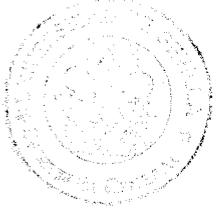


R.17.757



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
en el año 1990 número 90 del libro  
de inscripciones. 27.516.389  
VILLA SEVILLA

El Jefe del Departamento de Tesis

*Fleora Laffitte*

T.D.  
R/89

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE MEDICINA

**"LOCALIZACION ULTRAESTRUCTURAL  
DE RESTOS AZUCARADOS EN LA SECRECION  
MUCOSA GASTRICA. APLICACION DE  
LECTINAS Y ORO COLOIDAL".**

**TESIS DOCTORAL**

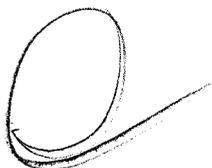


JUAN JOSE RIOS MARTIN

1990

UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA.  
DEPARTAMENTO DE CITOLOGIA E HISTOLOGIA NORMAL Y PATOLOGICA.

(Prof. Dr. HUGO GALERA DAVIDSON)



"LOCALIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE RESTOS AZUCARADOS  
EN LA SECRECION MUCOSA GASTRICA.  
APLICACION DE LECTINAS Y ORO COLOIDAL"

Tesis doctoral presentada por:

JUAN JOSE RIOS MARTIN

1990



Este trabajo ha sido subvencionado por  
la Junta de Andalucía: "Ayudas para la  
Consolidación de Grupos de Investigación  
y Desarrollo Tecnológico".

(541A-6-60-609.01-8311)



**DON FRANCISCO RIVERA HUETO, PROFESOR TITULAR DE ANATOMIA  
PATOLOGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA.**

**CERTIFICA:** Que bajo su dirección, y en el Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica, ha sido realizado el trabajo titulado "Localización ultraestructural de restos azucarados en la secreción mucosa gástrica. Aplicación de lectinas y oro coloidal" por Don Juan José Ríos Martín para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Sevilla a siete de Diciembre de mil novecientos noventa.



**FACULTAD DE MEDICINA  
DPTO. DE CITOLOGIA E HISTOLOGIA  
NORMAL Y PATOLOGICA**

**41009 SEVILLA**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "F. Rivera Hueto". The signature is fluid and cursive, written over the printed text of the faculty and department.

**AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. Hugo Galera Davidson, no sólo por haberme facilitado la realización de esta tesis doctoral, sino también porque mi formación como especialista se ha conducido bajo su orientación y consejo.

Deseo expresar un reconocimiento especial al Prof. Francisco Rivera Huetó por la eficaz dirección de este trabajo.

A los Dres. Enrique Rafel, Alberto Hevia y Ana Moreno por haberme aportado con paciencia sus conocimientos técnicos, y a Emilia y Remedios Ballesteros por su desinteresada colaboración en el trabajo de laboratorio.

Por último, también quiero agradecer a todo el personal del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario "Virgen Macarena" por las facilidades y ayudas prestadas en la recogida de material y datos.

## INDICE

	<u>Pág</u>
I. <u>INTRODUCCION.</u> .....	1
A. INTERES DEL ESTUDIO DE LA SECRECION MUCOSA DEL ESTOMAGO. ....	2
B. ULTRAESTRUCTURA GASTRICA.	
1. Mucosa normal. ....	4
2. Carcinoma gástrico. ....	15
C. GLUCOPROTEINAS.	
1. Definición, composición y clasificación. ...	22
2. Síntesis glucoproteica. ....	25
D. METODOS DE ESTUDIO DE LAS SECRECIONES GLUCOPROTEICAS.	
1. Métodos histoquímicos clásicos. ....	28
2. Lectinas. ....	29
3. Histoquímica ultraestructural con lectinas..	48
E. GLUCOPROTEINAS GASTRICAS. ....	60
1. Estudios bioquímicos del moco gástrico. ....	61
2. Estudios histoquímicos ópticos del moco gás- trico. ....	67
3. Estudios histoquímicos ultraestructurales del moco gástrico. ....	74
II. <u>PLANTEAMIENTO DEL TEMA.</u> .....	87
III. <u>MATERIAL Y METODOS.</u> .....	91
A. OBTENCION DEL MATERIAL. ....	92
B. FIJACION. ....	93
C. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS. ....	93
D. TECNICA HISTOQUIMICA ULTRAESTRUCTURAL. ....	95

IV. <u>RESULTADOS.</u> .....	99
A. METODOLOGIA.	
1. Fijación. ....	100
2. Incubación. ....	101
B. ESTUDIO HISTOQUIMICO.	
1. Mucosa gástrica normal. ....	103
2. Mucosa gástrica metaplásica. ....	106
3. Mucosa gástrica neoplásica. ....	107
V. <u>DISCUSION.</u> .....	110
A. METODOLOGIA. ....	111
B. GLUCOPROTEINAS GASTRICAS.	
1. Mucosa gástrica normal. ....	115
2. Mucosa gástrica metaplásica. ....	125
3. Mucosa gástrica neoplásica. ....	128
VI. <u>CONCLUSIONES.</u> .....	132
VII. <u>BIBLIOGRAFIA.</u> .....	135
VIII. <u>TABLAS Y FIGURAS.</u> .....	171

I. INTRODUCCION.

A. INTERES DEL ESTUDIO DE LA SECRECIÓN MUCOSA DEL ESTÓMAGO.

La secreción mucosa de las células epiteliales gástricas tiene, fundamentalmente, una función protectora y lubricante de la capa mucosa (1). Esta secreción está constituida por glucoproteínas (GP) que son moléculas formadas por una cadena polipeptídica unida covalentemente a hidratos de carbono (2). Su estructura tridimensional confiere al moco gástrico unas características físico-químicas relacionadas estrechamente con su función biológica. La capa de moco es un sistema dinámico y móvil que se destruye y forma constantemente, existiendo un equilibrio dinámico entre la formación y los agentes destructores, el pH ácido y la pepsina. Por lo tanto, cualquier alteración en la síntesis y composición de estas GP conducirá a un deterioro de su función biológica. Así, se han encontrado alteraciones en la composición de la secreción mucosa del estómago en diferentes situaciones patológicas, tales como ulcus duodenal, anemia perniciosa y carcinoma.

