relación con su nivel de expresión en tejido de pacientes con cáncer cervicouterino

Para evaluar si la concentración sérica de Gal-4 se relacionaba con el nivel de expresión en las biopsias de tejido tumoral, se realizó un análisis de correlación entre el suero y la biopsia correspondiente en un grupo de 10 pacientes (Tabla 11). Realizamos un análisis de correlación de Spearman el cual no mostró significancia  $p=0.4918$  (Figura 20).

Tabla 11. Nivel de expresión de Gal-4 en suero y tejido de pacientes con CaCu

Paciente	Gal-4		Estadio FIGO
	Suero (pg/ml)	Tejido (lum)	
1	1462.14	59.86	IIB
2	563.63	91.95	IIB
3	647.86	102.89	IIIB
4	381.13	83.66	NC
5	507.86	120.24	IIIB
6	565.00	151.79	IIB
7	536.43	71.02	IIIB
8	414.88	104.87	IIB
9	913.63	64.59	IIB
10	493.63	61.98	IB

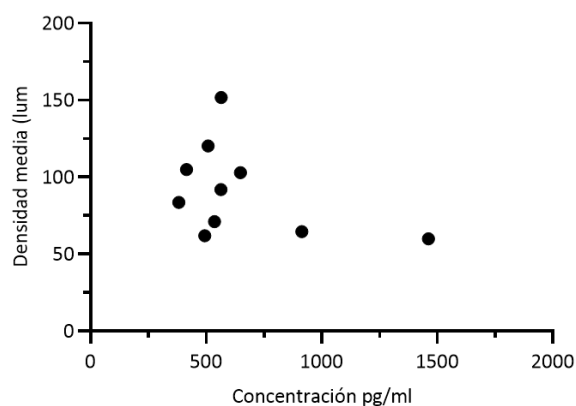


Figura 20. Gal-4 en suero y tejido de pacientes. En el nivel de expresión en tejido se muestra con la densidad media de los niveles séricos, se muestran con la correlación de Spearman  $r, p=0.4918$ .

## 7.5. Niveles de expresión del gen *LGALS4* y proteína en líneas celulares de cérvix

### 7.5.1. Cuantificación de la expresión del gen *LGALS4* en líneas celulares.

Los niveles de expresión del gen *LGALS4* se determinaron con un PCR tiempo real en líneas celulares de cérvix, como control de fenotipo no tumoral se usaron las células HaCaT y el control positivo de expresión fueron las células Jurkat.

Todas las líneas celulares evaluadas mostraron expresión del gen *LGALS4*, en la Figura 21 se muestran los niveles de expresión con respecto a la línea celular HaCaT. La línea celular SiHa presentó la mayor expresión, siendo 3.31 veces mayor que la línea control ( $p < 0.0001$ ), por otro lado, las líneas celulares CasKi, HeLa y C33A presentaron niveles de ARNm semejantes a la línea control. La línea celular Jurkat que se utilizó como control positivo tuvo una expresión 2.25 veces mayor que HaCaT ( $p < 0.05$ ).

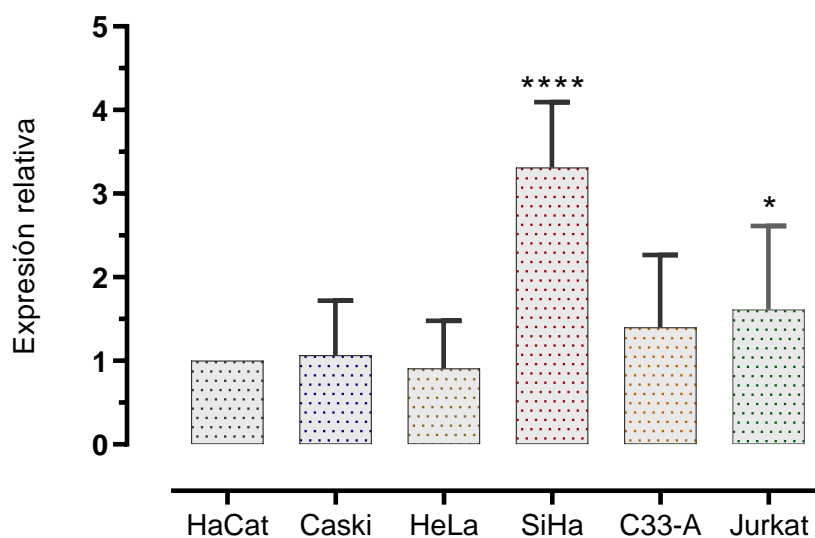


Figura 21. Niveles de expresión del gen *LGALS4* en diferentes líneas celulares. La expresión fue analizada mediante PCR tiempo real, los niveles de expresión del gen *LGALS4* fueron normalizados con el gen endógeno hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (*HPRT*), la expresión relativa fue obtenida empleando el método  $\Delta\Delta Ct$ . ANOVA de una vía con un post-análisis de Dunnet, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.001$

El nivel de expresión del gen *LGALS4* no mostró cambios con respecto al origen celular ni con respecto al tipo de VPH, ya que SiHa, Caski y C33A son de tipo escamoso y únicamente SiHa mostró mayor expresión, además no tiene relación con el tipo de VPH, ya que HeLa tiene integrado el genoma del VPH-18, mientras que SiHa y Caski tienen integrado el genoma del VPH-16, por otro lado, C33A es negativa a VPH.

### 7.5.2. Evaluación de la expresión de la proteína galectina-4 en líneas celulares.

Para identificar la expresión de la proteína de Gal-4 usamos el ensayo de WB. Considerando los resultados de expresión relativa en el que la línea celular SiHa mostró los niveles más altos de ARNm del gen *LGALS4* realizamos la detección de la proteína en esta línea celular, así como en la línea celular HaCaT. Inicialmente usamos el anticuerpo monoclonal anti-Gal4 (ab175185), el cual tiene reactividad por Gal-4 de humano y reconoce Gal-4 de rata, el reconocimiento se da en la región que comprende los aminoácidos 1-100. No se logró detectar la proteína en las líneas celulares evaluadas, como control positivo usamos proteínas de yeyuno del intestino delgado de rata (Figura 22).

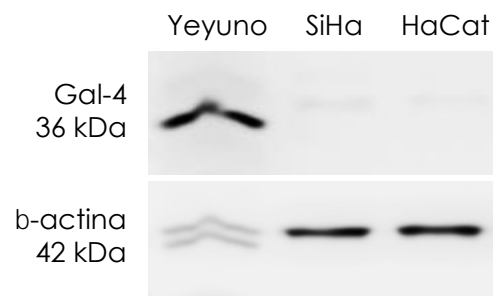


Figura 22. Detección de Gal-4 en líneas celulares de cérvix. Se realizó Gal-4 mediante un western blot en líneas celulares SiHa y HaCat, como control positivo se usó yeyuno de rata. Como control de carga se usó un anticuerpo anti- $\beta$ -actina.

Para verificar si realmente la proteína Gal-4 estaba ausente en las células SiHa y HaCaT realizamos los ensayos de WB empleando una clona diferente de anticuerpo anti-Gal4 (ab170638), este anticuerpo reconoce la región que comprende los aminoácidos 77-106. Para este ensayo usamos como control positivo extracto proteico de células Jurkat, como lo señala el inserto de la casa comercial. Los resultados muestran una banda de aproximadamente 36 kDa correspondiente al peso molecular de Gal-4 (Figura 23). Se realizó un análisis densitométrico de la intensidad de las bandas, los resultados no muestran diferencias entre las líneas celulares analizadas, como control usamos  $\beta$ -actina que utilizamos para normalizar los valores.

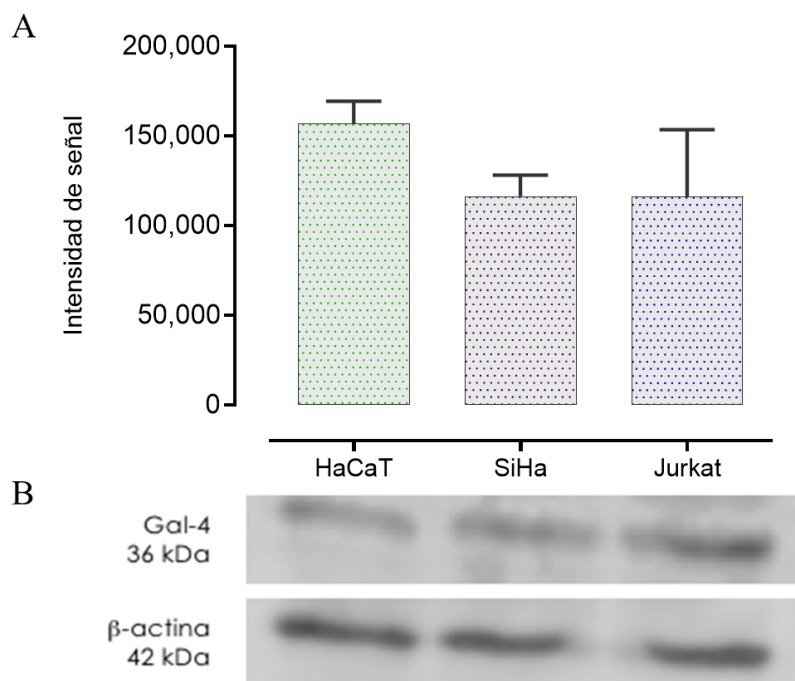
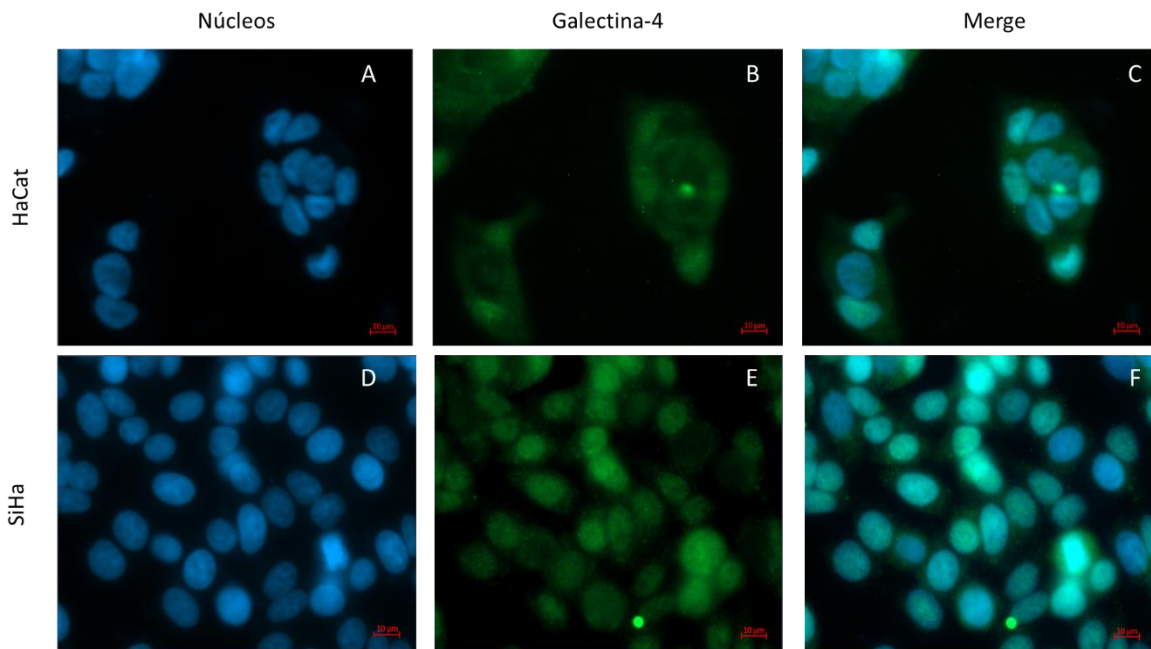


Figura 23. Identificación de la expresión de la Gal-4 en líneas celulares A. Nivel de expresión de Gal-4 en las células HaCaT, SiHa y Jurkat. Se muestran los resultados del análisis densitométrico de las bandas de Gal-4 normalizadas con respecto a  $\beta$ -actina B. Ensayo de WB que muestra la detección de Gal-4 en líneas celulares mencionadas, para el ensayo fueron usados 100  $\mu$ g de proteína total para cada tipo celular. Se hizo un análisis de ANOVA de una vía con un post análisis de Dunn's,  $n=4$ .

### 7.5.3. Localización de galectina-4 en líneas celulares

En las líneas celulares HaCat (no tumoral) y SiHa (CCE) se evaluó la localización de Gal-4 mediante una detección con inmunofluorescencia. En la Figura 24 se muestra en color verde la localización de Gal-4 (B y E) y en color azul los núcleos de las células HaCaT y SiHa (A y D). Observamos que en las células HaCaT, la proteína se localiza principalmente en el citoplasma con baja presencia en los núcleos, mientras que en las células SiHa la proteína se localiza principalmente en los núcleos con menor expresión en el citoplasma.



*Figura 24. Localización de Gal-4 en líneas celulares. En el panel se ejemplifica la expresión de Gal-4 en HaCat (control) y SiHa (CCE), en A y D se observa la tinción nuclear (DAPI), en B y E la expresión de Gal-4 y en C y F el merge de ambas señales. En las microfotografías se muestra la expresión de Gal-4 en color verde y la tinción nuclear en color azul, las imágenes de tomaron con un objetivo de 63X de inmersión*

## 8. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la concentración sérica de Gal-4 en pacientes con CaCu y evaluar el nivel de expresión de Gal-4 en tejido y líneas celulares con características normales y cáncer.

Los niveles séricos de Gal-4 en pacientes con CaCu fueron más altos que en el suero de pacientes con diagnóstico normal. Los niveles séricos de galectina-4 se han analizado en adenocarcinoma gástrico [156], cáncer de colon, cáncer de mama [146, 155] y carcinoma hepatocelular (CHC) [141]. En todos los tipos de cáncer, se informó que la concentración sérica de Gal-4 incrementa. En el caso del cáncer de colon, los niveles séricos de Gal-4 aumentaron 11,1 veces en general y 25,3 veces en pacientes con metástasis con respecto a los niveles en el grupo sano; en pacientes con cáncer de mama, se detectó un aumento de 11 veces [146]. Con respecto al cáncer hepatocelular, la Gal-4 solo incrementó en el suero de pacientes con CHC e infección por el virus de la hepatitis B [141], y también se encontró una asociación entre niveles séricos más altos y características más agresivas del cáncer. Nuestros resultados son similares a los reportados en otros tipos de cáncer, en los que los niveles séricos de Gal-4 aumentan en pacientes con cáncer en comparación con pacientes sin enfermedad. Además, observamos una tendencia hacia el aumento en la concentración sérica de Gal-4 de pacientes con tumores queratinizantes en comparación con los tumores no queratinizantes, así como en los estadios clínicos III y IV con respecto a los estadios clínicos I y II. La queratinización es una característica morfológica identificable en CCE que permitiría determinar el pronóstico de los pacientes. Los pacientes con tumores queratinizantes presentaron una menor supervivencia respecto a los no queratinizantes, además de que los tumores queratinizantes tienen una pobre diferenciación y están en etapas más avanzadas, lo que representa un peor pronóstico para las pacientes [164], esto también ha sido reportado en carcinomas de células escamosas orofaríngeas [165]. Si bien no ha sido evaluado el efecto que tiene un incremento de Gal-4 sérica en pacientes con tumores queratinizantes ya he reportado que estos presentan un peor pronóstico.

En los carcinomas hepatocelulares y colorrectales, se ha informado de una asociación entre concentraciones más altas de Gal-4 sérica y estadio clínico avanzado [141, 146]. Además, en pacientes con hepatocarcinoma, las concentraciones séricas más altas de Gal-4 se asociaron con metástasis [155]. Nuestros resultados sugieren que la Gal-4 podría tener un papel en la invasión y metástasis de CC, pero se deben analizar más muestras de suero de pacientes en estadio clínico IV para confirmar esta asociación. No se caracterizó el papel de la Gal-4 circulante. Los estudios *in vitro* sugieren que las galectinas circulantes podrían participar en el reclutamiento de células tumorales en el endotelio vascular. Se demostró en un modelo *in vivo* de ratones desnudos, que la galectina-3 circulante participa en la metástasis. La galectina-3 se une al antígeno oncofetal de Thomsen-Friedenreich, que es un disacárido (Gal  $\beta$ 1,3GalNAc) presente en la proteína transmembrana MUC1 de las células tumorales, y la interacción favorece la exposición de otras moléculas de adhesión, lo que facilita la adhesión de las células tumorales al endotelio vascular [102].

Es importante mencionar que la desviación de los valores séricos de Gal-4 en pacientes con CaCu fue alta; en algunos casos, los niveles séricos en pacientes con CaCu fueron similares a los de mujeres sanas, y en otros casos, los niveles séricos en pacientes con CaCu fueron el doble de los valores en mujeres sanas. En pacientes con adenocarcinoma gástrico, se han informado valores de hasta 40 veces los valores en personas sanas en algunos pacientes con cáncer, mientras que otros pacientes tienen valores similares a los de las personas sanas [156]. Estas diferencias podrían estar asociadas con la progresión del cáncer y podrían utilizarse para la identificación temprana de pacientes con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad. Además se ha propuesto que las galectinas circulantes podrían ser dianas terapéuticas para reducir la metástasis [156].

En otros tipos de cáncer y otras patologías Gal-4 sérica se ha propuesto como un biomarcador de diagnóstico, de progresión o de seguimiento de la enfermedad. Hemos analizado la utilidad clínica de Gal-4 sérica en el diagnóstico de CaCu, Gal-4 sérica podría funcionar como un biomarcador diagnóstico. El AUC fue de 0.7515 con un punto de corte de 432.14 pg/ml que presenta una sensibilidad de 82.1% y una especificidad de 69.2%. En un contexto clínico indicaría que una paciente con una concentración de Gal-4 sérica  $\geq 432.14$  pg/ml puede ser diagnosticado con CaCu con una confianza del 82.1%. En pacientes con

adenocarcinomas gástricos Gal-4 sérica presentó un AUC de 0.904 y un punto de corte de 420 pg/ml con un valor de confianza de 62.5% [156]. La determinación plasmática de Gal-4 en cáncer colorrectal tuvo un AUC de 0.786, con un punto de corte de 525 pg/ml con una sensibilidad del 90% y especificidad de 48.6% [166]. Las pruebas diagnósticas disponibles actualmente para la prevención y detección de CaCu son el Pap y colposcopia, las pacientes posteriormente son sometidas a un análisis mediante una biopsia dirigida. La prueba de Pap presenta una sensibilidad de 57% y una especificidad del 76%, la colposcopia presenta una sensibilidad de 92% y especificidad de 67% [167]. Gal-4 sérica presenta una mejor sensibilidad y especificidad y podría ser usada como una prueba complementaria para la detección de CaCu y en futuros estudios realizar un análisis combinado de Gal-4 sérica con los estándares usados actualmente en el diagnóstico de CaCu.