Los glicoconjugados, en general, se han relacionado, además de con los procesos secretorios celulares (3), con la diferenciación celular (4) y con la transformación maligna (5-7).

El estudio de las mucosustancias gástricas, en particular, ha sido objeto de numerosas investigaciones

(6, 8-12) habiéndose identificado múltiples variaciones en sus propiedades y distribución en las diferentes especies (13, 14). La principal atención se ha centrado en el componente carbohidratado por su relación, directa o indirecta, con procesos patológicos y con la carcinogénesis (1, 15-17).

Por tanto, el estudio de las alteraciones, cuantitativas y/o cualitativas, del moco gástrico, en patología tumoral y pretumoral, podría ser un marcador diagnóstico precoz del carcinoma gástrico en sujetos de alto riesgo.

La mayoría de los estudios sobre la estructura y composición de la secreción mucosa del estómago se han realizado desde el punto de vista bioquímico (18-23). En ellos se han constatado diferencias entre el moco del estómago normal y del patológico. Estas discrepancias también han sido observadas en trabajos histoquímicos a nivel de microscopía óptica mediante el uso de técnicas convencionales y lectinas (10-12). EL estudio de la distribución e identificación ultraestructural de las GP mucosas gástricas ha estado muy limitado por problemas metodológicos, ya que las lectinas son macromoléculas asimétricas y por tanto su penetración a través de las membranas celulares es escasa (25-26).

## B. ULTRAESTRUCTURA DE LA MUCOSA GASTRICA.

### 1. MUCOSA NORMAL

Los primeros estudios ultraestructurales del estómago se realizaron en animales (27-30). Lillibridge (31) es el primer autor que realiza un trabajo descriptivo de la mucosa gástrica humana correlacionando los hallazgos ópticos con los de microscopía electrónica.

En la mucosa gástrica se diferencian los siguientes tipos celulares:

- Mucosa superficial.
- Mucosa del cuello glandular.
- Célula indiferenciada.
- Parietal (oxíntica).
- Principal.
- Pilórica.
- Argentafín.

Las células epiteliales, en general, descansan sobre una lámina basal de 200-800 Å de grosor. Las superficiales lumbinales están tapizadas por microvillis de estructura similar a los observados por otros autores en el intestino (32). Los microvillis que tapizan las células parietales son de mayor tamaño y están presentes en mayor cantidad, siendo su forma y orientación más irregular que en los otros tipos celulares. Estas estructuras contienen un core filamentososo central. Los microvillis de

las células indiferenciadas, localizadas en el cuello, y de las células mucosas superficiales, poseen un glicocalix denso, mientras que los de las células parietales usualmente aparecen "desnudos", por lo que son fácilmente identificables.

En las porciones laterales de las células se advierten complejos de unión. Las "tight junctions" (zonulae occludens) e "intermediate junctions" (zonulae adherens) están siempre presentes, mientras que los desmosomas (macula-adherens) sólo en ocasiones. Rubin y Ross (33) observaron una estrecha relación lateral entre las células, advirtiendo numerosas interdigitaciones con un espacio intercelular aproximadamente de 200 Å. Algunas veces, este espacio aparece ensanchado, sobre todo basalmente, observándose procesos microvellositarios en su interior. Los espacios basales son generalmente estrechos, excepto en la células parietales donde estos autores (32) advirtieron numerosos procesos microvellositarios.

#### Célula Mucosa Superficial

Las células superficiales están dispuestas, como su nombre indica, en la superficie del estómago. A nivel de las criptas son altas, delgadas y en su membrana apical muestran microvellosidades cortas no muy numerosas. La base celular se apoya sobre una típica membrana

basal. En las membranas laterales existen complejos de unión apicales, desmosomas aislados e interdigitaciones a nivel basal (34). En el citoplasma predomina la presencia de gránulos mucosos ovoides, esféricos o alargados, que se disponen en la región supranuclear y central del citoplasma, desplazando las organelas lateral y basalmente. Están íntimamente adosados y rodeados por una membrana de cubierta. El diámetro oscila entre 0,7 y 1,3  $\mu$  y su aspecto es denso y moteado (31). Rubin y Ross (33), y posteriormente Krause (35), describieron numerosos gránulos, pequeños y oscuros, a menudo en paquetes, en las áreas basales, que contienen posiblemente glucógeno. El aparato de Golgi, localizado en la región supranuclear y a veces paranuclear, y el retículo endoplásmico rugoso (RER) son prominentes. Las mitocondrias muestran abundantes crestas y ocasionales gránulos densos en su interior.

El núcleo se sitúa en posición basal, es alargado según el eje mayor de la célula, la cromatina es laxa y contiene un nucleolo prominente.

#### Célula Mucosa del cuello

Estas células son muy similares a las mucosas superficiales, diferenciándose en el aspecto de los gránulos. Estos son de diámetro superior a 2  $\mu$  y presentan una densidad heterogénea. Son más prominentes en el citoplasma apical y supranuclear, aunque también son

observados en localización para e infranuclear. El aparato de Golgi es, así mismo, evidente. El RER generalmente forma numerosas hileras en relación con las mitocondrias. Estructuras de aspecto lisosómico pueden observarse pero no son tan prominentes como en las células principales o incluso las parietales.

#### Célula Indiferenciada

Johnson y Young, en 1968 (36), estudiando la mucosa gástrica humana y del perro, observaron una célula ultraestructuralmente diferente a las células mucosas descritas previamente. Estas células fueron interpretadas como elementos indiferenciados con una función de reserva. Son de tipo columnar bajo o cuboidal y se disponen en el fondo de las foveolas y en el cuello en relación con las células mucosas. Generalmente están en escaso número y en muchos casos son difíciles de encontrar. Rubin y Ros (33), tras observar formas intermedias, sugirieron que a partir de estas células se desarrollaban las superficiales, mucosas del cuello, parietales y pilóricas.

El borde apical, en este tipo celular, es estrecho comparándolo con el de las células adyacentes, y al igual que éstas también posee microvellosidades. En el citoplasma contienen pocos gránulos mucosos, densos y pequeños. Otros autores (37) denominaron a esta célula como "fibrilo caveolada" por la presencia de estos grán-



nulos. Existen numerosos ribosomas libres y polisomas y son menos manifiestas las mitocondrias y el RER. El aparato de Golgi es prominente y se localiza a nivel supra y, a veces, paranuclear. El núcleo suele ser grande, de aspecto multilobular y contiene un nucleolo evidente.

Estas células no han de ser confundidas con las también definidas como "indiferenciadas" por Newbold en 1988 (38). Estas son observadas en los pits ( ó crestas interfoveolares) y están relacionadas con la gastritis atrófica, particularmente en presencia de metaplasia intestinal incompleta (tipo 3).

#### Célula Parietal

Son las encargadas de la síntesis del ácido clorhídrico y del factor intrínseco. Se localizan a nivel del cuerpo y cuello glandular y generalmente están separadas del espacio luminal por las células principales, presentando sólo una pequeña zona apical libre en contacto con la luz. Su secreción se realiza por un sistema de canalículos intracelulares formados por invaginaciones de su superficie en el interior del citoplasma, a modo de una red de túbulos. Estas estructuras tubulovesiculares o canalículos poseen microvillis y están unidas entre sí. Se disponen en la zona periférica de la célula dejando una porción central donde se sitúa el núcleo. El aspecto

de los microvillis y el diámetro de los canalículos varían según el estado funcional de la célula. Algunos autores (39-42) piensan que cuando aparecen dilatados es indicativo de mayor secreción ácida; otros (43-46) piensan lo contrario. Lo que si parece más claro es que el número y longitud de los microvillis aumentan al hacerlo la función (40, 43).

En el citoplasma, alrededor del núcleo y en las proximidades de las membranas basal y lateral, es relevante la presencia de numerosas mitocondrias, activas y grandes, así como prominentes lisosomas densos en torno a los canalículos. El aparato de Golgi es escaso y rudimentario y difícilmente se advierte el sistema de sacos y cisternas. Rubin y Ross (33) observaron gránulos oscuros, interpretados como de glucógeno, y cuerpos densos mayores de 2  $\mu$  de diámetro, con figuras de mielina y sustancias amorfas y granulares en su interior, de variable densidad electrónica. Estos cuerpos probablemente representen derivados lisosómicos. Estos autores (33) también describieron cuerpos multivesiculares, ocasionales gotas de apariencia lipídica y pequeños gránulos densos rodeados de membrana de 0,1 a 0,2  $\mu$ .

El núcleo, que se sitúa centralmente, presenta una cromatina laxa. La membrana plasmática, en la base celular, se dispone formando múltiples repliegues paralelos a la membrana basal.

### Célula Principal

Estas células son las encargadas de la secreción de pepsina y pepsinógeno. Se localizan en el cuerpo y fondo glandular. Su ultraestructura es similar a la de otras células secretoras de zimógenos (47).

En la porción citoplásmica, basal y lateral al núcleo, existe un marcado RER. También es evidente el aparato de Golgi en la zona supranuclear. En el citoplasma apical se advierten numerosos gránulos de zimógeno de variable densidad de unas 2  $\mu$  de diámetro. Estos gránulos son bastante homogéneos especialmente al compararlos con los de las células mucosas. La superficie apical hace prominencia en la luz glandular y posee algunos microvillis finos. El núcleo se localiza en la zona basal y tiene nucleolo prominente.

### Célula Pilórica

Estas células recuerdan a las células mucosas superficiales del fundus y cuerpo del estómago (45). Los gránulos son más homogéneos, similares a los observados en las células principales.

### Célula Argentafín

Se localizan en la región del antro pilórico a nivel de los fondos glandulares. Son las encargadas de la síntesis de péptidos hormonales (gastrina, serotonina, catecolaminas, histamina ....).

No contactan con las luces glandulares, aunque se apoyan sobre la membrana basal. El núcleo es central, redondeado, a veces con escotaduras, y la cromatina está condensada.

En el citoplasma es evidente la presencia de gránulos de  $0,4 \mu$  de diámetro, densos y rodeados por una fina membrana. El RER y los ribosomas son escasos. El aparato de Golgi es prominente.

#### a. Ultraestructura del retículo endoplásmico y aparato de Golgi.

El retículo endoplásmico y aparato de Golgi son las organelas citoplásmicas que intervienen, fundamentalmente, en las síntesis de glucoproteínas.

#### Retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) es un sistema de membranas biológicas, con aspecto continuo o discontinuo, que constituye más de la mitad de la membrana total de

una célula. Aunque la membrana es muy tortuosa se cree que ésta forma una única lámina que rodea a un solo saco, o espacio interno, denominado "lumen del RE" o "espacio de los sáculos del RE" (48). La membrana del RE es continuación de la nuclear externa, por lo que el lumen y el interior del núcleo sólo están separados por la membrana nuclear interna.

En relación con el RE se encuentra el aparato de Golgi, separado del primero por dos membranas por lo que la intensa circulación macromolecular existente entre ambos necesita de vesículas de transporte.

El tamaño del RE varía con el grado de diferenciación celular, siendo generalmente más evidente al incrementarse la actividad de la célula.

En el RE se distinguen dos zonas funcionalmente distintas; el **RE Rugoso (RER)**, que está lleno de ribosomas en el lado citoplasmático de la membrana, y el **RE Liso (REL)** que carece de ribosomas. El RER está organizado en pilas de sacos aplanados denominados "sáculos", y el REL consiste en una red de finos túbulos. En la mayoría de las células, el REL no es nada más que una pequeña región del RER libre de ribosomas. Estas zonas también se conocen como RE de transición y representan la región especializada del RE a partir de la cual se forman las vesículas portadoras de las moléculas sintetizadas por el RER para el transporte intracelular.