También se ha informado que la expresión de galectina está alterada en los tejidos de diferentes tipos de cáncer. La galectina-1 [168, 169], la galectina-3 [170, 171] y la galectina-9 [118, 172, 173] son las más estudiadas [118, 172, 173]. Este es el primer informe de la identificación de Gal-4 en tejido cervical, la expresión de Gal-4 se ha detectado en diferentes tejidos y se informó por primera vez en el tracto digestivo y el hígado [120]. Durante la transformación celular, la expresión de la Gal-4 cambia y, en algunos tipos de cáncer, su expresión se ha relacionado con el estadio o el pronóstico [141]. En tejido de pacientes con CaCu ya había sido detectada la presencia de ARNm del gen *LGALS4* con un análisis de microarreglos, se encontró una disminución respecto a muestras normales [154],[132, 174], pero hasta hoy no se había analizado la proteína Gal-4.

La tinción inmunohistoquímica mostró que la Gal-4 se expresaba preferentemente en el citoplasma de células epiteliales normales, y su expresión en células SCC se observó en el citoplasma y núcleos, mostrando cambios en la localización asociados con la transformación del cáncer. Con respecto a las células columnares normales, se detectó la débil expresión de Gal-4 en el citoplasma. En el adenocarcinoma, la expresión fue mayor que en el epitelio columnar normal y también se observó principalmente en los núcleos. Para algunas galectinas, se han informado cambios en la localización intracelular asociados con el cáncer; La galectina-7 se detectó en núcleos de tejido epitelial esofágico normal, y en el carcinoma de células esofágicas, su expresión se detectó en el citoplasma, núcleos y membrana [175].

La localización nuclear preferencial de galectina-3, sobre la localización citoplásmica, se propuso como un indicador pronóstico de recurrencia en pacientes con carcinoma de pulmón [176]. La galectina-1 induce la migración de las células tumorales epiteliales mamarias, y esta influencia se ejerce cuando la proteína se localiza en el núcleo. También se informó que el cambio en la localización es el resultado de la glicosilación, lo que demuestra que la sialilación  $\alpha$ -2,6 interfiere con la interacción de galectina-1 con glicanos LacNAc, lo que permite la translocación de galectina-1 al núcleo [168]. Durante la transformación del cuello uterino, se ha informado un aumento de la expresión de ácido siálico según el grado de transformación [177, 178]. El aumento de ácido siálico en el tejido CaCu puede participar en la translocación de Gal-4 al núcleo.

El análisis de expresión de Gal-4 mostró una diferencia significativa entre tumores queratinizantes y no queratinizantes, y los tumores queratinizantes presentaron mayor tinción. La Cancer Genome Atlas Research Network informó una caracterización molecular de los tumores CaCu. Los resultados mostraron tres grupos de CaCu: el grupo con alto contenido de queratina, que presenta una alta expresión de genes relacionados con la familia de las queratinas; el grupo bajo en queratina, que presenta baja expresión de genes de la familia de la queratina; y el grupo rico en adenocarcinoma. Estas clasificaciones muestran que es posible identificar diferentes subtipos de CaCu según los patrones de expresión génica [20]. En nuestros resultados, detectamos una mayor expresión de Gal-4 en tumores queratinizantes en comparación con tumores no queratinizantes, lo que sugiere que el gen *LGALS4* podría ser parte del grupo de genes con alta expresión y desempeñar un papel en este subtipo molecular. Para confirmar esta posibilidad, son necesarios más estudios. Se ha informado que los pacientes con el tipo de SCC queratinizante tienen estadios avanzados (III-IV) de la enfermedad; Además, el CaCu en estadio IV también se asoció con una peor tasa de supervivencia, peor pronóstico y menor respuesta a tratamiento, lo que sugiere que el estado de queratinización es un predictor independiente de supervivencia [164].

Estos resultados resaltan la importancia de considerar los subtipos moleculares en el pronóstico del CaCu, con la finalidad de diseñar terapias dirigidas. Aún se desconoce el papel de la Gal-4 en el tejido de CaCu, y debe investigarse la función de la Gal-4 nuclear en la progresión del cáncer.

Los estudios realizados en líneas celulares (*in vitro*) o en animales (*in vivo*) permiten analizar funciones en las que Gal-4 se podría encontrar involucrada, ya que estas funciones o características no pueden determinarse directamente en los pacientes. Por lo que fue de nuestro interés caracterizar la expresión de Gal4 en líneas celulares. Cabe mencionar que este es el primer trabajo en el que se evalúa la expresión de Gal-4 en líneas celulares cervicales.

La expresión del gen *LGALS4* fue analizada en un pool de líneas celulares cervicales que presentaron una menor expresión cuando se comparó con tejido cervical normal [132]. En el presente trabajo de las líneas celulares analizadas encontramos una mayor expresión de ARNm en SiHa respecto a las líneas HaCat y Jurkat, que fueron usadas como controles. La expresión no se puede asociar con el tipo celular ya que SiHa, Caski y C33-A son derivadas de un CCE y HeLa es de un adenocarcinoma. En otro estudio en el que se evaluaron dos líneas celulares que se originaron del mismo tumor de páncreas, se encontró una diferencia marcada en la expresión de ARNm y proteína, mientras que PaTu-S presentó niveles mayores de hasta de 10 veces, PaTu-T no mostró expresión, esta última mostró una mayor capacidad metastásica [142].

Posteriormente se analizó la presencia de la proteína Gal-4 en SiHa, HaCat y Jurkat, se detectó la proteína de 36 kDa en las tres líneas celulares evaluadas, no encontramos diferencias respecto a los controles, lo cual fue sorprendente ya que esperábamos un incremento similar de la proteína como fue analizado en el ARNm. En otros tipos celulares como páncreas [142], y de colon [144] se ha analizado tanto el mensajero como la proteína, y aunque se detectaron los niveles de ARNm, estos no coincidieron con el nivel de proteína detectado. Esto puede deberse a que el anticuerpo utilizado no reconoce de manera eficiente a la proteína. En nuestro trabajo usamos dos clonas diferentes de anticuerpos anti-Gal-4 ya que la primera (ab175185) no tuvo reconocimiento en las líneas celulares humanas, pero sí en proteína de yeyuno de rata, en caso contrario al segundo anticuerpo utilizado (ab170638), reconoció satisfactoriamente Gal-4 en las líneas celulares.

También logramos identificar a la proteína Gal-4 mediante inmunofluorescencia en citoquímicas de SiHa y HaCat, la expresión de Gal-4 fue diferencial, en la línea control se observa principalmente en el citoplasma, mientras que en SiHa la encontramos

principalmente en los núcleos. La localización subcelular podría determinar el tipo de proceso celular en el que está participando Gal-4, la que se encuentra en citoplasma disminuye los niveles de  $\beta$ -catenina, en consecuencia,  $\beta$ -catenina no se transloca al núcleo y no activa genes claves de la vía WNT, que se asocia a procesos de diferenciación y migración celular [179].

## 9. CONCLUSIONES

Los niveles séricos de Gal-4 en los pacientes con CaCu fueron más altos que en los pacientes sin enfermedad y la tendencia de mayor concentración en los pacientes con estadio clínico avanzado sugieren que la Gal-4, al igual que otras galectinas, podría participar en la migración y la metástasis.

Mediante un análisis de curva ROC logramos visualizar que la Gal-4 sérica es un prometedor biomarcador para diagnóstico de CaCu, ya que presentó una sensibilidad del 82.1% con un punto de corte  $\geq 432.14$  pg/ml para diferenciar a los pacientes con CaCu.

La Gal-4 se expresa en el epitelio escamoso normal y columnar cervical y en las células estromales. En el tejido normal, se detectó la expresión de Gal-4 en el citoplasma; en las muestras de tumores de CCE y adenocarcinoma, la expresión se observó en núcleos, lo que sugiere que el cambio de localización podría estar relacionado con la transformación celular. El aumento de la expresión de Gal-4 en los tumores queratinizantes en comparación con los tumores no queratinizantes sugiere que este gen podría ser parte del grupo de genes relacionados con este subtipo CC y podría estar relacionado con un peor pronóstico.

En líneas celulares se detectó la presencia de ARNm del gen *LGALS4*, SiHa tuvo la mayor expresión respecto al control, por primera vez se detectó la proteína Gal-4 en líneas celulares cervicales, pero no fue proporcional a los niveles de ARNm encontrados. Adicionalmente, se determinó la localización subcelular de Gal-4 en células SiHa, observándose principalmente en núcleo, lo que sugiere que podría existir una función asociada a la localización.

## 10. PERSPECTIVAS

Gal-4 es una proteína poco estudiada y en CaCu este es el primer reporte de su expresión. Se propone que el trabajo en un futuro se continúe con análisis que ayuden a esclarecer tanto su participación en el desarrollo de CaCu, con la finalidad de evaluar su potencial uso como un biomarcador o un posible blanco terapéutico. Para lo que se propone Gal-4 sérica sea analizada en un grupo más amplio de pacientes con CaCu para confirmar la asociación con las características clínico-patológicas como el estadio clínico, el tamaño tumoral, la queratinización, invasión entre otros. Así como analizar los niveles de Gal-4 sérica en las pacientes durante y después del tratamiento en forma grupal y en cada estadio clínico. Determinar el poder discriminatorio de Gal-4 en los estadios clínicos avanzados (III y IV) y analizar sí es un posible marcador de progresión, recurrencia y supervivencia. Analizar también si el incremento de la concentración de Gal-4 sérica tiene una correlación con procesos inflamatorios que se han asociado al desarrollo y progresión de CaCu.

A nivel celular se propone caracterizar los procesos biológicos en los que interviene Gal-4 para determinar su participación en el desarrollo del CaCu a través de estudios in vitro donde se pueda analizar la adhesión, la tasa de proliferación, la capacidad de invasión, tanto para Gal-4 intracelular y extracelular. Además, determinar el origen de Gal-4 sérica mediante experimentos en la sección leucocitaria de muestras sanguíneas de pacientes con CaCu.

## 11. REFERENCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424. Epub 2018/09/13. doi: 10.3322/caac.21492. PubMed PMID: 30207593.
2. GLOBOCAN. Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, worldwide, females, all ages International Agency for Research in Cancer 2018. Available from: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmssc=1&include\\_nmssc\\_other=1&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type\\_sort=0&type\\_nb\\_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&population\\_group\\_globocan\\_id=](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=).
3. GLOBOCAN. Estimated number of incident cases and deaths Latin America and the Caribbean, Mexico, females, all ages International Agency for Research in Cancer 2018. Available from: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=904\\_484&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=14&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmssc=1&include\\_nmssc\\_other=1&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type\\_sort=0&type\\_nb\\_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&population\\_group\\_globocan\\_id=#collapse-group-0-1](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=904_484&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=14&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=#collapse-group-0-1).
4. Secretaría de Salud GdM. Programa de Acción Específico Prevención y Control del Cáncer de la Mujer 2013 - 2018 <https://www.gob.mx/salud2015> [cited 2020 9 de septiembre ]. Available from: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/cancer-de-cuello-uterino>.
5. Hernández-Hernández DM, Apresa-García T, Patlán-Pérez RM. [Epidemiological overview of uterine cervical cancer]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2015;53 Suppl 2:S154-61. Epub 2015/10/16. PubMed PMID: 26462510.
6. IMSS. Informe al Ejecutivo Federal y al Congreso de la Unión sobre la situación financiera y los riesgos del Instituto Mexicano del Seguro Social 2018-2019. [imss.gob.mx](https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/cancer-de-cuello-uterino)2019.
7. Small W, Jr., Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*. 2017;123(13):2404-12. Epub 2017/05/04. doi: 10.1002/cncr.30667. PubMed PMID: 28464289.
8. Conlon JL. Diethylstilbestrol: Potential health risks for women exposed in utero and their offspring. *JAAPA : official journal of the American Academy of Physician Assistants*. 2017;30(2):49-52. Epub 2017/01/19. doi: 10.1097/01.Jaa.0000511800.91372.34. PubMed PMID: 28098674.
9. Silva J, Cerqueira F, Medeiros R. Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2014;289(4):715-23. Epub 2013/12/19. doi: 10.1007/s00404-013-3122-3. PubMed PMID: 24346121.
10. Koskela P, Anttila T, Bjørge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M, et al. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *International journal of cancer*.

2000;85(1):35-9. Epub 1999/12/10. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(20000101)85:1<35::aid-ijc6>3.0.co;2-a. PubMed PMID: 10585579.

11. Zhu H, Shen Z, Luo H, Zhang W, Zhu X. Chlamydia Trachomatis Infection-Associated Risk of Cervical Cancer: A Meta-Analysis. *Medicine*. 2016;95(13):e3077. Epub 2016/04/05. doi: 10.1097/md.0000000000003077. PubMed PMID: 27043670; PubMed Central PMCID: PMC4998531.

12. Smith JW, Torres JE, Holmquist ND. ASSOCIATION OF HERPES SIMPLEX VIRUS (HSV) WITH CERVICAL CANCER BY LYMPHOCYTE REACTIVITY WITH HSV-1 AND HSV-2 ANTIGENS. *American Journal of Epidemiology*. 1979;110(2):141-7. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112798.

13. Lehtinen M, Koskela P, Jellum E, Bloigu A, Anttila T, Hallmans G, et al. Herpes simplex virus and risk of cervical cancer: a longitudinal, nested case-control study in the nordic countries. *Am J Epidemiol*. 2002;156(8):687-92. Epub 2002/10/09. doi: 10.1093/aje/kwf098. PubMed PMID: 12370156.

14. Zhao Y, Cao X, Zheng Y, Tang J, Cai W, Wang H, et al. Relationship between cervical disease and infection with human papillomavirus types 16 and 18, and herpes simplex virus 1 and 2. *Journal of Medical Virology*. 2012;84(12):1920-7. doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.23353>.

15. Chan PK, Chan MY, Li WW, Chan DP, Cheung JL, Cheng AF. Association of human beta-herpesviruses with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors. *Journal of clinical pathology*. 2001;54(1):48-53. Epub 2001/03/29. doi: 10.1136/jcp.54.1.48. PubMed PMID: 11271789; PubMed Central PMCID: PMC4998531.

16. Raju K. Virus and Cervical Cancer: Role and implication: A Review. *Biomedical Research and Therapy*. 2015;2(03):220-30. doi: 10.7603/s40730-015-0007-z.

17. IARC. Human papillomaviruses. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1995;64:1-378. Epub 1995/01/01. PubMed PMID: 16755705; PubMed Central PMCID: PMC4998531.

18. Walboomers JM, de Roda Husman AM, Snijders PJ, Stel HV, Risse EK, Helmerhorst TJ, et al. Human papillomavirus in false negative archival cervical smears: implications for screening for cervical cancer. *Journal of clinical pathology*. 1995;48(8):728-32. Epub 1995/08/01. doi: 10.1136/jcp.48.8.728. PubMed PMID: 7560199; PubMed Central PMCID: PMC4998531.

19. Husain RS, Ramakrishnan V. Global Variation of Human Papillomavirus Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies. *Annals of global health*. 2015;81(5):675-83. Epub 2016/04/03. doi: 10.1016/j.aogh.2015.08.026. PubMed PMID: 27036725.

20. Burk RD, Chen Z, Saller C, Tarvin K, Carvalho AL, Scapulatempo-Neto C, et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*. 2017;543(7645):378-84. doi: 10.1038/nature21386.

21. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic oncology*. 2010;117(2 Suppl):S5-10. Epub 2011/03/08. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.01.024. PubMed PMID: 20304221.

22. Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology Journal*. 2011;8(1):269. doi: 10.1186/1743-422X-8-269.

23. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England*

journal of medicine. 2003;348(6):518-27. Epub 2003/02/07. doi: 10.1056/NEJMoa021641. PubMed PMID: 12571259.

24. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic oncology*. 2008;110(3 Suppl 2):S4-7. Epub 2008/09/02. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.07.045. PubMed PMID: 18760711.

25. So KA, Lee IH, Lee KH, Hong SR, Kim YJ, Seo HH, et al. Human papillomavirus genotype-specific risk in cervical carcinogenesis. *Journal of gynecologic oncology*. 2019;30(4):e52. Epub 2019/05/11. doi: 10.3802/jgo.2019.30.e52. PubMed PMID: 31074234; PubMed Central PMCID: PMC6543103.

26. Salcedo M, Pina-Sanchez P, Vallejo-Ruiz V, Monroy-Garcia A, Aguilar-Lemarroy A, Cortes-Gutierrez EI, et al. Human papillomavirus genotypes among females in Mexico: a study from the Mexican institute for social security. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(23):10061-6. Epub 2015/01/06. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.23.10061. PubMed PMID: 25556426.

27. Flores-Miramontes MG, Torres-Reyes LA, Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Piña-Sánchez P, Cortés-Gutiérrez E, et al. [HPV genotypes prevalence in México and worldwide detected by Linear Array]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2015;53 Suppl 2:S122-30. Epub 2015/10/16. PubMed PMID: 26462507.

28. Luna-Aguirre CM, Reyes-Cortés LM, Torres-Grimaldo AA, Karr-de-León SF, Cerda-Flores RM, Melo-Nava B, et al. Prevalence of human papillomavirus types in North and Central regions of Mexico. *Epidemiology and infection*. 2018;146(13):1724-30. Epub 2018/06/28. doi: 10.1017/s0950268818001747. PubMed PMID: 29945687.

29. Campos RG, Malacara Rosas A, Gutiérrez Santillán E, Delgado Gutiérrez M, Torres Orozco RE, García Martínez ED, et al. Unusual prevalence of high-risk genotypes of human papillomavirus in a group of women with neoplastic lesions and cervical cancer from Central Mexico. *PloS one*. 2019;14(4):e0215222. Epub 2019/04/19. doi: 10.1371/journal.pone.0215222. PubMed PMID: 30998701; PubMed Central PMCID: PMC6474327.

30. García Villanueva S, Domínguez-Gil González M, Gayete Martínez J, Eiros Bouza JM. [Protagonism of HPV genotypes in a population subject to organized screening]. *Atencion primaria*. 2017;49(9):562-3. Epub 2017/07/05. doi: 10.1016/j.aprim.2017.01.012. PubMed PMID: 28673465; PubMed Central PMCID: PMC6875974.

31. Louie KS, de Sanjose S, Diaz M, Castellsagué X, Herrero R, Meijer CJ, et al. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *British journal of cancer*. 2009;100(7):1191-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6604974.

32. Moscicki AB, Winkler B, Irwin CE, Jr., Schachter J. Differences in biologic maturation, sexual behavior, and sexually transmitted disease between adolescents with and without cervical intraepithelial neoplasia. *The Journal of pediatrics*. 1989;115(3):487-93. Epub 1989/09/01. doi: 10.1016/s0022-3476(89)80863-7. PubMed PMID: 2769512.

33. Loopik DL, IntHout J, Melchers WJG, Massuger L, Bekkers RLM, Siebers AG. Oral contraceptive and intrauterine device use and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade III or worse: a population-based study. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2020;124:102-9. Epub 2019/11/25. doi: 10.1016/j.ejca.2019.10.009. PubMed PMID: 31760309.

34. Gierisch JM, Coeytaux RR, Urrutia RP, Havrilesky LJ, Moorman PG, Lowery WJ, et al. Oral contraceptive use and risk of breast, cervical, colorectal, and endometrial cancers: a systematic review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*.

- 2013;22(11):1931-43. Epub 2013/09/10. doi: 10.1158/1055-9965.Epi-13-0298. PubMed PMID: 24014598.
35. Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodhill A, et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet (London, England)*. 2007;370(9599):1609-21. Epub 2007/11/13. doi: 10.1016/s0140-6736(07)61684-5. PubMed PMID: 17993361.
36. Kapeu AS, Luostarinen T, Jellum E, Dillner J, Hakama M, Koskela P, et al. Is Smoking an Independent Risk Factor for Invasive Cervical Cancer? A Nested Case-Control Study Within Nordic Biobanks. *American Journal of Epidemiology*. 2008;169(4):480-8. doi: 10.1093/aje/kwn354.
37. Slattery ML, Robison LM, Schuman KL, French TK, Abbott TM, Overall JC, Jr, et al. Cigarette Smoking and Exposure to Passive Smoke Are Risk Factors for Cervical Cancer. *Jama*. 1989;261(11):1593-8. doi: 10.1001/jama.1989.03420110069026.
38. IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2004;83:1-1438. Epub 2004/08/03. PubMed PMID: 15285078; PubMed Central PMCID: PMC4781536.
39. Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *International journal of cancer*. 2006;118(6):1481-95. Epub 2005/10/06. doi: 10.1002/ijc.21493. PubMed PMID: 16206285.
40. Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *International journal of cancer*. 2014;135(2):453-66. Epub 2013/12/18. doi: 10.1002/ijc.28666. PubMed PMID: 24338632.
41. Jordan J, Singer A, Jones H, Shafi M. *The Cervix*. Wiley; 2009.
42. Sankaranarayanan R, Wesley RS. Chapter 1 / Anatomical and pathological basis of visual inspection with acetic acid (VIA) and with Lugol's iodine (VILI). 2003. In: *A practical manual on visual screening for cervical neoplasia* [Internet]. International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://screening.iarc.fr/viavilichap1.php?lang=1>.
43. Sellors JW, Sankaranarayanan R. Chapter 1: An introduction to the anatomy of the uterine cervix. 2003. In: *Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manual* [Internet]. International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=1&chap=1>.
44. Dallenbach-Hellweg G, Doeberitz MK, Trunk MJ. *Normal Histology, Regeneration, and Repair Color Atlas of Histopathology of the Cervix Uteri*: Springer Berlin Heidelberg; 2005.
45. Sellors JW, Sankaranarayanan R. Chapter 2: An Introduction to Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN). 2003. In: *Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manual* [Internet]. International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=1&chap=2>.
46. Nayar R, Wilbur DC. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: A Historical Perspective. *Acta cytologica*. 2017;61(4-5):359-72. Epub 2017/07/12. doi: 10.1159/000477556. PubMed PMID: 28693017.

47. Tan SY, Tatsumura Y. George Papanicolaou (1883-1962): Discoverer of the Pap smear. *Singapore medical journal*. 2015;56(10):586-7. Epub 2015/10/30. doi: 10.11622/smedj.2015155. PubMed PMID: 26512152; PubMed Central PMCID: PMC4613936.
48. Broders AC. Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. *Journal of the American Medical Association*. 1932;99(20):1670-4. doi: 10.1001/jama.1932.02740720024007.
49. Fennell RH, Jr., Castleman B. Carcinoma in situ. *The New England journal of medicine*. 1955;252(24):1032-7. Epub 1955/06/16. doi: 10.1056/nejm195506162522406. PubMed PMID: 14383957.
50. Reagan JW, Seidemann IL, Saracusa Y. The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. *Cancer*. 1953;6(2):224-34. Epub 1953/03/01. doi: 10.1002/1097-0142(195303)6:2<224::aid-cnrc2820060203>3.0.co;2-h. PubMed PMID: 13032911.
51. Richart RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clinical obstetrics and gynecology*. 1967;10(4):748-84. PubMed PMID: 00003081-196712000-00002.
52. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 1993;12(2):186-92. Epub 1993/04/01. PubMed PMID: 8463044.
53. Richart RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstetrics and gynecology*. 1990;75(1):131-3. Epub 1990/01/01. PubMed PMID: 2296409.
54. WHO. Annex 5, The 2001 Bethesda System. *Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice*. 2nd edition ed2014.
55. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *Jama*. 2002;287(16):2114-9. doi: 10.1001/jama.287.16.2114.
56. Frappart L, Fontaniere B, Lucas E, Sankaranarayanan R. The Bethesda system. *Histopathology and Cytopathology of the Uterine Cervix - Digital Atlas*2004.
57. Secretaria de Salud GdM. Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico uterino. . In: Salud Sd, editor. *Diario Oficial*2007.
58. Bhatla N, Berek JS, Cuello Fredes M, Denny LA, Grenman S, Karunaratne K, et al. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2019;145(1):129-35. Epub 2019/01/19. doi: 10.1002/ijgo.12749. PubMed PMID: 30656645.
59. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2009;105(2):103-4. Epub 2009/04/16. doi: 10.1016/j.ijgo.2009.02.012. PubMed PMID: 19367689.
60. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*: Wiley; 2017.
61. Srivastava S. Staging PathologyOutlines.com2018 [updated 9 Septiembre 2020; cited 2020 11 Septiembre]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/cervixstaging.html>.
62. Maniar KP, Wei J-J. *Pathology of Cervical Carcinoma*. Glob libr women's med,2017.

63. Yim EK, Park JS. Biomarkers in cervical cancer. *Biomarker insights*. 2007;1:215-25. Epub 2007/01/01. PubMed PMID: 19690652; PubMed Central PMCID: PMCPMC2716791.
64. von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M, Schmidt D, Bergeron C. Biomarkers for cervical cancer screening: the role of p16(INK4a) to highlight transforming HPV infections. *Expert review of proteomics*. 2012;9(2):149-63. Epub 2012/04/03. doi: 10.1586/epr.12.13. PubMed PMID: 22462787.
65. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*. 2000;182(3):311-22. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9).
66. Shi Q, Xu L, Yang R, Meng Y, Qiu L. Ki-67 and P16 proteins in cervical cancer and precancerous lesions of young women and the diagnostic value for cervical cancer and precancerous lesions. *Oncology letters*. 2019;18(2):1351-5. Epub 2019/08/20. doi: 10.3892/ol.2019.10430. PubMed PMID: 31423197; PubMed Central PMCID: PMCPMC6607340.
67. Fu J, Wang W, Wang Y, Liu C, Wang P. The role of squamous cell carcinoma antigen (SCC Ag) in outcome prediction after concurrent chemoradiotherapy and treatment decisions for patients with cervical cancer. *Radiation Oncology*. 2019;14(1):146. doi: 10.1186/s13014-019-1355-4.
68. Liu Z, Shi H. Prognostic Role of Squamous Cell Carcinoma Antigen in Cervical Cancer: A Meta-analysis. *Disease Markers*. 2019;2019:6710352. doi: 10.1155/2019/6710352.
69. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(1):29-41. Epub 2005/01/05. doi: 10.1038/nrc1527. PubMed PMID: 15630413.
70. Cummings RD, Liu F-T, Vasta GR. Galectins. *Essentials of Glycobiology*. Third ed 2017.
71. Varki A, Cummings R, Esko J, Editores. Capítulo 27, Lectinas tipo S (Galectinas) *Fundamentos de la glicobiología*: Cold Spring Harbor; 1999.
72. Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(36):27034-8. Epub 1993/12/25. doi: 10.2210/pdb1hlc/pdb. PubMed PMID: 8262940.
73. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994;76(4):597-8. Epub 1994/02/25. doi: 10.1016/0092-8674(94)90498-7. PubMed PMID: 8124704.
74. Houzelstein D, Gonçalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, Drickamer K, et al. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Molecular biology and evolution*. 2004;21(7):1177-87. Epub 2004/02/14. doi: 10.1093/molbev/msh082. PubMed PMID: 14963092.
75. Bidon-Wagner N, Le Pennec J-P. Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7):557-63. doi: 10.1023/B:GLYC.0000014086.38343.98.
76. Heusschen R, Freitag N, Tirado-González I, Barrientos G, Moschansky P, Muñoz-Fernández R, et al. Profiling Lgals9 splice variant expression at the fetal-maternal interface: implications in normal and pathological human pregnancy. *Biology of reproduction*. 2013;88(1):22. Epub 2012/12/18. doi: 10.1095/biolreprod.112.105460. PubMed PMID: 23242525.
77. Wooters MA, Ropp SL, Erickson AK. Identification of galectin-4 isoforms in porcine small intestine. *Biochimie*. 2005;87(2):143-9. Epub 2005/03/12. doi: 10.1016/j.biochi.2004.12.002. PubMed PMID: 15760706.
78. Gorski JP, Liu FT, Artigues A, Castagna LF, Osdoby P. New alternatively spliced form of galectin-3, a member of the beta-galactoside-binding animal lectin family, contains a predicted

- transmembrane-spanning domain and a leucine zipper motif. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(21):18840-8. Epub 2002/03/12. doi: 10.1074/jbc.M109578200. PubMed PMID: 11886849.
79. Rapoport EM, Kurmyshkina OV, Bovin NV. Mammalian galectins: structure, carbohydrate specificity, and functions. *Biochemistry Biokhimiia*. 2008;73(4):393-405. Epub 2008/05/07. doi: 10.1134/s0006297908040032. PubMed PMID: 18457568.
80. Furtak V, Hatcher F, Ochieng J. Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;289(4):845-50. Epub 2001/12/12. doi: 10.1006/bbrc.2001.6064. PubMed PMID: 11735123.
81. Delacour D, Koch A, Jacob R. The role of galectins in protein trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2009;10(10):1405-13. Epub 2009/08/05. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00960.x. PubMed PMID: 19650851.
82. Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS, et al. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer research*. 1999;59(24):6239-45. Epub 2000/01/08. PubMed PMID: 10626818.
83. Lukyanov P, Furtak V, Ochieng J. Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;338(2):1031-6. Epub 2005/10/27. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.033. PubMed PMID: 16248982.
84. Popa SJ, Stewart SE, Moreau K. Unconventional secretion of annexins and galectins. *Seminars in cell & developmental biology*. 2018;83:42-50. Epub 2018/03/05. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.022. PubMed PMID: 29501720; PubMed Central PMCID: PMC6565930.
85. Johannes L, Jacob R, Leffler H. Galectins at a glance. *Journal of Cell Science*. 2018;131(9):jcs208884. doi: 10.1242/jcs.208884.
86. Wiersma VR, de Bruyn M, Helfrich W, Bremer E. Therapeutic potential of Galectin-9 in human disease. *Medicinal research reviews*. 2013;33 Suppl 1:E102-26. Epub 2011/07/28. doi: 10.1002/med.20249. PubMed PMID: 21793015.
87. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 2006;16(11):137R-57R. doi: 10.1093/glycob/cwl025.
88. André S, Wang GN, Gabius HJ, Murphy PV. Combining glycocluster synthesis with protein engineering: an approach to probe into the significance of linker length in a tandem-repeat-type lectin (galectin-4). *Carbohydrate research*. 2014;389:25-38. Epub 2014/04/05. doi: 10.1016/j.carres.2013.12.024. PubMed PMID: 24698724.
89. Miyanishi N, Nishi N, Abe H, Kashio Y, Shinonaga R, Nakakita S, et al. Carbohydrate-recognition domains of galectin-9 are involved in intermolecular interaction with galectin-9 itself and other members of the galectin family. *Glycobiology*. 2007;17(4):423-32. Epub 2007/01/16. doi: 10.1093/glycob/cwm001. PubMed PMID: 17223646.
90. Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1572(2-3):209-31. Epub 2002/09/12. doi: 10.1016/s0304-4165(02)00310-0. PubMed PMID: 12223271.
91. Cooper DN, Barondes SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*. 1999;9(10):979-84. Epub 1999/10/16. doi: 10.1093/glycob/9.10.979. PubMed PMID: 10521533.
92. Rabinovich GA. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell death and differentiation*. 1999;6(8):711-21. Epub 1999/09/01. doi: 10.1038/sj.cdd.4400535. PubMed PMID: 10467344.

93. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):441-9. Epub 2004/02/06. doi: 10.1023/B:GLYC.0000014073.23096.3a. PubMed PMID: 14758067.
94. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PubMed PMID: 21376230.
95. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PubMed PMID: 10647931.
96. Girotti MR, Salatino M, Dalotto-Moreno T, Rabinovich GA. Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression. *Journal of Experimental Medicine*. 2019;217(2). doi: 10.1084/jem.20182041.
97. Chaffer CL, Weinberg RA. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*. 2011;331(6024):1559-64. doi: 10.1126/science.1203543.
98. Chen L, Yao Y, Sun L, Zhou J, Liu J, Wang J, et al. Clinical implication of the serum galectin-1 expression in epithelial ovarian cancer patients. *Journal of Ovarian Research*. 2015;8. doi: 10.1186/s13048-015-0206-7.
99. Blank M, Klussmann E, Krüger-Krasagakes S, Schmitt-Gräff A, Stolte M, Bornhoeft G, et al. Expression of MUC2-mucin in colorectal adenomas and carcinomas of different histological types. *International journal of cancer*. 1994;59(3):301-6. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910590302>.
100. Brockhausen I, Stanley P. Chapter 10 O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart G, Aebi M, et al., editors. *Essentials of Glycobiology (internet)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY); 2017.
101. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(12):874-85. Epub 2009/11/26. doi: 10.1038/nrc2761. PubMed PMID: 19935676; PubMed Central PMCID: PMC2951677.
102. Zhao Q, Guo X, Nash GB, Stone PC, Hilkens J, Rhodes JM, et al. Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface. *Cancer research*. 2009;69(17):6799-806. Epub 2009/08/20. doi: 10.1158/0008-5472.Can-09-1096. PubMed PMID: 19690136; PubMed Central PMCID: PMC2741610.
103. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):527-35. Epub 2004/02/06. doi: 10.1023/B:GLYC.0000014082.99675.2f. PubMed PMID: 14758076.
104. Glinsky VV, Glinsky GV, Rittenhouse-Olson K, Huflejt ME, Glinskii OV, Deutscher SL, et al. The Role of Thomsen-Friedenreich Antigen in Adhesion of Human Breast and Prostate Cancer Cells to the Endothelium. *Cancer research*. 2001;61(12):4851-7.
105. Kopitz J, Ballikaya S, André S, Gabius HJ. Ganglioside GM1/galectin-dependent growth regulation in human neuroblastoma cells: special properties of bivalent galectin-4 and significance of linker length for ligand selection. *Neurochemical research*. 2012;37(6):1267-76. Epub 2012/01/12. doi: 10.1007/s11064-011-0693-x. PubMed PMID: 22234579.
106. Ramirez-Díaz I. Evaluación de la expresión de Galectina-9 en relación al tamaño del tumor de pacientes con cáncer cervicouterino Benemérita Universidad Autónoma de Puebla 2020.
107. Gu CJ, Wu H, Sheng CY, Ni QC. [Expression and prognostic value of galectin-9 in hepatocellular carcinoma patients]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2013;93(26):2025-8. Epub 2013/10/31. PubMed PMID: 24169278.