Las proteínas son sintetizadas en los ribosomas unidos a la membrana y generalmente pasan, mediante un mecanismo denominado "descarga vectorial", a la lumen del RE (49). El término "descarga vectorial" hace referencia a un proceso activo, que siempre se realiza en la misma dirección. La mayoría de las proteínas que quedan "secuestradas" en el lumen, antes de ser segregadas o enviadas a otros lugares intracelulares, son glicosiladas. Por tanto, según algunos autores (50, 51), la glicosilación es una de las principales funciones de biosíntesis del RE.

#### Aparato de Golgi

Aunque actualmente la microscopía electrónica ha aclarado muchos conceptos acerca de esta organela, ha sido motivo de numerosas discusiones debido a su gran variabilidad en número, desarrollo, morfología, situación y estructura (52). Fue descrito por Golgi en 1898 (53) como "aparato reticular interno" por la morfología que adopta en las neuronas ganglionares y células de Purkinje del cerebelo.

Esta estructura varía según el tipo y situación funcional de la célula, siendo muy evidente en las células secretoras en actividad y en las neoplásicas. Se suele localizar en posición yuxtanclear y, en ocasiones,

en una escotadura que le forma el núcleo, y entre éste y el polo secretor celular.

Hoy se sabe que la organización del Golgi es compartimental (54). Está constituido por numerosos grupos de cisternas, de superficie lisa y rodeadas de membrana, generalmente de 2 a 15. Cada conjunto de estas cisternas, o sáculos aplanados, habitualmente en número de 6, forman lo que se conoce como dictiosoma. La pila de sacos aplanados aparece incurvada; la cara convexa se orienta hacia el RER y se denomina cara de formación, inmadura, o cis; la cóncava se orienta hacia el polo secretor y se llama cara de maduración o trans. El diámetro de las cisternas oscila entre 1 y 5  $\mu$ . Griffiths, en 1982 (55), demostró, mediante lectinas, que existe un compartimento intermedio entre los dos anteriores al que denominó cara medial. Posteriormente, Chicheportiche y cols. (56) demostraron la tricompartmentalidad mediante un anticuerpo monoclonal contra las proteínas del Golgi. Diferentes autores (55, 57), han confirmado que la organización compartimental del complejo de Golgi presenta una polaridad tanto topológica como funcional, desde la cara cis a la trans.

En estrecha relación con el sistema de cisternas se encuentran enjambres de pequeñas vesículas, unas denominadas secretorias y otras de transferencia o microvesículas. Las primeras, de 0,1 a 4  $\mu$  de diámetro, se originan de los bordes de los sáculos por gemación o

fragmentación, y se disponen sobre la cara trans. Las segundas, de 200 a 1000 Å, se disponen entre el RE y la cara cis, y se originan del RE de transición incorporándose a los sáculos de la cara de formación. Es posible, en algunos casos, que exista un cortocircuito en el transporte de algunas sustancias pasando directamente de las vesículas de transferencia a las de secreción.

De todo lo expuesto hasta ahora se deduce que el RER y el aparato de Golgi intervienen de manera asociada en múltiples procesos metabólicos. Probablemente, el aparato de Golgi sea el principal director de la circulación macromolecular, es decir, el lugar de divergencia de las rutas de transporte intracelular desde el RE (52, 58, 59). Además, la capacidad del complejo de Golgi para la maduración de las glicoproteínas y glicolípidos ha sido establecida por múltiples estudios autorradiográficos, enzimológicos y de fracciones celulares (59-64).

## 2. CARCINOMA GASTRICO

En 1951, Jarvi y Lauren (65) establecieron que muchos carcinomas gástricos tenían características morfológicas que se asemejaban a la mucosa intestinal, y concluyeron que al menos un 50% de estas neoplasias se originaban en una metaplasia intestinal del estómago. Cuadros histopatológicos de gastritis crónica con meta-

plasia intestinal son comúnmente encontrados adyacentes al tipo intestinal de carcinoma (32, 66-70).

Lauren, en 1965 (71), clasificó los adenocarcinomas gástricos, en un intento de relacionar los hallazgos patológicos con el pronóstico, en dos tipos:

- Adenocarcinoma tipo intestinal.
- Adenocarcinoma tipo difuso.

El primero fue encontrado con mayor frecuencia en varones y en paciente con mayor edad, siendo el pronóstico mejor que para el segundo. Estudios posteriores (72, 73) confirmaron estos hallazgos. Ming (73) denominó al carcinoma difuso como "infiltrativo" y Sugano (74) como "indiferenciado".

En las áreas de metaplasia intestinal existen células de morfología similar a las células intestinales, con presencia de microvellosidades, aparentemente bien organizadas, con numerosas vesículas intervellositarias (estructuras sólo observadas en la mucosa colónica). En los adenocarcinomas de tipo intestinal bien diferenciados se advierten formaciones glandulares con interdigitaciones entre las membranas de células adyacentes. El borde estriado está bien conformado pero las microvellosidades no están tan bien organizadas como en la metaplasia intestinal. También se observan vacuolas mucosas en las células tumorales con borde estriado. Las organelas citoplasmáticas no presentan ninguna alteración relevante. Ocasionalmente, pueden observarse gránulos mucosos

"empaquetados" que recuerdan a células caliciformes (66, 75).

Las células en "anillo de sello", observadas en el adenocarcinoma de tipo difuso, presentan una membrana celular lisa, sin microvellosidades. El núcleo aparece rechazado a un polo de la célula por las múltiples vacuolas mucosas, de 0,3 a 1,1  $\mu$  de diámetro. Las mitocondrias son de un tamaño mayor al habitual y se observan lisosomas. Estas células son similares a las caliciformes y otras a las de la región pilórica. Sasano y cols. (76) describieron la presencia de "canaliculus" en el interior de alguna de estas células, pero no los relacionaron con los descritos en las células parietales. Este hallazgo fue confirmado posteriormente por otros autores (77, 78) denominándolos "microquistes intracelulares". Realmente se trata de luces intracelulares, no conectadas con el exterior, pero tapizadas por microvellosidades. Kondo (77) no encontró estas estructuras en los carcinomas bien diferenciados y Nevalainen (78) los observó tanto en los de tipo intestinal como en los difusos. Este último autor describió también gránulos mucosos en el adenocarcinoma de tipo intestinal, como estructuras relativamente pequeñas, redondas y homogéneas, localizadas en la zona del Golgi y en el citoplasma apical. La pobre cohesión celular fue descrita en el tipo difuso coincidiendo con su descripción histológica habitual. En alguno de sus casos de este tipo difuso encontró diferenciación tubular con

microvellosidades bien definidas. Estos casos fueron clasificados como "formas intermedias" entre ambos tipos de adenocarcinomas.