108. Seifert AM, Reiche C, Heiduk M, Tannert A, Meinecke AC, Baier S, et al. Detection of pancreatic ductal adenocarcinoma with galectin-9 serum levels. *Oncogene*. 2020;39(15):3102-13. Epub 2020/02/15. doi: 10.1038/s41388-020-1186-7. PubMed PMID: 32055023; PubMed Central PMCID: PMC7142017 of interest exists.
109. Yu TB, Dodd S, Yu LG, Subramanian S. Serum galectins as potential biomarkers of inflammatory bowel diseases. *PloS one*. 2020;15(1):e0227306. Epub 2020/01/14. doi: 10.1371/journal.pone.0227306. PubMed PMID: 31929564; PubMed Central PMCID: PMC6957193 from MSD, Actavis, Abbvie, Dr Falk pharmaceuticals, Shire and received educational grant from MSD, Abbvie. LGY is an Academic Editor of PLOS ONE. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.
110. He XW, Li WL, Li C, Liu P, Shen YG, Zhu M, et al. Serum levels of galectin-1, galectin-3, and galectin-9 are associated with large artery atherosclerotic stroke. *Scientific reports*. 2017;7:40994. Epub 2017/01/24. doi: 10.1038/srep40994. PubMed PMID: 28112232; PubMed Central PMCID: PMC5256273.
111. Shafiq A, Moore J, Suleman A, Faiz S, Farooq O, Arshad A, et al. Elevated Soluble Galectin-3 as a Marker of Chemotherapy Efficacy in Breast Cancer Patients: A Prospective Study. *International journal of breast cancer*. 2020;2020:4824813. Epub 2020/04/02. doi: 10.1155/2020/4824813. PubMed PMID: 32231800; PubMed Central PMCID: PMC7097759.
112. Topcu T, Kavgaci H, Gunaldi M, Kocoglu H, Akyol M, Mentese A, et al. The clinical importance of serum galectin-3 levels in breast cancer patients with and without metastasis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2018;14(10):583-6. doi: 10.4103/0973-1482.176425.
113. Eldeen L, Nagy M. Clinical utility of serum galectin-1 in Egyptian breast cancer patients. *Biochemistry & Molecular Biology Journal*. 2018;04. doi: 10.21767/2471-8084-C4-018.
114. Yi N, Zhao X, Ji J, Xu M, Jiao Y, Qian T, et al. Serum galectin-3 as a biomarker for screening, early diagnosis, prognosis and therapeutic effect evaluation of pancreatic cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020;24(19):11583-91. doi: <https://doi.org/10.1111/jcmm.15775>.
115. Cheng D, Liang B, Li Y. Serum galectin-3 as a potential marker for gastric cancer. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2015;21:755-60. Epub 2015/03/15. doi: 10.12659/msm.892386. PubMed PMID: 25765552; PubMed Central PMCID: PMC4370354.
116. Wdowiak K, Gallego-Colon E, Francuz T, Czajka-Francuz P, Ruiz-Agamez N, Kubeczko M, et al. Increased serum levels of Galectin-9 in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncology letters*. 2019;17(1):1019-29. Epub 2019/01/19. doi: 10.3892/ol.2018.9656. PubMed PMID: 30655861; PubMed Central PMCID: PMC6313089.
117. Reyes-Vallejo TV. Determinación de la concentración de galectina-9 en el suero de pacientes con cáncer cervicouterino y su posible uso como biomarcador de progresión de la enfermedad. : Universidad de las Américas Puebla; 2020.
118. Liang MY, Lu YM, Zhang Y, Zhang SL. [Serum galectin-9 in cervical cancer]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2008;88(39):2783-5. Epub 2008/12/17. PubMed PMID: 19080456.
119. LGALS4 galectin 4 [ Homo sapiens (human) ] [Internet]. NCBI. 2020 [cited NOV 2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3960>.
120. Huflejt ME, Leffler H. Galectin-4 in normal tissues and cancer. *Glycoconjugate journal*. 2004;20(4):247-55. Epub 2004/04/30. doi: 10.1023/B:GLYC.0000025819.54723.a0. PubMed PMID: 15115909.

121. Rustiguel JK, Soares RO, Meisburger SP, Davis KM, Malzbender KL, Ando N, et al. Full-length model of the human galectin-4 and insights into dynamics of inter-domain communication. *Scientific reports*. 2016;6:33633. Epub 2016/09/20. doi: 10.1038/srep33633. PubMed PMID: 27642006; PubMed Central PMCID: PMC5027518.
122. Bum-Erdene K, Leffler H, Nilsson UJ, Blanchard H. Structural characterisation of human galectin-4 N-terminal carbohydrate recognition domain in complex with glycerol, lactose, 3'-sulfolactose, and 2'-fucosyllactose. *Scientific reports*. 2016;6:20289. Epub 2016/02/02. doi: 10.1038/srep20289. PubMed PMID: 26828567; PubMed Central PMCID: PMC4734333.
123. Rustiguel JK, Kumagai PS, Dias-Baruffi M, Costa-Filho AJ, Nonato MC. Recombinant expression, purification and preliminary biophysical and structural studies of C-terminal carbohydrate recognition domain from human galectin-4. *Protein expression and purification*. 2016;118:39-48. Epub 2015/10/04. doi: 10.1016/j.pep.2015.09.026. PubMed PMID: 26432949.
124. Göhler A, André S, Kaltner H, Sauer M, Gabius HJ, Doose S. Hydrodynamic properties of human adhesion/growth-regulatory galectins studied by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical journal*. 2010;98(12):3044-53. Epub 2010/06/17. doi: 10.1016/j.bpj.2010.03.040. PubMed PMID: 20550917; PubMed Central PMCID: PMC2884264.
125. Rechreche H, Mallo GV, Montalto G, Dagorn JC, Iovanna JL. Cloning and expression of the mRNA of human galectin-4, an S-type lectin down-regulated in colorectal cancer. *European journal of biochemistry*. 1997;248(1):225-30. Epub 1997/08/15. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00225.x. PubMed PMID: 9310382.
126. Vokhmyanina OA, Rapoport EM, André S, Severov VV, Ryzhov I, Pazynina GV, et al. Comparative study of the glycan specificities of cell-bound human tandem-repeat-type galectin-4, -8 and -9. *Glycobiology*. 2012;22(9):1207-17. Epub 2012/05/02. doi: 10.1093/glycob/cws079. PubMed PMID: 22547138.
127. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1473(1):172-85. Epub 1999/12/02. doi: 10.1016/s0304-4165(99)00177-4. PubMed PMID: 10580137.
128. Ideo H, Hoshi I, Yamashita K, Sakamoto M. Phosphorylation and externalization of galectin-4 is controlled by Src family kinases. *Glycobiology*. 2013;23(12):1452-62. Epub 2013/09/10. doi: 10.1093/glycob/cwt073. PubMed PMID: 24013903.
129. Menon S, Kang CM, Beningo KA. Galectin-3 secretion and tyrosine phosphorylation is dependent on the calpain small subunit, Calpain 4. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;410(1):91-6. Epub 2011/06/07. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.112. PubMed PMID: 21640083; PubMed Central PMCID: PMC3124573.
130. The Human Protein Atlas. LGALS4 [Database]. The Human Protein Atlas2020 [updated Noviembre 2020]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000171747-LGALS4/tissue>.
131. Unigene. LGALS4: UNIGENE; 2017 [cited 2017 May]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Hs&CID=5302&MAXEST=361>.
132. Higareda-Almaraz JC, Ruiz-Moreno JS, Klimentova J, Barbieri D, Salvador-Gallego R, Ly R, et al. Systems-level effects of ectopic galectin-7 reconstitution in cervical cancer and its microenvironment. *BMC cancer*. 2016;16(1):680. doi: 10.1186/s12885-016-2700-8.
133. Cao ZQ, Guo XL. The role of galectin-4 in physiology and diseases. *Protein & cell*. 2016;7(5):314-24. Epub 2016/03/28. doi: 10.1007/s13238-016-0262-9. PubMed PMID: 27017379; PubMed Central PMCID: PMC4853315.

134. Danielsen EM, van Deurs B. Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters. *Molecular biology of the cell*. 1997;8(11):2241-51. Epub 1997/11/15. doi: 10.1091/mbc.8.11.2241. PubMed PMID: 9362066; PubMed Central PMCID: PMC25705.
135. Danielsen EM, Hansen GH. Lipid raft organization and function in the small intestinal brush border. *Journal of physiology and biochemistry*. 2008;64(4):377-82. Epub 2009/04/28. doi: 10.1007/bf03174093. PubMed PMID: 19391463.
136. Hauri HP. Biosynthesis and transport of plasma membrane glycoproteins in the rat intestinal epithelial cell: studies with sucrase-isomaltase. *Ciba Foundation symposium*. 1983;95:132-63. Epub 1983/01/01. doi: 10.1002/9780470720769.ch9. PubMed PMID: 6303720.
137. Turner AJ. Aminopeptidase N. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2013:397-403. Epub 2012/11/09. doi: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00079-X. PubMed PMID: PMC7150183.
138. Delacour D, Gouyer V, Zanetta JP, Drobecq H, Leteurtre E, Grard G, et al. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *The Journal of cell biology*. 2005;169(3):491-501. Epub 2005/05/11. doi: 10.1083/jcb.200407073. PubMed PMID: 15883199; PubMed Central PMCID: PMC2171948.
139. Paclik D, Lohse K, Wiedenmann B, Dignass AU, Sturm A. Galectin-2 and -4, but not galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism. *Inflammatory bowel diseases*. 2008;14(10):1366-72. Epub 2008/05/20. doi: 10.1002/ibd.20499. PubMed PMID: 18484670.
140. Velasco S, Díez-Revuelta N, Hernández-Iglesias T, Kaltner H, André S, Gabius HJ, et al. Neuronal Galectin-4 is required for axon growth and for the organization of axonal membrane L1 delivery and clustering. *Journal of neurochemistry*. 2013;125(1):49-62. Epub 2013/01/15. doi: 10.1111/jnc.12148. PubMed PMID: 23311731.
141. Cai Z, Zeng Y, Xu B, Gao Y, Wang S, Zeng J, et al. Galectin-4 serves as a prognostic biomarker for the early recurrence / metastasis of hepatocellular carcinoma. *Cancer science*. 2014;105(11):1510-7. Epub 2014/09/18. doi: 10.1111/cas.12536. PubMed PMID: 25230111; PubMed Central PMCID: PMC4462376.
142. Belo AI, van der Sar AM, Tefsen B, van Die I. Galectin-4 Reduces Migration and Metastasis Formation of Pancreatic Cancer Cells. *PloS one*. 2013;8(6):e65957. Epub 2013/07/05. doi: 10.1371/journal.pone.0065957. PubMed PMID: 23824659; PubMed Central PMCID: PMC3688853.
143. Chen C, Wang G, Huang X, Dong X, Chen G, Lin M, et al. Overexpression of galectin-4 promotes cell growth of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2017;10(10):10233-42. Epub 2017/10/01. PubMed PMID: 31966357; PubMed Central PMCID: PMC6965780.
144. Satelli A, Rao PS, Thirumala S, Rao US. Galectin-4 functions as a tumor suppressor of human colorectal cancer. *International journal of cancer*. 2011;129(4):799-809. Epub 2010/11/11. doi: 10.1002/ijc.25750. PubMed PMID: 21064109; PubMed Central PMCID: PMC3071872.
145. Kim SW, Park KC, Jeon SM, Ohn TB, Kim TI, Kim WH, et al. Abrogation of galectin-4 expression promotes tumorigenesis in colorectal cancer. *Cellular oncology (Dordrecht)*. 2013;36(2):169-78. Epub 2013/02/05. doi: 10.1007/s13402-013-0124-x. PubMed PMID: 23378274.
146. Barrow H, Guo X, Wandall HH, Pedersen JW, Fu B, Zhao Q, et al. Serum galectin-2, -4, and -8 are greatly increased in colon and breast cancer patients and promote cancer cell adhesion to blood vascular endothelium. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for*

- Cancer Research. 2011;17(22):7035-46. Epub 2011/09/22. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-11-1462. PubMed PMID: 21933892.
147. Helwa R, Heller A, Knappskog S, Bauer AS. Tumor cells interact with red blood cells via galectin-4 - a short report. *Cellular oncology (Dordrecht)*. 2017;40(4):401-9. Epub 2017/03/16. doi: 10.1007/s13402-017-0317-9. PubMed PMID: 28293788.
148. Kondoh N, Wakatsuki T, Ryo A, Hada A, Aihara T, Horiuchi S, et al. Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis. *Cancer research*. 1999;59(19):4990-6. Epub 1999/10/16. PubMed PMID: 10519413.
149. Hu D, Ansari D, Zhou Q, Sasor A, Said Hilmersson K, Andersson R. Galectin 4 is a biomarker for early recurrence and death after surgical resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2019;54(1):95-100. Epub 2019/01/22. doi: 10.1080/00365521.2018.1561937. PubMed PMID: 30663442.
150. Kuhlmann L, Nadler WM, Kerner A, Hanke SA, Noll EM, Eisen C, et al. Identification and Validation of Novel Subtype-Specific Protein Biomarkers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*. 2017;46(3):311-22. Epub 2016/11/16. doi: 10.1097/mpa.0000000000000743. PubMed PMID: 27846146.
151. Kocevar N, Grazio SF, Komel R. Two-dimensional gel electrophoresis of gastric tissue in an alkaline pH range. *Proteomics*. 2014;14(2-3):311-21. Epub 2013/12/03. doi: 10.1002/pmic.201200574. PubMed PMID: 24293252.
152. Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsutsumi S, Hirakawa K, et al. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer research*. 2001;61(3):889-95. Epub 2001/02/28. PubMed PMID: 11221876.
153. Hayashi T, Saito T, Fujimura T, Hara K, Takamochi K, Mitani K, et al. Galectin-4, a novel predictor for lymph node metastasis in lung adenocarcinoma. *PloS one*. 2013;8(12):e81883. Epub 2013/12/18. doi: 10.1371/journal.pone.0081883. PubMed PMID: 24339976; PubMed Central PMCID: PMC3858289.
154. Hallmarks of glyco-genes expression and their glycosylation pathways in squamous and adenocarcinoma cervical cancer [Internet]. NCBI. 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>.
155. Barrow H, Rhodes JM, Yu LG. Simultaneous determination of serum galectin-3 and -4 levels detects metastases in colorectal cancer patients. *Cellular oncology (Dordrecht)*. 2013;36(1):9-13. Epub 2012/11/03. doi: 10.1007/s13402-012-0109-1. PubMed PMID: 23117840.
156. Arnaou A, Ibrahim L. Serum galectin-4 (Gal-4) in patients with gastric adenocarcinoma: active player in the field. *International Journal of Advanced Research*. 2017;5(2):1162-7. doi: 10.21474/IJAR01/3269
157. Chen C, Duckworth CA, Fu B, Pritchard DM, Rhodes JM, Yu LG. Circulating galectins -2, -4 and -8 in cancer patients make important contributions to the increased circulation of several cytokines and chemokines that promote angiogenesis and metastasis. *British journal of cancer*. 2014;110(3):741-52. Epub 2014/01/05. doi: 10.1038/bjc.2013.793. PubMed PMID: 24384681; PubMed Central PMCID: PMC3915140.
158. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Jama*. 2013;310(20):2191-4. Epub 2013/10/22. doi: 10.1001/jama.2013.281053. PubMed PMID: 24141714.

159. Unal I. Defining an Optimal Cut-Point Value in ROC Analysis: An Alternative Approach. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2017;2017:3762651. doi: 10.1155/2017/3762651.
160. Mandrekar JN. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2010;5(9):1315-6. Epub 2010/08/26. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181ec173d. PubMed PMID: 20736804.
161. Narkhede S. Understanding AUC - ROC Curve Towards data science2018 [cited 2021 20 mayo ]. Available from: <https://towardsdatascience.com/understanding-auc-roc-curve-68b2303cc9c5>.
162. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950;3(1):32-5. Epub 1950/01/01. doi: 10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::aid-cnrc2820030106>3.0.co;2-3. PubMed PMID: 15405679.
163. Ruopp MD, Perkins NJ, Whitcomb BW, Schisterman EF. Youden Index and optimal cut-point estimated from observations affected by a lower limit of detection. *Biometrical journal Biometrische Zeitschrift*. 2008;50(3):419-30. Epub 2008/04/26. doi: 10.1002/bimj.200710415. PubMed PMID: 18435502; PubMed Central PMCID: PMCPMC2515362.
164. Kumar S, Shah JP, Bryant CS, Imudia AN, Ali-Fehmi R, Malone JM, Jr., et al. Prognostic significance of keratinization in squamous cell cancer of uterine cervix: a population based study. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2009;280(1):25-32. Epub 2008/12/02. doi: 10.1007/s00404-008-0851-9. PubMed PMID: 19043726.
165. Cooper T, Biron VL, Adam B, Klimowicz AC, Puttagunta L, Seikaly H. Association of Keratinization With 5-Year Disease-Specific Survival in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2015;141(3):250-6. doi: 10.1001/jamaoto.2014.3335.
166. Watanabe M, Takemasa I, Kaneko N, Yokoyama Y, Matsuo E, Iwasa S, et al. Clinical significance of circulating galectins as colorectal cancer markers. *Oncology reports*. 2011;25(5):1217-26. Epub 2011/03/04. doi: 10.3892/or.2011.1198. PubMed PMID: 21369702.
167. Barut MU, Kale A, Kuyumcuoğlu U, Bozkurt M, Ağaçayak E, Özekinci S, et al. Analysis of Sensitivity, Specificity, and Positive and Negative Predictive Values of Smear and Colposcopy in Diagnosis of Premalignant and Malignant Cervical Lesions. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2015;21:3860-7. Epub 2015/12/15. doi: 10.12659/msm.895227. PubMed PMID: 26655816; PubMed Central PMCID: PMCPMC4678924.
168. Bhat R, Belardi B, Mori H, Kuo P, Tam A, Hines WC, et al. Nuclear repartitioning of galectin-1 by an extracellular glycan switch regulates mammary morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(33):E4820-7. Epub 2016/08/09. doi: 10.1073/pnas.1609135113. PubMed PMID: 27496330; PubMed Central PMCID: PMCPMC4995945.
169. Shih TC, Liu R, Wu CT, Li X, Xiao W, Deng X, et al. Targeting Galectin-1 Impairs Castration-Resistant Prostate Cancer Progression and Invasion. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2018;24(17):4319-31. Epub 2018/04/19. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-18-0157. PubMed PMID: 29666302; PubMed Central PMCID: PMCPMC6125207.
170. Wehrhan F, Buttner-Herold M, Distel L, Ries J, Moebius P, Preidl R, et al. Galectin 3 expression in regional lymph nodes and lymph node metastases of oral squamous cell carcinomas. *BMC cancer*. 2018;18(1):823. Epub 2018/08/18. doi: 10.1186/s12885-018-4726-6. PubMed PMID: 30115022; PubMed Central PMCID: PMCPMC6097288.