Yamashiro y cols. (79) describieron una secuencia en la maduración de las células en anillo de sello del carcinoma difuso, designándolas de la A a la C. La célula A ( estadio inicial ) tiene un núcleo central, abundantes organelas y gránulos pequeños de alta densidad. La célula B tiene un núcleo excéntrico, escasas organelas y gránulos de mediano tamaño y moderada densidad, con "core" central. La célula C tiene un núcleo periférico, remanentes de organelas y abundantes gránulos mucosos de baja densidad. También observaron, en algunos casos, las "luces intracelulares" pero no les dieron importancia al ser observadas también en algunos casos del tipo intestinal. Las células A sólo se tiñen con el PAS, las B con el PAS y ocasionalmente con el Azul Alcian - PAS y las C exclusivamente con el Azul Alcian.

Johannessen, en 1980 (80), describió numerosas aberraciones estructurales en varias organelas, particularmente en las mitocondrias y RER. Entre ellas destacan la presencia de estructuras tubulares y concéntricas e inclusiones filamentosas, con estriaciones periódicas en las mitocondrias. En el RER observó inclusiones paracrystalinas. Así mismo describió las vesículas intermicrovellositarias, o "cuerpos cocoides", observados exclusivamente en el epitelio del colon y sólo en oca-

siones en la mucosa yeyunal. El patrón microvelloso fue advertido por este autor en los dos tipos de adenocarcinomas. Además, observó en las células en anillo de sello una superficie celular con ondulaciones complejas respetando las uniones desmosómicas con las células adyacentes. Así mismo, describió "desmosomas intracitoplasmáticos" y estructuras en "tennis racket" similares a las que existen en las células de Langherans.

Tatematsu y cols., en 1986 (81), mediante estudios bioquímicos y ultraestructurales, observaron una alta incidencia de células de tipo intestinal en carcinomas de células en anillo de sello. Esto sugirió a estos autores que dichas células se desarrollaron independientemente de la metaplasia intestinal en el interior de un carcinoma de tipo difuso, probablemente originado de mucosa gástrica no metaplásica. Sugihara y cols (82) diferencian 3 tipos de células en anillo de sello (superponibles a las descritas por Yamashiro (79)) : foveolar, glandular y tipo intestinal. Las células tipo foveolar poseen gránulos de moco, Azul Alcian negativos o débilmente positivos, similares a los observados en las células mucosas del epitelio superficial foveolar descritas por Lillibridge (31) y Rubin (33). Las células tipo glandular poseen gránulos mucosos reactivos con la Concanavalina A, similares a los existentes en las células glandulares del píloro y en las células del cuello. Las células tipo intestinal presentan gránulos mucosos

redondeados y repletos de un material pálido homogéneo, que se tiñe fuertemente con Azul Alcian. Estas células recuerdan a las intestinales descritas por otros autores (75, 83). En los tres tipos celulares observaron los "microquistes intracelulares" tapizados por microvellosidades.

Estos tres tipos celulares de Sugihara (82) están en relación con una estructura en 3 capas, frecuentemente observada en este tipo de carcinoma. Este mismo autor, en 1985 (84), demostró que las células pequeñas de la capa intermedia proliferan produciendo las células en anillo de la capa superior y las de la inferior. En los cánceres intramucosos de pequeño tamaño las células de tipo intestinal fueron raramente observadas, las de tipo foveolar se situaron en la superficie y las de tipo glandular en profundidad. La aparición de células de tipo intestinal pudieran representar un marcador del comienzo de la infiltración tumoral.

Fiocca y cols. (85) realizaron un estudio con técnicas histopatológicas convencionales, histoquímica de mucinas y microscopía electrónica, en 148 especímenes de carcinomas gástricos. Trataron de correlacionar las líneas de diferenciación tumoral con los patrones histológicos de crecimiento. Encontraron 4 tipos celulares, que fueron reconocidos en la mayoría de los casos, columnares intestinales más o menos diferenciadas, caliciformes, foveolares y mucopépticas. Las primeras fueron

frecuentemente observadas en los adenocarcinomas tubulares ; las caliciformes en los carcinomas mucosos ; las mucopépticas en los difusos invasivos de tipo desmoplásico y las foveolares en los difusos intramucosos de células en anillo de sello. Advirtieron una marcada tendencia a la diferenciación foveolar con reducción de la diferenciación mucopéptica en los carcinomas intramucosos en comparación con los invasivos. Los autores concluyeron que el tipo de diferenciación celular, que puede tener influencia en la historia natural del cáncer gástrico, se relaciona mejor con los subtipos tumorales que con los patrones usualmente reconocidos de intestinal y difuso.

## C. GLUCOPROTEINAS.

### 1. DEFINICION, COMPOSICION Y CLASIFICACION

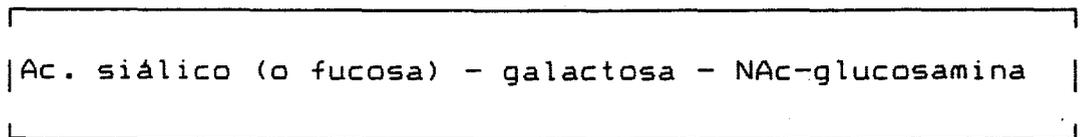
En los últimos años numerosos autores (2, 15, 18-23) se han dedicado al estudio de las glucoproteínas de las secreciones mucosas con objeto de conocer su composición y función. Actualmente, se conoce bastante bien la estructura, síntesis y metabolismo de estas complejas moléculas.

Las glucoproteínas (GP) son moléculas constituidas por una cadena polipeptídica unida covalentemente a hidratos de carbono (2). Cuando predomina el componente glucídico se denominan proteoglicanos. Estas proteínas conjugadas están representadas por muchas sustancias de gran importancia biológica, tales como enzimas, hormonas, anticuerpos, colágeno y membranas, además de formar parte de las secreciones mucosas. Los proteoglicanos, o glicosaminoglicanos, además de tener más cantidad de monosacáridos (generalmente más de 50 por 8-10 de las GP), se diferencian por su localización (esqueleto y tejidos adyacentes) y por tener una estructura disacárida que se repite y suele ser una cadena poco ramificada. En las GP, el componente carbohidratado puede ser desde menos del 1% hasta más del 80% del peso de la molécula, y está constituido por un grupo de azúcares característicos:

- D-galactosa (Gal).
- D-manosa (Man).
- D-glucosa (Glu).
- L-fucosa (Fuc).
- D-xilosa (Xil).
- N-acetil-D-glucosamina (NAc-Glc).
- N-acetil-D-galactosamina (NAc-Gal).
- Acidos siálicos (derivados del ácido neuramínico) (AcS).

Debido a que el peso molecular de las GP varía mucho de una a otra, el número de aminoácidos por unidad de carbohidrato es el mejor índice de la extensión de la hidrocarbonación de una proteína (15).

En general, la mayoría de las GP contienen sólo un tipo de unidad de carbohidrato siendo un esquema estructural muy común, que además se repite en muchas moléculas. Este esquema es el siguiente:



La NAc-Glc se vincula a un núcleo de Man y a residuos adicionales de ella misma. Según Spiro (15), las secreciones mucosas no contienen Man pero pueden contener NAc-Gal. Al principio del estudio de las GP se observó que aunque determinada unidad de carbohidrato tenga un esquema estructural básico, éste puede presentarse en

diferentes estadios de acabado o bien con modificaciones menores. Este fenómeno se ha denominado "microheterogeneidad" y se ha encontrado en casi todas las GP existentes (15).

Los grupos oligosacáridos de la mayor parte de las GP están ligados covalentemente a restos aminoácidos específicos de la cadena polipeptídica. Se han encontrado 3 tipos de uniones (86), aunque básicamente son sólo dos, a saber:

1.- Mediante un enlace Glucosilamina entre la N-acetil-D-glucosamina (NAc-Glc) del oligosacárido y el nitrógeno amídico de un resto de asparagina. Esta es la unión existente en la ovoalbumina y en las inmunoglobulinas (87). A las GP que presentan este enlace se las denomina "ligadas en -N".

2.- Mediante un puente O-Glucosídico entre la galactosa (Gal) y el grupo hidroxilo de la hidroxilisina. Este enlace es el existente en el colágeno (88).

3.- Mediante un enlace Glucosídico entre la N-acetil-D-galactosamina (NAc-Gal) (ó la xilosa) del oligosacárido y el grupo hidroxilo de un resto de serina ó treonina (88). También se denomina puente O-glucosídico y es el existente en las GP de las secreciones mucosas. A estas GP se las conoce como "ligadas en -O".

La mayoría de las GP contienen sólo un tipo de vinculación carbohidrato-péptido. Los oligosacáridos ligados en -O son generalmente más cortos y variados que las estructuras de los ligados en -N, y a menudo contienen sólo de 1 a 3 restos de azúcares.

## 2. SINTESIS GLUCOPROTEICA

Para estudiar la biosíntesis de estas moléculas es preciso definir la relación temporal entre la síntesis de sus componentes, es decir, de la parte péptica y de la azucarada. Así mismo debe de precisarse su localización intracelular.

Para muchos autores (87, 89, 90), la síntesis de los oligosacáridos ligados al nitrógeno de la asparagina parece realizarse fundamentalmente a nivel del retículo endoplásmico rugoso (RER), y sólo los últimos pasos de la maduración de la cadena carbohidratada se llevarían a cabo en el aparato de Golgi .

Existe mucha menos información sobre la síntesis de las cadenas unidas al grupo hidroxilo de la serina o treonina, así como de su tipología. Parece ser que la unión de la primera molécula de NAc-Gal, desde el nucleótido activado (UDP - NAc-Gal), no requiere un lípido intermedio como en el otro tipo de oligosacáridos (89, 91). Para algunos autores, el lugar de unión de la NAc-Gal son los microsomas lisos ("smooth microsomes") (89,

92), mientras que para Strous (93) ocurre en los ribosomas sobre la cadena polipeptídica nascente, lo que implica al RER como el inicio de este proceso.

Roth, en 1984 (90), aplicando lectinas marcadas con oro coloidal, concretamente *Helix pomatia* (HPA), encuentra un patrón de tinción que sugiere fuertemente que el aparato de Golgi es el lugar donde se añade el monosacárido NAc-Gal a la cadena proteica. Este estudio lo realiza en células caliciformes intestinales, obteniendo una tinción uniforme sobre las primeras cisternas del Golgi (cara cis) y sobre la última, en el duodeno, y las dos últimas (cara trans) en el colon. También encuentra NAc-Gal en las gotas mucosas maduras y no obtiene tinción sobre las cisternas de la región media del Golgi, ni en el RER. Este autor concluye que la terminación de las cadenas de O-oligosacáridos ocurre en las cisternas trans. Otras investigaciones apoyan esta hipótesis (94, 95).

No se conoce como llegan los azúcares al interior de la luz del Golgi para incorporarse a las GP, pero sí se sabe que se unen a la cadena a través de una secuencia específica, ya que el producto de la glicosilación de cada paso es reconocido como el sustrato para el enzima (transferasa) siguiente.