171. Kataoka Y, Igarashi T, Ohshio Y, Fujita T, Hanaoka J. Predictive importance of galectin-3 for recurrence of non-small cell lung cancer. *General thoracic and cardiovascular surgery*. 2019;67(8):704-11. Epub 2019/03/25. doi: 10.1007/s11748-019-01074-x. PubMed PMID: 30903521.
172. Gao J, Qiu X, Li X, Fan H, Zhang F, Lv T, et al. Expression profiles and clinical value of plasma exosomal Tim-3 and Galectin-9 in non-small cell lung cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;498(3):409-15. Epub 2018/02/17. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.114. PubMed PMID: 29452091.
173. Wang K, Chen Z, Wu R, Yin J, Fan M, Xu X. Prognostic Role of High Gal-9 Expression in Solid Tumours: a Meta-Analysis. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018;45(3):993-1002. Epub 2018/02/13. doi: 10.1159/000487294. PubMed PMID: 29428936.
174. Morán Cruz MI. Estudio de la isoforma B2 del ARNm del gen ST3GAL4 e identificación de cambios en la expresión de genes de sialiltransferasas en muestras de cérvix con diferente grado de neoplasia y cáncer: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2014.
175. Zhu X, Ding M, Yu ML, Feng MX, Tan LJ, Zhao FK. Identification of galectin-7 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *BMC cancer*. 2010;10:290. Epub 2010/06/16. doi: 10.1186/1471-2407-10-290. PubMed PMID: 20546628; PubMed Central PMCID: PMC3087317.
176. Mathieu A, Saal I, Vuckovic A, Ransy V, Vereerstraten P, Kaltner H, et al. Nuclear galectin-3 expression is an independent predictive factor of recurrence for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2005;18(9):1264-71. Epub 2005/04/16. doi: 10.1038/modpathol.3800416. PubMed PMID: 15832191.
177. Lopez-Morales D, Reyes-Leyva J, Santos-Lopez G, Zenteno E, Vallejo-Ruiz V. Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. *Diagnostic pathology*. 2010;5:74. Epub 2010/11/26. doi: 10.1186/1746-1596-5-74. PubMed PMID: 21092209; PubMed Central PMCID: PMC2997087.
178. Roy A, Chakraborty S. Detection of cancer cervix by estimation of sialic acid. *Journal of the Indian Medical Association*. 2005;103(11):589-90. Epub 2006/03/31. PubMed PMID: 16570760.
179. Maftouh M, Belo AI, Avan A, Funel N, Peters GJ, Giovannetti E, et al. Galectin-4 expression is associated with reduced lymph node metastasis and modulation of Wnt/beta-catenin signalling in pancreatic adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2014;5(14):5335-49. Epub 2014/07/01. doi: 10.18632/oncotarget.2104. PubMed PMID: 24977327; PubMed Central PMCID: PMC4170638.

## ANEXO I: Preparación de soluciones y material

### Preparación de laminillas para histoquímica

Las laminillas (2951-001T, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) se agruparon en un rack y fueron se sumergidas por 1 min en solución APES al 2% en constante movimiento, luego se colocaron en metanol 100% por 1 min en agitación, 2 lavados de 1 min en agua bidestilada. Finalmente, las laminillas se secaron a 37°C por 24 hrs.

### Buffer de citratos 10 mM, pH 6

Citrato de sodio	2.94 gr
Agua bidestilada hasta	1 Litro

### PBS pH 7.2-7.4

	1X	Concentración final
Cloruro de sodio (NaCl)	8.00 gr	130 mM
Cloruro de potasio (KCl)	0.20 gr	3.0 mM
Fosfato de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.44 gr	8.1 mM
Fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.24 gr	1.5 mM
Agua bidestilada hasta	1 Litro	

### BSA 1%

Albúmina sérica bovina	1.0 gr
Agua bidestilada hasta	100 mL

### BSA 5%

Albúmina sérica bovina	5.0 gr
Agua bidestilada hasta	100 mL

### Triton X-100 2%

Triton x-100	200 µL
Agua bidestilada hasta	10 mL

### Poliacrilamida 30%

Acrilamida	7.3 gr
Bis-acrilamida	0.2 gr

### Persulfato de amonio 10%

Persulfato de amonio	1.0 gr
Agua bidestilada hasta	10 mL

### Dodecilsulfato de sodio (SDS) 10%

SDS	1.0 gr
Agua bidestilada hasta	10 mL

### Tris base 0.5 M pH 6.8

Tris base	6.05 gr
Agua bidestilada hasta	100 mL

### Tris base 1.5 M pH 8.0

Tris base	18.15 gr
Agua bidestilada hasta	100 mL

### Buffer Laemmli

	1X	10X	Concentración final
Tris base	3.0 gr	30.0 gr	25 mM
Glicina	14.0 gr	140.0 gr	192 mM
SDS	1.0 gr	10.0 gr	0.1 %
Agua bidestilada hasta	1 litro	1 litro	

### Buffer de transferencia 0.06% pH 8.3-8.5

Tris base	3.03 gr
Glicina	14.4 gr
SDS	0.6 gr

Metanol 200 mL

Agua bidestilada hasta 1 litro

NOTA: No ajustar el pH, únicamente medirlo

### Solución de lavado TBS y TBS-T

10X

Tris base 24 gr

NaCl 88 gr

Agua bidestilada hasta 1 litro

NOTA: ajustar pH a 7.5 con HCl, refrigerar a 4°C. Para preparar 1 litro de TBS-T 1X añadir 0.5 ml de Tween 20

### Buffer de carga para proteínas

2X

Glicerol 2.00 ml

SDS 10% 2.00 ml

Tris base 0.5 M pH 6.8 1.25 mL

$\beta$ -mercaptoetanol 0.50 mL

Azul de bromofenol pizca

Agregar agua bidestilada hasta 10 mL

### Buffer Stripping

Tris HCl 6.25 mL (1 M pH 6.8)

SDS 10 mL

$\beta$ -mercaptoetanol 100  $\mu$ L

Agregar agua bidestilada hasta 100 mL

### RIPA

	1X	Concentración final
Tris HCl, pH 7.4	150 $\mu$ L	50 mM
NP-40	200 $\mu$ L	1%
Deoxicolato de sodio		0.5%
SDS		0.1%

Cloruro de sodio	150 mM,
EDTA	2 mM
Agregar agua bidestilada hasta 20 mL	

### Preparación de gel de poliacrilamida

#### *Concentrador al 4%*

Poliacrilamida 30%	330 $\mu$ L
Tris base 0.5 M pH 6.8	630 $\mu$ L
SDS 10%	33 $\mu$ L
Agua bidestilada	1500 $\mu$ L
Persulfato de amonio 10%	10 $\mu$ L
TEMED	4 $\mu$ L

#### *Separador al 12%*

Poliacrilamida 30%	2000 $\mu$ L
Tris base 1.5 M pH 8.0	1300 $\mu$ L
SDS 10%	50 $\mu$ L
Agua bidestilada	1600 $\mu$ L
Persulfato de amonio 10%	50 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L

## ANEXO II: Consentimiento informado



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Coordinación de Investigación en Salud  
Comisión Nacional de Investigación Científica

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:

#### Expresión de Galectina 9 en cáncer cervicouterino: marcador predictivo de respuesta al tratamiento y supervivencia

Patrocinador externo: NO APLICA

Lugar y Fecha: \_\_\_\_\_

No. de registro: R-2017-785-119

#### Justificación y objeto del estudio

Estimada Paciente, se le invita a participar en el estudio de investigación, **Expresión de Galectina 9 en cáncer cervicouterino: marcador predictivo de respuesta al tratamiento y supervivencia**, registrado ante la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Dicho proyecto se llevará a cabo en Unidad Médica de Alta Especialidad, CMN Manuel Ávila Camacho del IMSS, y en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente, ubicado en la ciudad de Metepec, Puebla. El objetivo de la investigación es: Evaluar la expresión de galectina-9 en cáncer cervicouterino como un marcador predictivo de respuesta al tratamiento y supervivencia. La galectina-9 es una proteína que participa en muchas funciones de la célula, como controlar la velocidad a la que se divide, o la capacidad que tiene de invadir otros tejidos. Cuando una célula normal se transforma en una célula tumoral o cancerosa se presentan muchas alteraciones, una de ellas es la disminución en la cantidad de esta proteína, estos cambios le permiten a la célula cancerosa dividirse sin control lo que favorece el crecimiento del tumor.

Este proyecto en particular está dedicado al estudio de una región del cuerpo de las mujeres llamada cérvix o cuello del útero (matriz), que es el sitio en el que se unen la matriz y la vagina. En este sitio se desarrolla un tipo de cáncer llamado cervicouterino (cáncer del cuello del útero).

Tal vez usted ya sabe que el cáncer cervicouterino es una enfermedad grave que afecta a muchas mujeres mexicanas, por lo que el presente proyecto busca determinar si analizar la cantidad de galectina 9 puede ayudar a determinar el pronóstico del tumor, o dar seguimiento a las pacientes para identificar si existe una recaída, lo cual podría ser utilizado para identificar la presencia de cáncer lo más pronto posible. La cantidad de esta proteína en el tejido del cuello del útero puede modificarse en relación a la presencia y el tipo de virus del papiloma humano.

Usted ha sido elegida para participar en este proyecto de investigación porque al realizarle estudios de patología el reporte indicó que usted tiene cáncer cervicouterino.

Al igual que usted, serán invitadas a participar otras pacientes que, de forma voluntaria y sin ninguna presión, acepten participar en el estudio. Por favor lea la información que le estamos proporcionando y si tiene alguna pregunta, con gusto le aclararemos sus dudas.

Su participación es voluntaria y su decisión de participar o no en este proyecto no afecta en nada su relación con el IMSS, es decir que Usted seguirá recibiendo la atención médica requerida para mejorar su salud independientemente de que decida o no participar en este estudio.

### **Procedimientos**

Como parte de la atención que normalmente le brinda el IMSS, Usted se le realizan algunas preguntas sobre su estado de salud y sus antecedentes clínicos, se le realizará una exploración física minuciosa y los estudios de laboratorio que su médico juzgue convenientes, así como los procedimientos clínicos o quirúrgicos necesarios para tratar su enfermedad, en caso de tenerla. En este sentido el participar en el estudio no hará ningún cambio respecto a la atención que le brinda su médico en esta unidad, si es que fuera necesario.

Dependiendo de la etapa en que se encuentre su enfermedad (cáncer), se le realizarán diferentes tipos de tratamiento, los cuales incluyen cirugía, radioterapia y/o quimioterapia, su médico oncólogo, determinará cuál es el tratamiento más adecuado para tratar su enfermedad, para esto tomará en cuenta su edad, el número de hijos que haya tenido, su condición en general y el grado de avance de su enfermedad.

En ciertos casos de cáncer el médico decide retirar la parte del cuello de la matriz que está lesionada, mediante un tratamiento quirúrgico que se llama conización o simplemente cono (ya que la parte removida tiene dicha forma). En otros casos el médico puede decidir por retirarle quirúrgicamente toda la matriz (o útero), los ovarios y ganglios, si estuvieran comprometidos. Recuerde que esto dependerá de la gravedad de su enfermedad y las decisiones que tome el médico oncólogo que la está tratando, y en ningún caso se hace con el fin de aportar muestras a este proyecto de investigación.

Como parte de este estudio se le pedirá responder a un cuestionario que le aplicará una enfermera o un auxiliar del proyecto. El tiempo requerido para completar el cuestionario será de máximo 15 minutos.

Se le tomará una muestra del cuello del útero, siguiendo el mismo procedimiento utilizado para el estudio de Papanicolaou (raspado cervical); esta muestra se utilizará para conocer mediante procedimientos de laboratorio el tipo de virus de papiloma humano presente en las células.

Se le tomará una muestra de 3 ml sangre, que equivalente a media cucharadita cafetera, para evaluar la concentración de galectina-9 y determinar si está asociada con la presencia de la enfermedad.

Se le solicita su autorización para poder utilizar parte del tejido que le haya sido retirado, ya sea como cono, biopsia o útero completo, para realizar otras pruebas de laboratorio que nos ayuden a identificar la cantidad de galectina 9. También le pedimos su autorización para conservar y almacenar las partes de las muestras de tejido no utilizadas en este estudio, para ser utilizadas en otros proyectos de investigación futuros que ayuden a detectar, prevenir y tratar el cáncer cervicouterino.

momento, termina su participación en el estudio.

Por ningún motivo se solicitará que usted asista al Hospital para la toma de muestra, esta se hará durante las citas de revisión que usted tenga programadas. Al respecto cuando se haga la toma de muestras de sangre de seguimiento, se tomarán algunos datos clínicos con respecto a la evolución de la enfermedad, tipo de tratamientos aplicados, resultados de laboratorio, estos datos serán tomados de su expediente concluyendo la consulta, lo que tomará máximo 5 min.

Los investigadores analizaremos los resultados y los publicaremos en Foros y revistas especializadas, sin que sea posible identificar a ninguna participante.

### **Posibles riesgos y molestias.**

La toma de las muestras de laboratorio no implica riesgo para usted porque será realizada por personal médico capacitado.

El raspado cervical se realiza con un cepillo desechable (solo se usa una vez) que raspa suavemente la superficie del cuello de la matriz. Las molestias que usted podría presentar son las mismas que usted ha sentido cuando le toman muestras para el Papanicolaou. En algunas ocasiones se puede presentar ligero dolor, pero éste desaparece en poco tiempo sin necesidad de recibir medicamentos.

La toma de sangre le ocasionará molestias mínimas, como el leve dolor por el piquete con la aguja en el antebrazo al tomar la muestra de sangre, existiendo la posibilidad de formarse un moretón en el lugar de la toma de muestra de sangre .

Las muestras de tejido serán tomadas de las de la biopsia que le fue tomada para realizar el diagnóstico de su enfermedad.

### **Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio.**

Por su participación en el estudio usted no tendrá que hacer ningún gasto y tampoco recibirá ningún pago. La atención médica, medicamentos, exámenes, tratamientos y cirugías, etc. que requiera para su enfermedad será proporcionados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), gracias a que usted es derechohabiente.

Su participación en el estudio no tendrá ningún beneficio inmediato para usted, sin embargo, será importante ya que ayudará a que esta enfermedad se conozca mejor y podamos proponer mejores métodos de diagnóstico; esto beneficiará en el futuro a otras personas que sufran de la misma enfermedad.

### **Información sobre resultados y alternativas de tratamiento,**

Ya que los resultados de este estudio no cambiarían el pronóstico, la evolución, ni el tratamiento de su enfermedad, no se considera necesario entregarle ningún reporte del mismo. Pero si usted está interesada en conocer los resultados del proyecto, tiene el derecho de solicitarlos al investigador responsable.

**Participación o retiro.** Su participación en este estudio es completamente voluntaria; si usted decide no participar en el estudio, seguirá recibiendo la atención brindada por el IMSS y se le ofrecerán los procedimientos y tratamientos habituales. De la misma forma, usted

podrá abandonar el estudio en el momento que así lo decida, sin que eso afecte el seguimiento o la atención que se le proporciona en el IMSS.

**Privacidad y confidencialidad.** La información será guardada de manera confidencial y por separado para garantizar su privacidad. Cuando se conjunten los datos de todos los participantes en el estudio y se realice el análisis, su nombre permanecerá oculto, al igual que al presentar los resultados en una publicación o conferencia.

Solo cuando el médico tratante lo solicite se le proporcionarán los resultados obtenidos de este estudio, o bien cuando por alguna situación especial lo requiera la ley.

En caso de colección de material biológico:

- No autorizo que se tome la muestra.
- Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.
- Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros. Las muestras serán almacenadas por un periodo de 10 años.

**Beneficios al término del estudio:**

Al término del estudio, los resultados generados permitirán evaluar si la determinación de galectina-9 puede ser utilizada como un marcador para dar seguimiento a las pacientes con CaCu y determinar de manera más temprana su exista una recaída o persistencia de la enfermedad.

Si tiene usted preguntas o desea hablar con alguien del equipo médico, puede comunicarse con el Responsable Médico del Proyecto en su Unidad:

Dr. \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_ correo: \_\_\_\_\_

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse con su médico o con la investigadora responsable del estudio la Dra. Verónica Vallejo Ruiz al teléfono (244) 444 01 22 de lunes a viernes de las 8:00 a las 16:00 horas o cualquier día de la semana al celular 22 21 60 21 54, con sede en la Ciudad de Puebla México. En caso de requerir mayor y más detallada información, puede escribir al correo [veronica.vallejor@imss.gob.mx](mailto:veronica.vallejor@imss.gob.mx)

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a la Comisión de Ética de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Col. Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56276900 extensión 21230, Correo electrónico: [comiteeticainv.imss@gmail.com](mailto:comiteeticainv.imss@gmail.com)

**DECLARACION DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

Se me ha explicado con claridad en qué consiste el estudio, además he leído el contenido de este formato de consentimiento; se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y

todas mis dudas han sido aclaradas; consta en esta carta con mi firma mi participación voluntaria.