Con métodos autorradiográficos, Leblond y Bennett (96) demostraron que tras incubar Man tritiada ésta aparece incorporada en la célula exclusivamente a nivel



del RER. La NAc-Glc aparece tanto en el RER como en el Golgi. La Gal y AcS sólo se encuentran incorporados al Golgi. En estas mismas investigaciones demostraron que el tiempo de tránsito que necesita una proteína recién sintetizada para pasar del RE al Golgi es de 10 minutos y para "viajar" desde el Golgi hasta su destino final es de 30 a 60 minutos.

Las GP sintetizadas se concentran y almacenan en las vesículas secretoras (97). En la mayoría de las células las vesículas son continuación de los bordes dilatados de la cisterna "mas trans". En primer lugar se forman las vesículas de condensación que son vesículas inmaduras. Cuando el contenido de éstas se concentra es cuando a estas vesículas se las denomina secretoras. Las GP son secretadas por exocitosis, es decir, mediante fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática liberando el contenido al exterior. Esta fusión sólo se lleva a cabo en el polo apical (97).

## D. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LAS SECRECIONES GLUCOPROTEICAS.

### 1. METODOS HISTOQUIMICOS CLASICOS

El estudio histoquímico de las secreciones mucosas se centra en la porción carbohidratada, ya que la porción proteica es de difícil acceso. Clásicamente, se han empleado múltiples métodos para su identificación a nivel óptico, entre éstos cabe resaltar los siguientes:

1.- Reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS) (98): pone de manifiesto grupos hidroxilos vecinos, es decir, grupos aldehidos obtenidos por la oxidación con el peryodato.

2.- Método del Azul Alciano (AA) (99) : tiñe las GP ácidas. Utilizando un rango de pH desde 2,6 a 0,5 es posible diferenciar las sialomucinas de las sulfomucinas (100).

3.- Método de azul alciano - PAS (AA-PAS) (101) : para identificar a la vez mucosustancias neutras y ácidas.

4.- Técnicas de Diamina de alto contenido en hierro (HID) (102) : utilizado para identificar la presencia de sulfomucinas, pudiéndose realizar conjuntamente con el azul alcian - PAS a pH 2,7.

5.- Lectinas (103-106) : son sustancias con afinidad para determinados azúcares por lo que nos permiten el

estudio cualitativo de las cadenas carbohidratadas de las secreciones mucosas.

Los métodos empleados para el estudio de GP a nivel ultraestructural son en general una adaptación de los clásicamente utilizados en microscopía óptica (9, 13). Entre estos métodos existe un amplio grupo en el que se incluyen los de hierro dializado, ferritina cationizada, hierro coloidal, etc... que identifican radicales aniónicos (GP ácidas). El descrito por Thiery (107) pone de manifiesto grupos glicoles vecinos. También existen métodos que emplean técnicas autorradiográficas (108).

El empleo de lectinas a nivel ultraestructural será motivo del siguiente apartado, ya que son las sustancias utilizadas en este trabajo.

## 2. LECTINAS

### a. Antecedentes Históricos

Boyd, en 1963 (109) introdujo el término "lectina" (del latín "legere"= escoger, seleccionar) para definir a un tipo de sustancias que tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos y otros tipos celulares. Estas sustancias se encuentran, fundamentalmente, en las plantas leguminosas y por ello se las denomina también "Fito-hemaglutininas" o "Fitoaglutininas". También se han ais-

lado en animales por lo que estas denominaciones son incorrectas.

El "Comité Internacional de Nomenclatura de la Unión de Bioquímica" acordó aceptar la definición de Goldstein (110) según la cual son : "proteínas de origen no inmune, que se unen a carbohidratos y que producen aglutinación de células y/o precipitación de glicoconjugados". Esta capacidad reside en su afinidad por determinados azúcares, a través de al menos dos lugares de reconocimiento (106). En el caso de GP y glucolípidos se establece el enlace con los restos terminales no reducidos de las cadenas carbohidratadas mediante interacciones polares, no covalentes, sin alterar la estructura bioquímica de ninguno de ellos (103, 104).

El estudio de las lectinas fue iniciado por Stillmark en 1888 (111) al describir el proceso de hemaglutinación producido en algunos animales tras la ingesta de determinadas plantas, como la planta *Ricinus communis* (109). Posteriormente, se aisló otra sustancia hemaglutinante a partir de *Abrus precatorius* conocida como regaliz (103).

En 1908, Landsteiner y Raubitschek (103) introdujeron el concepto de "especificidad" al observar que el efecto aglutinante de estos extractos de plantas era diferente según el animal afectado. Postularon que esto dependería de los anticuerpos circulantes de cada animal. Sin embargo, no fue hasta 1940 cuando Renkonen y Boyd

(103) describieron que estas sustancias contenían aglutininas específicas para los grupos sanguíneos humanos.

La primera hemaglutinina estudiada fue la obtenida de la lima, o *Phaseolus limensis*, que aglutinaba los hematíes del grupo A y B. De la misma manera, se observaron efectos semejantes con *Vicia cracca*. Watkins y Morgan, en 1952 (103), demostraron que la aglutinación ocasionada por estas dos lectinas se inhibía con N-acetil-D-galactosamina. Así mismo, con  $\alpha$ -L-fucosa se inhibía la aglutinación de los hematíes del grupo H mediante la lectina *Lotus tetragonolobus*. Con estos hallazgos se confirmó que los determinantes antigénicos de los grupos A y H eran los azúcares citados previamente. Todos estos estudios se realizaron con extractos crudos de plantas. La primera lectina aislada en forma cristalina a partir de *Canavalina ensiformis* fue denominada *Concanavalina A* (103). El hecho de que cada una de las lectinas reaccionara específicamente con un grupo sanguíneo determinado, no sólo permitió el estudio de los componentes de sus determinantes antigénicos, sino también el conocimiento de la mayoría de los azúcares a los que eran afines. Sharon y Lis (103) recopilaron todos estos datos y describieron de forma conjunta las lectinas conocidas. Desde entonces, su empleo en la histoquímica de GP ha sido muy extenso para conocer los componentes glucídicos tisulares (6, 12, 25, 26, 112-116).