---

Nombre y firma del participante

**Firma del encargado de obtener el consentimiento informado**

Le he explicado el estudio de investigación ala participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

---

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

---

Firma del encargado de obtener el Consentimiento Informado

Fecha

---

Testigo 1

Nombre, dirección, relación con el paciente y firma

---

Testigo 2

Nombre, dirección, relación con el paciente y firma

## ANEXO III: Publicación y congresos

### Se realizó la publicación del trabajo de tesis

- *Evaluation of Serum Levels and Expression of Galectin-4 in Cervical Cancer*

Ileana Conde-Rodríguez, Guadalupe Delgado-López, Erick Armenta-Castro, Ivonne Ramírez-Díaz, Maricruz Anaya-Ruiz, Claudia T. Gutiérrez-Quiroz, Juan Carlos Flores-Alonso, Salvador Reyes-Salinas, Víctor J. Vazquez-Zamora, Francisco J. Ceja-Utrera, Aurelio López-Colombo, Julio Reyes-Leyva

BioMed Research International (<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/6756723/>)

### El trabajo fue presentado en congresos

- *Evaluación de la concentración de galectina-4 en pacientes con lesiones premalignas y cáncer cervicouterino*

XXIV Foro Sur de Investigación en Salud, presentación en poster (Junio 2017)

- *Evaluation of galectin-4 concentration in serum of patients with premalignant injuries and cervical cancer*

4th Latin American Congress of Glycobiology, presentación en poster (Octubre 2017)

- *Evaluation of galectin-4 in serum and tissue of patients with premalignant lesions and cervical cancer*

4ta Reunión Anual de Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer, (Octubre 2017)

- *Evaluación de la concentración de galectina-4 en suero de pacientes con lesiones premalignas y cáncer cérvicouterino*

XXVI Foro Nacional de Investigación en Salud, presentación en poster (Octubre 2017)

- *Evaluación de la concentración de galectina-4 sérica en pacientes con lesiones premalignas y cáncer cervicouterino*

XXV Foro Sur de Investigación en Salud, presentación en poster (Julio 2018)

- *Evaluación de la concentración de galectina-4 en suero de pacientes con cáncer cervicouterino*

XXVII Foro Nacional de Investigación en Salud, (Septiembre 2018)

- *Evaluación de la concentración de galectina-4 en suero de pacientes con lesiones premalignas y cáncer cervicouterino*

XXVII Jornadas de Educación e Investigación para Médicos Residentes “Dr. Juan Augusto Rafael Larrauri Rodríguez” (Enero 2019)

- ***Evaluación de la concentración de galectina-4 en suero de pacientes con lesiones premalignas y cáncer cervicouterino***

XXVI Foro Sur de Investigación en Salud (Octubre 2019)

- ***Evaluación de galectina-4 en suero y tejido de pacientes con lesiones premalignas y cáncercervicouterino***

5° Latin American Congress of Glycobiology, presentación en poster (Octubre 2019)

## Research Article

# Evaluation of Serum Levels and Expression of Galectin-4 in Cervical Cancer

**Ileana Conde-Rodríguez,<sup>1,2</sup> Guadalupe Delgado-López,<sup>3</sup> Erick Armenta-Castro,<sup>1,2</sup> Ivonne Ramírez-Díaz,<sup>1,2</sup> Maricruz Anaya-Ruiz,<sup>3</sup> Claudia T. Gutiérrez-Quiroz,<sup>4</sup> Juan Carlos Flores-Alonso,<sup>5</sup> Salvador Reyes-Salinas,<sup>4</sup> Víctor J. Vazquez-Zamora,<sup>4</sup> Francisco J. Ceja-Utrera,<sup>4</sup> Aurelio López-Colombo,<sup>4</sup> Julio Reyes-Leyva,<sup>6</sup> Gustavo López-López,<sup>2,7</sup> and Verónica Vallejo-Ruiz<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Metepec, Puebla, Mexico

<sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

<sup>3</sup>Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Metepec, Puebla, Mexico

<sup>4</sup>Hospital de Especialidades, General Manuel Ávila Camacho, Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, Puebla, Mexico

<sup>5</sup>Laboratorio de Biología de la Reproducción, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Metepec, Puebla, Mexico

<sup>6</sup>Laboratorio de Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Metepec, Puebla, Mexico

<sup>7</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, Mexico

Correspondence should be addressed to Verónica Vallejo-Ruiz; [veronica\\_vallejo@yahoo.com](mailto:veronica_vallejo@yahoo.com)

Received 16 July 2020; Revised 6 November 2020; Accepted 10 November 2020; Published 20 November 2020

Academic Editor: Rafael S. De Molon

Copyright © 2020 Ileana Conde-Rodríguez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Galectin-4 has been reported to be altered in different cancer types. Its expression changes have been associated with early recurrence and metastasis. In cervical cancer (CC), galectin-4 has not been studied. The aim of the study was to determine the expression level and subcellular localization of galectin-4 in CC tissue and the concentration in the serum of patients with CC. For the analysis of serum levels of galectin-4, an ELISA assay was performed. To assess the expression in cervical tissue, immunohistochemical staining was performed. The results showed that the concentration of galectin-4 in the serum of patients with CC was higher (647.9 pg/ml) than that in the serum of women with normal cytology (382.1 pg/ml). The immunohistochemical analysis of CC samples showed a higher expression in keratinizing tumor than nonkeratinizing tumors and a trend of increased expression in tumors from patients with advanced clinical stage. In normal cervical tissue, galectin-4 was detected in the cytoplasm, and in tumor cells, the presence of galectin-4 was also detected in the nucleus, in both adenocarcinoma and squamous cervical cancer. The increase in serum concentration and different localization in the tumor cells suggest a possible role of galectin-4 in CC development.

## 1. Introduction

Cervical cancer (CC) is the second leading cancer-related cause of death in women in undeveloped countries [1]. The most common histological types are squamous carcinoma

and adenocarcinoma [2]. CC screening is based on the test Pap smear (cytology), which has decreased the incidence and mortality of CC, but the low reproducibility of this test can impact the incidence rate; in México, a high percentage of false-negative cases have been reported [3]. Novel

biomarkers could help with early diagnosis, determine prognosis, evaluate the response to treatment, and clinically manage patients and therapies. The galectin family has 15 members that recognize  $\beta$ -galactoside structures through their carbohydrate-recognizing domains [4]. These proteins have been reported to be altered in different cancer types and, in some cases, associated with tumor progression and survival and have been proposed as biomarkers for prognosis and therapeutic targets [5–9]. For some galectins, changes in subcellular localization have been detected and associated with cancer progression, such as in tongue carcinoma, in which nuclear galectin-3 decreases with cancer progression, showing an increase in the cytoplasm [10]. The location of galectin-3 in the nuclei of non-small-cell lung cancer cells is a prognostic predictor of recurrence [11]. In oesophageal squamous cell carcinoma, high expression of galectin-7 has been reported with respect to normal tissue; additionally, galectin-7 was preferentially located in the nucleus of the cells in normal tissue, and in cancer tissue, it was located in the cytoplasm and in the cell membrane in addition to the nucleus [12]. It has been reported that the subcellular location determines the role of galectins [13, 14].

Galectin-4 is a protein with two carbohydrate domains that have been reported to be altered in pancreatic cancer [15], gastric adenocarcinoma [16, 17], hepatocellular carcinoma [6], colorectal cancer, breast carcinoma [18], and lung cancer [19]. The role of galectin-4 can be different with respect to the cancer type. In pancreatic cells, it can decrease migration and metastasis [20]; in contrast, in colorectal cancer cells, the low expression of galectin-4 increases migration and cell proliferation [21]. The serum levels have also been reported to vary in different types of cancer such as hepatocellular carcinoma, melanoma, pancreatic cancer, bladder cancer, colorectal cancer, breast cancer, gastric cancer, and head and neck cancer, in which the concentration has been reported to be increased compared with that in normal tissues [22–27]. Serum galectins can promote migration and metastasis in cancer [28, 29].

For CC, neither the tissue expression nor the serum concentration of galectin-4 has been reported. Considering the important roles that this protein plays in the cell and its association with tumor progression, we were interested in evaluating the expression level of galectin-4 in CC tissue, its subcellular location, and its concentration in the serum of patients with CC.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Patients and Samples.** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the ethical regulations approved by the Human Ethics Committee 2106 from the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), registration number (R-2016-2106-1).

The female patients included in the study were invited to participate at the Radiotherapy Service of the National Health Centre, Manuel Avila Camacho, IMSS, in Puebla City, Mexico, during the period February 2017 to July 2019. All the patients included in the study were informed and signed the consent form.

Clinical and pathological diagnoses of CC were made by the Pathology Service and treating oncologists according to FIGO staging [2].

**2.2. Galectin-4 Detection in the Serum of Patients.** A total of 52 female serum samples were collected, including 13 with normal cytology and 39 patients with CC. Serum was obtained by phlebotomy of newly diagnosed patients before treatment. The concentration of galectin-4 in serum was determined by using the Human Galectin-4 ELISA Kit (IRK-TAH5118, Innovative Research, Inc., Plymouth, MN, US) according to the manufacturer's instructions. Serum samples were used at a dilution 1:2.

**2.3. Galectin-4 Detection in Cervical Tissue.** Paraffin-embedded cervix biopsies were obtained from the Department of Pathology of the Centro Médico Nacional, Manuel Ávila Camacho, IMSS. A total of 35 biopsies were obtained, 6 from normal cervix tissue and 29 from patients with a diagnosis of CC. Paraffin sections 4  $\mu$ m thick were cut and placed on slides treated with APES; next, they were deparaffinized and rehydrated. Antigen retrieval was performed by incubation for 15 min at 90°C in 10 mM citrate buffer pH 6.0 (C9999, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US). Then, every step was followed by washing three times with 1x PBS except incubation with blocking buffer. To block endogenous peroxidase activity, sections were incubated for 15 min with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 1x PBS. Afterward, the tissues were incubated for 1 hour with blocking buffer containing 5% bovine serum albumin (P6154, Biowest, Riverside, MO, US.) in 1x PBS. The tissues were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-GAL4 antibody (ab170638, Abcam, Cambridge, UK) at a dilution of 1:100. Next, the tissues were incubated with the secondary antibody anti-rabbit IgG-HRP (ab6721, Abcam, Cambridge, UK) at a dilution of 1:1,000, and colour development was assessed with ImmPACT® DAB Peroxidase Substrate (SK-4105, Vector Labs, Burlingame, CA, US). Finally, nuclei were counterstained with haematoxylin solution (HX87960674 Merck, Darmstadt, Hesse, DE), and the slides were mounted with VectaMount® Permanent Mounting Medium (H-5000, Vector Labs, Burlingame, CA, UU). Negative controls of the technique were processed with only the secondary antibody.

Tissue images were obtained with a VENTANA DP200 scanner (Roche Diagnostics, Switzerland, CH), and the mean staining density was evaluated with the Image-Pro software (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, US).

**2.4. Statistical Analysis.** Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, US). Statistical significance in serum was evaluated with the Mann-Whitney test. The association between the concentration of galectin-4 in serum and clinicopathological features was evaluated with a Mann-Whitney test with the exception of the differentiation grade which was calculated using Kruskal-Wallis test. The differences in staining intensity of the tissues between different stages of cancer were evaluated by the Mann-Whitney test. A value of  $p < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference.

### 3. Results

**3.1. Serum Levels of Galectin-4 Are Higher in Patients with CC than in Patients without Disease.** Serum levels of galectin-4 were evaluated by ELISA in 52 serum samples, including samples classified according to histological diagnosis as nondiseased ( $n = 13$ ) and as CC ( $n = 39$ ). The mean age of nondiseased patients was 31.72 years ( $\pm 8.73$  (SD); range 22-51 years), and for patients with a diagnosis of CC, it was 54.23 years ( $\pm 14.24$ ; range 21-81 years). The CC group comprised 32 patients with a diagnosis of squamous carcinoma and 7 patients with adenocarcinoma.

Patients with CC showed an increase in the serum concentration of galectin-4 with respect to nondisease patients. The median galectin-4 concentration was 382.1 pg/ml in nondisease patients and 647.9 pg/ml ( $p = 0.0061$ ) in CC patients. The results are shown in Figure 1.

To determine whether the serum concentration of galectin-4 in CC patients was related to clinicopathological features, histological type, differentiation grade, FIGO staging, tumor size, or keratinizing or not keratinizing type, a Mann-Whitney test was performed. The serum concentration did not show significant differences according to the analysed characteristics (Table 1). However, it is important to note that there was a tendency of increasing concentration in the group with keratinizing tumors with respect to the nonkeratinizing group. The concentration in the serum of patients with advanced clinical stages III-IV was also observed to be higher than that in the serum of patients with clinical stages I and II, who showed the lowest serum concentrations.

**3.2. Galectin-4 Expression in Squamous Cervical Tissue.** The expression of galectin-4 was evaluated by histochemical analysis in normal cervical epithelium to determine if this protein was expressed in the cervix and to subsequently evaluate its expression in CC tissues. The analysis was performed on 6 normal samples and 29 CC samples (23 with a diagnosis of squamous cervical carcinoma, 5 with a diagnosis of adenocarcinoma, and 1 with a diagnosis of adenosquamous carcinoma).

The presence of galectin-4 was detected both in normal tissue and in CC tissues. In the basal cells of the normal cervical squamous epithelium, galectin-4 was not detected, but it was observed in the differentiated cells throughout the layers of the epithelium. Regarding the cellular localization, galectin-4 was preferentially observed in the cytoplasm (Figure 2). Additionally, we observed the presence of galectin-4 in stromal cells.

In squamous cervical carcinoma, the expression of galectin-4 was detected in the tumor cells, but the expression pattern was different from that in normal tissue. In the tumor cells, the presence of galectin-4 was observed in both nuclei and the cytoplasm, and in some samples, the nuclear expression was higher than that in the cytoplasm (Figure 2). In the tumors, the expression of galectin-4 in stromal cells was also detected.

The expression level of galectin-4 between the tumors of patients with different clinical stages is shown in Figure 3. The level of expression and the cellular localization of

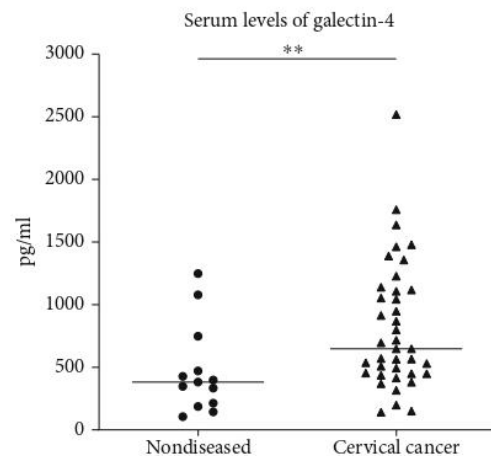


FIGURE 1: The concentration of galectin-4 was increased in serum from CC patients. Galectin-4 concentrations (pg/ml) in the serum of women without disease (circle,  $n = 13$ ) and with CC (triangle,  $n = 39$ ) are shown. Mann-Whitney test  $**p = 0.0061$ .

galectin-4 did not change with clinical stage, and there were samples with different clinical stages that presented similar expression levels. This was also observed in relation to nuclear localization, for which the staining pattern did not change with cancer progression.

### 3.3. Galectin-4 Expression in Columnar Cervical Epithelium.

Only a few samples of columnar epithelium and adenocarcinoma could be analysed, including 2 normal tissues and 5 adenocarcinomas, but we could observe characteristic expression patterns. In the columnar cells of the normal glandular epithelium, galectin-4 was detected at low intensity, and its expression was observed in the cytoplasm (Figure 4). When galectin-4 was analysed in the tumor specimens, the expression of galectin-4 was increased in the columnar cells, in which it was detected in nuclei (Figure 4).

### 3.4. Expression Level of Galectin-4 in Cervical Squamous Carcinoma.

The expression level of galectin-4 in CC tissues was evaluated with respect to clinical stage, tumor differentiation grade, and keratinization status. The keratinizing tumors showed increased expression of galectin-4 with respect to the nonkeratinizing tumors, and the differences were statistically significant (Figure 5).

The statistical analysis did not show differences with respect to clinical stage and differentiation grade, but a trend of increasing expression was observed in the tumors of patients with advanced clinical stages (III and IV) (Table 2). It was also observed that most of the samples with the lowest expression of galectin-4 belonged to clinical stages I and II (Figure 6).

## 4. Discussion

The aim of this study was to determine whether the serum concentration of galectin-4 in patients with CC is different from that in healthy women and to evaluate the expression level and localization of galectin-4 in CC tissue.

TABLE 1: Galectin-4 serum levels and clinic-pathological features of patients with CC.

Cervical cancer	<i>n</i>	Gal-4 in serum (pg/ml)		<i>p</i> value
		Median	Range	
Histological type				
Squamous carcinoma	32	757.062	141.130-2518.000	0.0949
Adenocarcinoma	7	493.630	149.880-1388.000	
Differentiation				
Poor	6	539.285	316.430-1139.290	ns
Moderate	21	565.000	149.880-1636.430	
Well	3	1108.000	368.630-2518.000	
No reported	9			
Keratinizing				
No	14	630.030	141.130-1462.140	0.4677
Yes	10	757.062	381.130-1478.000	
Not reported	15			
FIGO staging				
I-II	17	563.630	141.130-1462.140	0.1997
III-IV	10	681.992	453.630-1356.429	
Not classifiable	12			
Tumor size (cm)				
≤5.1	8	613.155	198.630-1636.430	0.1325
>5.1	6	448.630	141.130-647.860	
No size	24			

*p* values were calculated using Mann-Whitney test with the exception of the differentiation grade which was calculated using Kruskal-Wallis test.

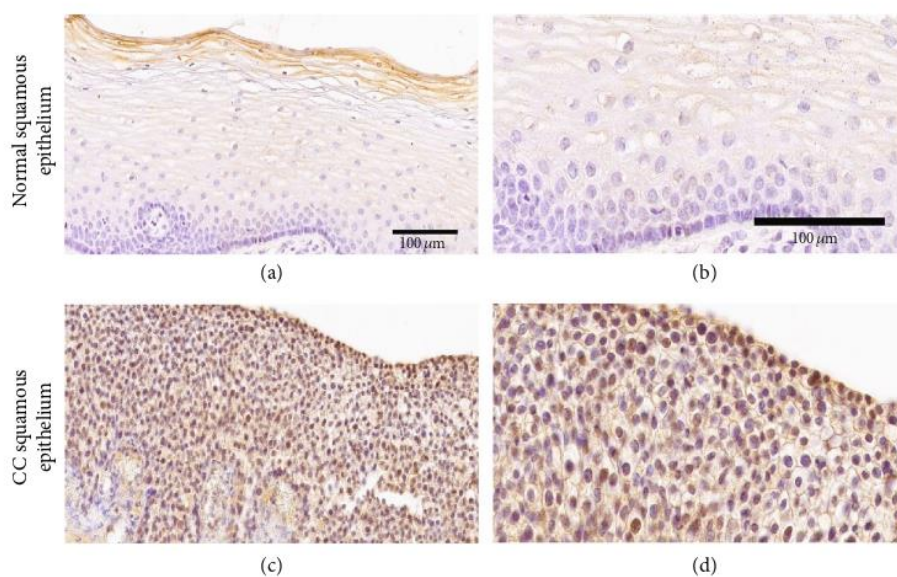


FIGURE 2: Galectin-4 immunodetection in cervical tissue samples from normal squamous epithelium and squamous CC. (a, b) correspond to normal squamous epithelium to 20x and 40x of magnification, respectively. The expression of galectin-4 was observed in the cytoplasm of the cells. (c, d) correspond to squamous CC to 20x and 40x of magnification, respectively. Galectin-4 was observed in both the cytoplasm and the nuclei of the tumor cells.

The serum levels of galectin-4 in CC patients were higher than those in normal serum. Serum levels of galectin-4 have been analysed in gastric adenocarcinoma [16], colon cancer, breast cancer [18, 23], and hepatocellular carcinoma (HCC)

[6]. In all cancer types, the serum concentration of galectin-4 has been reported to be increased. In the case of colon cancer, the serum levels of galectin-4 were increased 11.1-fold overall and 25.3-fold in patients with metastasis with

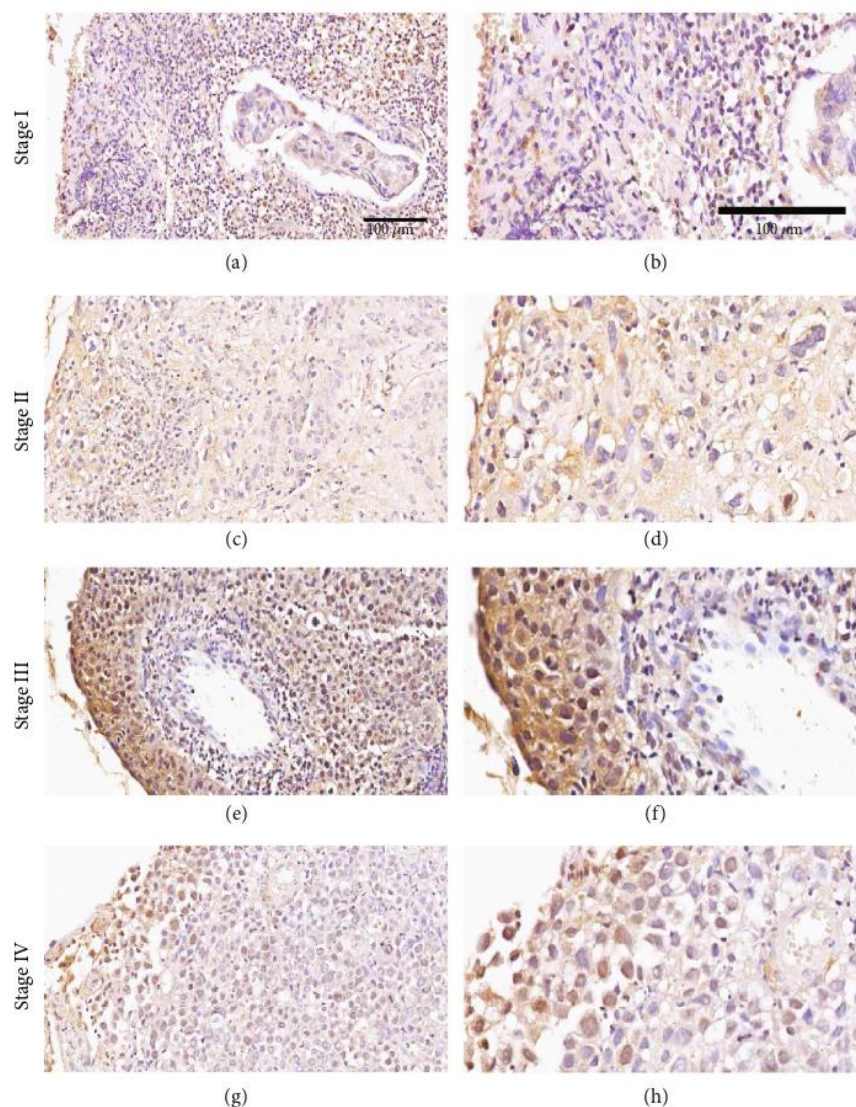


FIGURE 3: Galectin-4 expression in tumors from patients with different FIGO stages. Squamous cervical cancer tissue corresponds to (a, b) stage I, (c, d) stage II, (e, f) stage III, and (g, h) stage IV, to magnification 20x and 40x, respectively. Galectin-4 was observed in epithelial cells of tumors of patients with different FIGO stages, and its expression was observed in both the cytoplasm and nuclei. Galectin-4 was strongly expressed in some tumor cells with no relation to the FIGO stage.

respect to the levels in the healthy group; in breast cancer patients, an increase of 11-fold was detected [18]. With respect to hepatocellular cancer, galectin-4 was only increased in the serum of patients with HCC and infection with hepatitis B virus [6], and an association between higher serum levels and more aggressive characteristics of the cancer has also been reported. Our results are similar to those in other cancer types, in which serum levels of galectin-4 are increased in cancer patients compared with patients without disease. In addition, we observed a trend toward an increase in the serum concentration of galectin-4 in the patients with keratinizing tumors compared with nonkeratinizing tumors, as well as in FIGO stages III and IV with respect to FIGO stages I and II. In hepatocellular and colorectal carcinomas, an association has been reported between higher concentrations of serum galectin-4 and advanced clinical stage [6,

18]; additionally, in patients with hepatocarcinoma, higher serum concentrations of galectin-4 were associated with metastasis [23]. Our results suggest that galectin-4 could have a role in the invasion and metastasis of CC, but more serum samples from patients in stage IV must be analysed to confirm this association. The role of circulating galectin-4 was not characterized. *In vitro* studies suggest that circulating galectins could participate in recruiting tumor cells to the vascular endothelium. Circulating galectin-3 was shown to participate in metastasis in an *in vivo* model of nude mice. Galectin-3 binds to the oncofoetal Thomsen-Friedenreich antigen, which is a disaccharide (Gal $\beta$ 1,3GalNAc) present in the MUC1 transmembrane protein of tumor cells, and the interaction favours the exposure of other adhesion molecules, which facilitates the adhesion of tumor cells to the vascular endothelium [30].

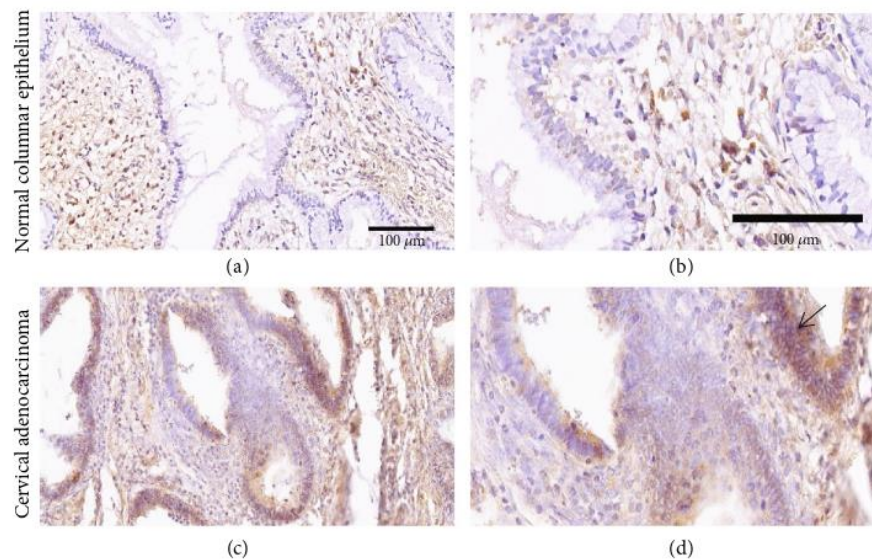


FIGURE 4: Galectin-4 expression in columnar cervical epithelium. (a, b) correspond to normal columnar epithelium and (c, d) to cervical adenocarcinoma. Galectin-4 was observed in columnar and stromal cells. In the columnar cells in nondiseased tissue, the expression was low, and its expression was increased in columnar cells in adenocarcinoma. In adenocarcinoma tissues, it was observed that the expression level of galectin-4 was increased in areas that had greater proliferation (arrow).

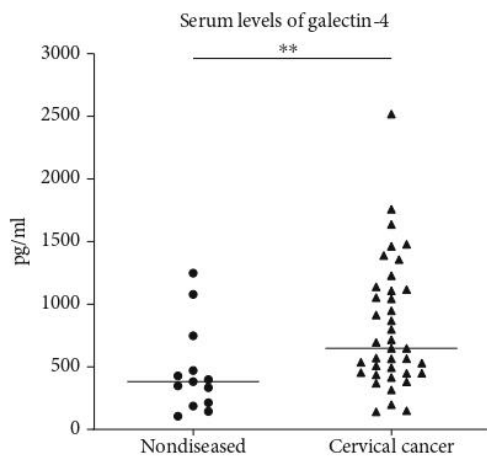


FIGURE 5: Tissue expression of galectin-4. Expression of galectin-4 in keratinizing (circle,  $n = 16$ ) and nonkeratinizing (square,  $n = 5$ ) CC tumors. The expression level of galectin-4 in keratinizing tumors was higher than that in nonkeratinizing tumors. The mean density of the expression level of galectin-4 was calculated with the Image-Pro software. Mann-Whitney test  $*p = 0.0318$ .

It is important to mention that the deviation of serum galectin-4 values in CC patients was high; in some cases, the serum levels in patients with CC were similar to those in healthy women, and in other cases, the serum levels in patients with CC were twice the values in healthy women. In gastric adenocarcinoma patients, values up to 40-fold the values in healthy people have been reported in some cancer patients, while other patients have similar values to healthy people [16]. These differences could be associated with cancer progression and could be utilized for early identification

of patients with a higher risk of cancer progression, and it has been proposed that circulating galectins could be therapeutic targets to reduce metastasis [16].

Galectin expression has also been reported to be altered in the tissues of different types of cancer. Galectin-1 [31, 32], galectin-3 [33, 34], and galectin-9 [35–37] are the most studied. The galectin-4 expression has been detected in different tissues and was first reported in the alimentary tract and liver [38]. During cell transformation, the expression of galectin-4 changes, and in some types of cancer, its expression has been related to stage or prognosis [6, 39].

Immunohistochemical staining showed that galectin-4 was preferentially expressed in the cytoplasm of normal epithelial cells, and its expression in SCC cells was observed in the cytoplasm and nuclei, showing changes in the localization associated with cancer transformation. With respect to the normal columnar cells, the faint expression of galectin-4 was detected in the cytoplasm. In adenocarcinoma, the expression was higher than that in normal columnar epithelium, and it was also observed primarily in nuclei. For some galectins, changes in the intracellular localization associated with cancer have been reported; galectin-7 was detected in nuclei in normal oesophageal epithelial tissue, and in oesophageal cell carcinoma, its expression was detected in the cytoplasm, nuclei, and membrane [12]. The preferential nuclear localization of galectin-3, over cytoplasmic localization, was proposed as a prognostic indicator of recurrence in lung carcinoma patients [11]. Galectin-1 induces the migration of mammary epithelial tumor cells, and this influence is exercised when the protein is located in the nucleus. It was also reported that the change in localization is the result of glycosylation, showing that  $\alpha 2,6$  sialylation interferes with the interaction of galectin-1 with LacNAc glycans, allowing the translocation of galectin-1 to the nucleus [31]. During cervix

TABLE 2: Expression levels of galectina-4 in tissue and clinic-pathological features of patients with CC.

Cervical cancer	<i>n</i>	Expression levels of Gal-4 (lum)		<i>p</i> value
		Median	Range	
<b>Histological type</b>				
Squamous carcinoma	23	72.216	4.129-151.793	Squamous carcinoma vs. adenocarcinoma 0.3272
Adenocarcinoma	5	61.985	11.779-90.595	
Adenosquamous carcinoma	1	22.053	NA	
<b>Differentiation</b>				
Poor	2	80.560	NA	Poor vs. moderate 0.6403
Moderate	21	71.028	4.129-151.793	
Well	1	90.575	NA	
No reported	5			
<b>Keratinizing</b>				
No	16	62.226	4.129-129.247	0.0318
Yes	5	102.896	55.008-110.984	
Not reported	8			
<b>FIGO staging</b>				
I-II	16	57.434	4.129-151.793	0.1868
III-IV	9	78.020	19.747-120.247	
Not classifiable	4			
<b>Tumor size (cm<sup>2</sup>)</b>				
≤5.1	9	61.985	4.129-90.575	0.7197
>5.1	10	62.115	9.532-77.060	
No size	10			

<sup>a</sup>*p* values were calculated using Mann–Whitney test.

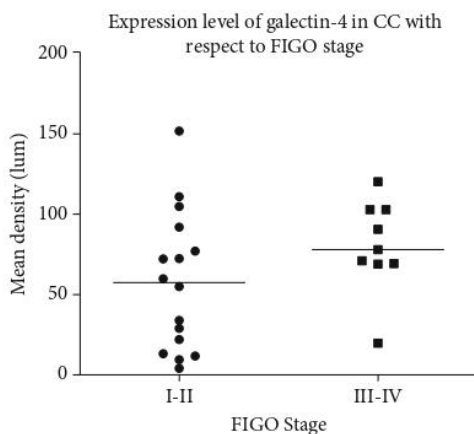


FIGURE 6: Tissue expression of galectin-4 with respect to FIGO stage. The expression of galectin-4 in tumors of patients with FIGO stages I/II (circle, *n* = 16) and III/IV (square, *n* = 9) is shown. The lowest galectin-4 levels were observed in FIGO stages I and II, and FIGO stages III and IV presented a trend of higher levels than FIGO stages I and II. The mean density of the expression level of galectin-4 was calculated with Image-Pro. The Mann–Whitney analysis did not show significant differences (*p* = 0.1868).

transformation, increased expression of sialic acid has been reported according to the transformation grade [40, 41]. Increased sialic acid in CC tissue can participate in the trans-

location of galectin-4 to the nucleus. The expression analysis of galectin-4 showed a significant difference between keratinizing and nonkeratinizing tumors, and the keratinizing tumors presented increased staining. The Cancer Genome Atlas Research Network reported a molecular characterization of CC tumors. The results showed three CC clusters: the keratin-high group, which presents a high expression of genes related to the keratin family; the keratin-low group, which presents low expression of keratin family genes; and the adenocarcinoma-rich group. These classifications show that it is possible to identify different subtypes of CC according to gene expression patterns [42]. In our results, we detected increased expression of galectin-4 in keratinizing tumors compared with nonkeratinizing tumors, suggesting that the galectin-4 gene could be part of the cluster of genes with high expression and play a role in this molecular subtype. To confirm this possibility, more studies are necessary. It has been reported that patients with the keratinizing type of SCC have advanced stages (III-IV) of disease; in addition, stage IV disease is also related with a worse survival rate, suggesting that keratinization status is an independent predictor of survival [43].

These results highlight the importance of considering molecular subtypes in the prognosis of CC and for designing targeted therapies.

The role of galectin-4 in CC tissue is still unknown, and the nuclear galectin-4 function in cancer progression must be investigated.

## 5. Conclusions

The higher serum levels of galectin-4 in the CC patients than in patients without disease and the trend of higher concentration in the patients with advanced clinical stage suggest that galectin-4, like other galectins, could participate in migration and metastasis.

Galectin-4 is expressed in cervical columnar and normal squamous epithelium and in stromal cells. In the normal tissue, the expression of galectin-4 was detected in the cytoplasm; in the samples from SCC and adenocarcinoma tumors, the expression was observed in nuclei, suggesting that the localization change could be related to cell transformation. The increased expression of galectin-4 in keratinizing tumors compared with nonkeratinizing tumors suggests that this gene could be part of the cluster of genes related to this CC subtype and could be related to worse prognosis.

## Data Availability

The data analysed herein are included in the text.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgments

This work was supported by the Fondo de Investigación en Salud, IMSS (grant number FIS/IMSS/PROT/G17-2/1760) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Infraestructura (grant number 300379). ICR received a scholarship from the Mexican Institute of Social Security (98227566) and CONACYT (553529).

## References

- [1] I A f R i Cancer, "Top cancer per country, estimated number of deaths in 2018, females, all ages," 2018, [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=484&key=total&sex=2&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&projection=natural-earth&color\\_palette=default&map\\_scale=quantile&map\\_nb\\_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=484&key=total&sex=2&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D).
- [2] N. Bhatla, J. S. Berek, M. Cuello Fredes et al., "Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri," *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, vol. 145, no. 1, pp. 129–135, 2019.
- [3] E. Yunes-Diaz, P. A. Ruiz, and E. Lazcano-Ponce, "Assessment of the validity and reproducibility of the Pap smear in Mexico: necessity of a paradigm shift," *Archives of Medical Research*, vol. 46, no. 4, pp. 310–316, 2015.
- [4] R. D. Cummings, F.-T. Liu, and G. R. Vasta, "Galectins," in *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition, 2017.
- [5] H. Zhang, M. Luo, X. Liang et al., "Galectin-3 as a marker and potential therapeutic target in breast cancer," *PloS One*, vol. 9, no. 9, article e103482, 2014.
- [6] Z. Cai, Y. Zeng, B. Xu et al., "Galectin-4 serves as a prognostic biomarker for the early recurrence / metastasis of hepatocellular carcinoma," *Cancer Science*, vol. 105, no. 11, pp. 1510–1517, 2014.
- [7] J. Li, E. Vasilyeva, and S. M. Wiseman, "Beyond immunohistochemistry and immunocytochemistry: a current perspective on galectin-3 and thyroid cancer," *Expert review of Anticancer Therapy*, vol. 19, no. 12, pp. 1017–1027, 2019.
- [8] C. Capalbo, G. Scafetta, M. Filetti, P. Marchetti, and A. Bartolazzi, "Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy: the galectin-3 signature in NSCLCs," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 7, p. 1607, 2019.
- [9] K. M. Rumilla, L. A. Erickson, A. K. Erickson, and R. V. Lloyd, "Galectin-4 expression in carcinoid tumors," *Endocrine Pathology*, vol. 17, no. 3, pp. 243–250, 2006.
- [10] Y. Honjo, H. Inohara, S. Akahani et al., "Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 6, no. 12, pp. 4635–4640, 2000.
- [11] A. Mathieu, I. Saal, A. Vuckovic et al., "Nuclear galectin-3 expression is an independent predictive factor of recurrence for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung," *Modern Pathology*, vol. 18, no. 9, pp. 1264–1271, 2005.
- [12] X. Zhu, M. Ding, M. L. Yu, M. X. Feng, L. J. Tan, and F. K. Zhao, "Identification of galectin-7 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma by proteomic analysis," *BMC Cancer*, vol. 10, no. 1, p. 290, 2010.
- [13] S. F. Dagher, J. L. Wang, and R. J. Patterson, "Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 4, pp. 1213–1217, 1995.
- [14] P. J. Davidson, M. J. Davis, R. J. Patterson, M. A. Ripoché, F. Poirier, and J. L. Wang, "Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm," *Glycobiology*, vol. 12, no. 5, pp. 329–337, 2002.
- [15] M. Maftouh, A. I. Belo, A. Avan et al., "Galectin-4 expression is associated with reduced lymph node metastasis and modulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in pancreatic adenocarcinoma," *Oncotarget*, vol. 5, no. 14, pp. 5335–5349, 2014.
- [16] A. Arnaou and L. Ibrahim, "Serum galectin-4 (Gal-4) in patients with gastric adenocarcinoma: active player in the field," *International Journal of Advanced Research*, vol. 5, no. 2, pp. 1162–1167, 2017.
- [17] N. Kocevar, S. F. Grazio, and R. Komel, "Two-dimensional gel electrophoresis of gastric tissue in an alkaline pH range," *Proteomics*, vol. 14, no. 2-3, pp. 311–321, 2014.
- [18] H. Barrow, X. Guo, H. H. Wandall et al., "Serum galectin-2, -4, and -8 are greatly increased in colon and breast cancer patients and promote cancer cell adhesion to blood vascular endothelium," *Clinical Cancer Research*, vol. 17, no. 22, pp. 7035–7046, 2011.
- [19] T. Hayashi, T. Saito, T. Fujimura et al., "Galectin-4, a novel predictor for lymph node metastasis in lung adenocarcinoma," *PloS One*, vol. 8, no. 12, article e81883, 2013.
- [20] A. I. Belo, A. M. van der Sar, B. Tefsen, and I. van Die, "Galectin-4 reduces migration and metastasis formation of pancreatic cancer cells," *PloS One*, vol. 8, no. 6, article e65957, 2013.

- [21] S. W. Kim, K. C. Park, S. M. Jeon et al., "Abrogation of galectin-4 expression promotes tumorigenesis in colorectal cancer," *Cellular Oncology (Dordrecht)*, vol. 36, no. 2, pp. 169–178, 2013.
- [22] A. R. Al-Derzi, H. H. Al-Ammiri, and N. Ghanim, "Validity of serum galectin-4(Gal-4) in diagnosis of gastric adenocarcinoma," *Journal of the Faculty of Medicine-Baghdad*, vol. 57, no. 3, pp. 236–240, 2015.
- [23] H. Barrow, J. M. Rhodes, and L. G. Yu, "Simultaneous determination of serum galectin-3 and -4 levels detects metastases in colorectal cancer patients," *Cellular Oncology (Dordrecht)*, vol. 36, no. 1, pp. 9–13, 2013.
- [24] I. Iurisci, N. Tinari, C. Natoli, D. Angelucci, E. Cianchetti, and S. Iacobelli, "Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients," *Clinical Cancer Research*, vol. 6, no. 4, pp. 1389–1393, 2000.
- [25] C. Chen, C. A. Duckworth, B. Fu, D. M. Pritchard, J. M. Rhodes, and L. G. Yu, "Circulating galectins -2, -4 and -8 in cancer patients make important contributions to the increased circulation of several cytokines and chemokines that promote angiogenesis and metastasis," *British Journal of Cancer*, vol. 110, no. 3, pp. 741–752, 2014.
- [26] M. Sakaki, N. Oka, R. Nakanishi, K. Yamaguchi, T. Fukumori, and H. O. Kanayama, "Serum level of galectin-3 in human bladder cancer," *The Journal of Medical Investigation*, vol. 55, no. 1,2, pp. 127–132, 2008.
- [27] P. Vereecken, A. Awada, S. Suci et al., "Evaluation of the prognostic significance of serum galectin-3 in American Joint Committee on Cancer stage III and stage IV melanoma patients," *Melanoma Research*, vol. 19, no. 5, pp. 316–320, 2009.
- [28] L.-G. Yu, N. Andrews, Q. Zhao et al., "Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 1, pp. 773–781, 2007.
- [29] K. L. Wu, E. Y. Huang, W. L. Yeh, C. C. Hsiao, and C. M. Kuo, "Synergistic interaction between galectin-3 and carcinoembryonic antigen promotes colorectal cancer metastasis," *Oncotarget*, vol. 8, no. 37, pp. 61935–61943, 2017.
- [30] Q. Zhao, X. Guo, G. B. Nash et al., "Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface," *Cancer Research*, vol. 69, no. 17, pp. 6799–6806, 2009.
- [31] R. Bhat, B. Belardi, H. Mori et al., "Nuclear repartitioning of galectin-1 by an extracellular glycan switch regulates mammary morphogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, no. 33, pp. E4820–E4827, 2016.
- [32] T. C. Shih, R. Liu, C. T. Wu et al., "Targeting galectin-1 impairs castration-resistant prostate cancer progression and invasion," *Clinical Cancer Research*, vol. 24, no. 17, pp. 4319–4331, 2018.
- [33] F. Wehrhan, M. Büttner-Herold, L. Distel et al., "Galectin 3 expression in regional lymph nodes and lymph node metastases of oral squamous cell carcinomas," *BMC Cancer*, vol. 18, no. 1, p. 823, 2018.
- [34] Y. Kataoka, T. Igarashi, Y. Ohshio, T. Fujita, and J. Hanaoka, "Predictive importance of galectin-3 for recurrence of non-small cell lung cancer," *General Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 67, no. 8, pp. 704–711, 2019.
- [35] J. Gao, X. Qiu, X. Li et al., "Expression profiles and clinical value of plasma exosomal Tim-3 and galectin-9 in non-small cell lung cancer," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 498, no. 3, pp. 409–415, 2018.
- [36] K. Wang, Z. Chen, R. Wu, J. Yin, M. Fan, and X. Xu, "Prognostic role of high Gal-9 expression in solid tumours: a meta-analysis," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 45, no. 3, pp. 993–1002, 2018.
- [37] T. Liang, X. Wang, F. Wang, E. Feng, and G. You, "Galectin-9: a predictive biomarker negatively regulating immune response in glioma patients," *World Neurosurgery*, vol. 132, pp. e455–e462, 2019.
- [38] M. E. Huflejt and H. Leffler, "Galectin-4 in normal tissues and cancer," *Glycoconjugate Journal*, vol. 20, no. 4, pp. 247–255, 2004.
- [39] D. Hu, D. Ansari, Q. Zhou, A. Sasor, K. Said Hilmersson, and R. Andersson, "Galectin 4 is a biomarker for early recurrence and death after surgical resection for pancreatic ductal adenocarcinoma," *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 54, no. 1, pp. 95–100, 2019.
- [40] D. Lopez-Morales, J. Reyes-Leyva, G. Santos-Lopez, E. Zenteno, and V. Vallejo-Ruiz, "Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions," *Diagnostic Pathology*, vol. 5, no. 1, p. 74, 2010.
- [41] A. Roy and S. Chakraborty, "Detection of cancer cervix by estimation of sialic acid," *Journal of the Indian Medical Association*, vol. 103, no. 11, pp. 589–590, 2005.
- [42] The Cancer Genome Atlas Research Network, "Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer," *Nature*, vol. 543, no. 7645, pp. 378–384, 2017.
- [43] S. Kumar, J. P. Shah, C. S. Bryant et al., "Prognostic significance of keratinization in squamous cell cancer of uterine cervix: a population based study," *Archives of Gynecology and Obstetrics*, vol. 280, no. 1, pp. 25–32, 2009.

EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
Otorga la presente

# CONSTANCIA

Al trabajo de investigación

EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GALECTINA 4 EN PACIENTES CON CÁNCER CERVICOUTERINO

Autor(es): Conde-Rodríguez Ileana, Martínez-Acosta Liliana Guadalupe, Bayran-Flores Jorge, Toxtle-Guevara Juan José, Lopez-Y Lopez Gustavo, Reyes-Leyva Julio, Vallejo-Ruiz Verónica.

Santiago de Querétaro, Querétaro, del 7 al 9 de junio del 2017.

“Salud Mental, un reto para la investigación en el siglo XXI”

Lic. Manuel Alejandro Ruíz López

Delegado Estatal, Querétaro  
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Jesús Javier Magallanes Camacho

Jefe de Servicios de Prestaciones Médicas  
Delegación Querétaro, Instituto Mexicano del Seguro Social





**The Latin American Society of Glycobiology and the Cell Dynamics Research Center of the Morelos State Autonomous University give the present**



**CERTIFICATE OF PARTICIPATION TO:**

Conde-Rodríguez I., Galindo-Herrera J., Reyes-Salinas J. S., Vázquez-Zamora V. J., Ceja-Utrera F. J., López-Colombo A., Martínez-Acosta L. G., Toxtle-Guevara J. J., Martínez-Morales L.P., López-López J. G., Santos-López G., Reyes-Leyva J., Vallejo-Ruiz V.

**For the poster presentation:**

EVALUATION OF GALECTIN-4 CONCENTRATION IN SERUM OF PATIENTS WITH PREMALIGNANT INJURIES AND CERVICAL CANCER

Presented in the 4th Latin American Congress of Glycobiology held on October 4-7, 2017 in Mexico City, Mexico.

Iván Martínez Duncker  
President of the Latin American Society for Glycobiology  
Head of the Glycoscience in Health Thematic  
Network CONACYT

Juana Elizabeth  
Reyes Martínez  
Organizing committee

Yobana Pérez Cervera  
Organizing committee

Ismael Secundino  
Velazquez  
Organizing committee



El Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer  
otorga la presente

**CONSTANCIA A:**

**ILEANA CONDE RODRIGUEZ**

---

Nº Miembro 271454

Por la exposición del Cartel:

Evaluación De La Concentración De Galectina-4 En Suero De Pacientes Con  
Lesiones Premalignas Y Cáncer Cervicouterino

---

En la 4ta Reunión Anual del Colegio Mexicano para Investigación del Cáncer  
realizado en la H. Puebla de Zaragoza del 7 al 10 de Octubre del 2017

---

**Abelardo Meneses García**  
Director General del Instituto  
Nacional de Cancerología

---

**Rosendo Briones Rojas**  
Director del Hospital Universitario  
de Puebla, BUAP

**BUAP**

**C·M·i·C**  
COLEGIO MEXICANO PARA LA  
INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER



Instituto Nacional  
de Cancerología

EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
Otorga la presente

# CONSTANCIA

**Al trabajo de investigación**

**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GALECTINA-4 EN SUERO DE PACIENTES CON LESIONES PREMALIGNAS Y CÁNCER CÉRVICOUTERINO**

Autor(es): Conde-Rodríguez Ileana, Galindo-Herrera Jhovanna, Reyes-Salinas Juan Salvador, Vázquez-Zamora Víctor Javier, Ceja-Utrera Francisco Javier, López-Colombo Aurelio, Martínez-Acosta Liliana Guadalupe, Toxtle-Guevara Juan José, Martínez-Morales Laura Patricia, López-y López José Gustavo, Santos-López Gerardo, Reyes-Leyva Julio, Vallejo-Ruiz Verónica.

San Luis Potosí, San Luis Potosí, del 24 al 27 de octubre de 2017

314

*“Prevención, una prioridad de la investigación en salud”*

**Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez**

Coordinador de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social



MÉXICO  
GOBIERNO DE LA REPÚBLICA



EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
Otorga la presente  
**CONSTANCIA**

**Al trabajo de investigación**

**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GALECTINA-4 SÉRICA EN PACIENTES CON LESIONES PREMALIGNAS Y CÁNCER CERVICOUTERINO**

Autor(es): Conde-Rodriguez Ileana, Robles-Sánchez Viridiana, Galindo-Herrera Jhovanna, Vázquez-Zamora Víctor Javier, Ceja-Utrera Francisco Javier, López-Colombo Aurelio, Martínez-Acosta Liliana Guadalupe, Toxtle-Guevara Juan José, Martínez-Morales Laura Patricia, Reyes-Leyva Julio, López y-López José Gustavo, Vallejo-Ruiz Verónica.

Tlalnepantla de Baz, Estado de México. 25, 26 y 27 de Julio de 2018.

LA INVESTIGACIÓN EN SALUD EN ENFERMEDADES CRÓNICAS DEL ADULTO JOVEN: DE LO PREVALENTE A LO PREVENIBLE.

**L.A.E. Fernando Luis Olimón Meraz.**

Titular de la Delegación Regional Estado de México Oriente.  
Instituto Mexicano del Seguro Social.

**Dr. Leopoldo Santillán Arreygue.**

Titular de la Jefatura de Servicios de Prestaciones Médicas.  
Instituto Mexicano del Seguro Social.

EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Otorga la presente

# CONSTANCIA

Al trabajo de investigación

EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GALECTINA-4 EN SUERO DE PACIENTES CON  
CÁNCER CERVICOUTERINO

Autor(es): Conde-Rodríguez Ileana, Robles-Sánchez Viridiana, Galindo-Herrera Jhovanna, Reyes-Salinas Juan Salvador, Vázquez-Zamora Victor Javier, Ceja-Utrera Francisco Javier, López-Colombo Aurelio Martínez, Martínez-Acosta Liliana Guadalupe, Toxtle-Guevara Juan José, Martínez-Morales Laura Patricia, Reyes-Leyva Julio, López y-López José Gustavo, Vallejo-Ruiz Verónica.

252

  
Dr. Hugo García Aranda

Jefe de los Servicios de Prestaciones Médicas  
Delegación Zacatecas

  
Lic. Rafael Estrada Cabral

Delegado Estatal. Delegación Zacatecas.  
Instituto Mexicano del Seguro Social

  
Dr. Francisco Luna Pacheco. MSP

Coordinador del Área de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma de Zacatecas

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
JEFATURA DE SERVICIOS DE PRESTACIONES MEDICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y EDUCACION DE FORMACIÓN DOCENTE.  
UNIDADES MEDICAS DE LA DELEGACIÓN PUEBLA

XXVIII Jornadas de Educación e Investigación para Médicos Residentes  
“ Dr. Juan Augusto Rafael Larrauri Rodríguez”



Otorga la presente




## CONSTANCIA

**A:** Conde Rodríguez Ileana, Viridiana Robles Sánchez, Galindo-Herrera  
Jhovanna, Vázquez-Zamora Victor Javier, Ceja-Utrera Francisco Javier, López-  
Colombo Aurelio, Acosta Liliana Guadalupe, Toxtle Guevara Juan José,  
Martínez Morales Laura Patricia, López y López José Gustavo, Vallejo Ruiz  
Verónica

Por la presentación del trabajo de investigación modalidad cartel:  
“EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GALECTINA-4 EN SUERO DE PACIENTES CON  
LESIONES PREMALIGNAS Y CÁNCER CERVICOUTERINO”

Puebla, Puebla a 24 y 25 de Enero del 2019

  
Dra. Luz Karina Ramírez Dueñas  
Directora del CIEFD

  
Dra. Juan Augusto R. Larrauri Rodríguez  
Fundador de las Jornadas de investigación

  
Dr. Jorge Martínez Torres  
Jefe de Prestaciones Medicas

EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
Otorga la presente  
**CONSTANCIA**

**Al trabajo de investigación**

**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GALECTINA-4 EN SUERO DE PACIENTES CON LESIONES PREMALIGNAS Y CÁNCER CERVICOUTERINO.**

**Autor(es): Conde-Rodríguez Ileana, Robles-Sánchez Viridiana, Galindo-Herrera Jhovanna, Reyes-Salinas Salvador, Vázquez-Zamora Victor Javier, Ceja-Utrera Francisco Javier, López-Colombo Aurelio, Martínez-Acosta Liliana Guadalupe, Toxtle-Guevara Juan José, Martínez-Morales Laura Patricia, Reyes Leyva-Leyva Julio, López-y López José Gustavo, Vallejo-Ruiz Verónica.**

**Dr. Pedro Armando Marín Campos**  
Titular de la Delegación Estatal en Yucatán  
Instituto Mexicano del Seguro Social

**Dr. César Raúl González Bonilla**  
Titular de la Coordinación de Investigación en Salud  
Instituto Mexicano del Seguro Social

**Dr. Luis Alberto Méndez Trujeque**  
Director de la Escuela de Ciencias de la Salud  
Universidad Marista de Mérida

The Latin American Society of Glycobiology and the Cell Dynamics Research Center of the Morelos State Autonomous University

**CERTIFICATE OF ATTENDANCE**

We hereby certify that:

Conde-Rodríguez I., Armenta-Castro E. R., Ramírez-Díaz I., Robles-Sánchez V., Galindo-Herrera J., Vázquez-Zamora V. J., Ceja-Utrera F. J., López-Colombo A., Gutierrez-Quiroz C.T., Martínez-Acosta L.G., Toxtle-Guevara J. J., Delgado-López G., Reyes-Leyva J.R., López-y-López J.G., Vallejo-Ruiz V.

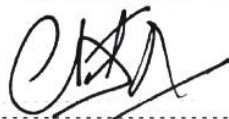
Presented the poster:

Evaluation of galectin-4 in serum and tissue of patients with premalignant lesions and cervical cancer.

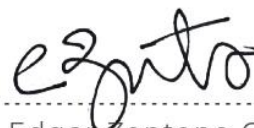
At the 5<sup>th</sup> Latin American Congress of Glycobiology and 2<sup>nd</sup> Meeting of the Glycoscience in Health Thematic Network held on October 2-4, 2019 in Mexico City, Mexico.



Iván Martínez Duncker R.  
President of the Latin American Society for Glycobiology  
Head of the Glycoscience in Health Thematic Network CONACYT



Carla Asteggiano  
Organizing committee



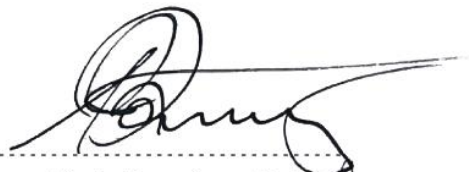
Edgar Zenteno Galindo  
Organizing committee



Héctor Mora Montes  
Organizing committee



Roberta Salinas Marín  
Organizing committee



Tonatíuh Ramírez Reivich  
Organizing committee



Verónica Vallejo Ruiz  
Organizing committee