## b. Bioquímica y propiedades

Las lectinas son GP, a excepción de la **Concanavalina A**, de naturaleza no inmune, que tienen la capacidad de aglutinar células y macromoléculas ricas en componentes glucídicos (117). Sus propiedades químicas y físicas varían de una lectina a otra, pero entre sus características comunes se han descrito (118):

- El contenido en glúcidos oscila desde el 50% de la lectina extraída de la patata, hasta la **Concanavalina A** que no posee sacáridos en su composición. En la mayoría de estas sustancias existe Man, Glc y Gal, y en menor cantidad arabinosa y xilosa.
- Los aminoácidos encontrados en estas sustancias son el ácido aspártico, la serina y treonina. Los aminoácidos sulfurados presentan gran variabilidad, siendo muy abundante la cisteína en la lectina del germen del trigo, mientras que en la derivada del **Lotus tetragonolobus** no existe.
- Algunas lectinas poseen receptores para iones metálicos como el calcio y manganeso (103). Parece ser que su función es estabilizar los enlaces polares que se establecen entre éstas y sus receptores glucídicos.



Entre las propiedades biológicas de las lectinas cabe destacar las siguientes:

- Especificidad para grupos sanguíneos humanos. Así se pueden distinguir dos grandes grupos:

A.- Lectinas Inespecíficas.- aglutinan eritrocitos de todos los grupos sanguíneos. También se denominan Panaglutininas. Según Sharon y Lis (103), esta especificidad viene dada, o porque los glúcidos por los que tienen afinidad no forman parte de los determinantes antigénicos de los hematíes, o bien porque están presentes en todos los grupos. Dentro de este grupo se incluyen Ricinus comunis, Glycine max y Canavalina ensiformis.

B.- Lectinas Específicas.- aglutinan un determinado grupo sanguíneo y son las empleadas fundamentalmente en histoquímica.

- Toxicidad en animales.

- Capacidad mitógena.- algunas lectinas (Canavalina ensiformis, Lens culinaris ...) inducen la transformación de linfocitos maduros en linfoblastos (103). Por ello se emplean en genética para estimular las mitosis en los cultivos celulares.

- Aglutinación de células malignas en cultivos celulares. Esto sugiere que en la superficie de las células tumorales se deben producir algunos cambios estructurales que no ocurren en las células normales (119).

- Precipitación de polisacáridos y GP, así como afinidad por los azúcares. Las propiedades de aglutinación pueden ser inhibidas en la mayoría de los casos por azúcares, por lo que se concluyó que estas sustancias se unen específicamente a los carbohidratos de la superficie celular (104). Cada lectina puede interaccionar con más de un glúcido (120) pero la mayor "especificidad" es hacia aquél azúcar que inhiba la reacción de aglutinación a menor concentración.

La interacción entre las lectinas y los glúcidos está influenciada por diferentes factores tales como temperatura, pH, efectos de carga (carga de superficie), interacciones iónicas, afinidad de la lectina, capacidad de unión, modificaciones en el punto isoeléctrico de la lectina, características anoméricas del azúcar y la posición dentro de la cadena de carbohidratos (121). Además, interviene la presencia de otros azúcares vecinos al receptor denominados "secuencias sinérgicas", altamente reactivas, que refuerzan la unión de la lectina con el azúcar específico (122).

### c. Clasificación

La primera clasificación de las lectinas fue realizada por Makela en 1957 (103). Este autor las clasificó según la configuración del carbono 3 y 4 de los azúcares reaccionantes. Más tarde, se clasificaron según

la capacidad para aglutinar eritrocitos de los diferentes grupos sanguíneos, pero este enfoque no fue muy acertado debido a la existencia de lectinas inespecíficas.

Goldstein y Hayes, en 1978 (110), propusieron un sistema de nomenclatura estableciendo primero el origen de la lectina y después la especificidad de unión con el azúcar, y si es relevante, la preferencia anomérica. Esta clasificación fue ampliada, en 1984, por Gallagher (122) al valorar la influencia, sobre la reactividad de la lectina, de la posición del azúcar dentro de la cadena y los efectos de sinergia de los azúcares vecinos. De este modo, dividió a las lectinas en 2 grupos. En el primero la reactividad de la lectina va dirigida hacia un monosacárido constituyente de un oligosacárido complejo. Estas lectinas son frecuentemente inhibidas por concentraciones bajas de los azúcares libres reaccionantes. En el segundo grupo incluye a las lectinas que reaccionan con secuencias carbohidratadas específicas y los azúcares individuales de la cadena no juegan un papel predominante en el proceso de unión. Existe un tercer grupo, propuesto por A. Moreno en su tesis doctoral (123), y no incluido en la clasificación referida previamente (122), que incluye a las lectinas que interaccionan con el ácido siálico y la N-acetil-glucosamina (*Limulus polyphemus*, *Limax flavus* y *Griffonia simplicifolia*).

Las lectinas incluidas en el grupo I de Gallagher se denominan Exolectinas, ya que se unen a azúcares terminales. Estas pueden subdividirse en :

1.- Exolectinas Obligadas.- sólo reconocen monosacáridos terminales. Entre ellas se incluyen:

- *Dolichos biflorus* (DBA)
- *Ulex europaeus* I (UEA-I)
- *Arachis hypogaea* (PNA)
- *Helix pomatia* (HPA)

2.- Exolectinas Facultativas.- reaccionan con azúcares terminales e internos de la cadena. Entre ellas se encuentran:

- *Concanavalina ensiformis* (Con A)
- *Ricinus comunis* (RCA)

Las lectinas incluidas en el grupo II de Gallagher se denominan Endolectinas ya que reconocen uno o más azúcares internos. A su vez se subdividen en :

1.- Endolectinas Homotípicas.- reconocen oligosacáridos constituidos por secuencias del mismo azúcar. Aquí se incluye la lectina del *Triticum vulgare* (WGA).

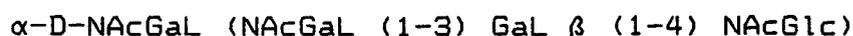
2.- Endolectinas Heterotípicas.- reaccionan con oligosacáridos constituidos por distintos monosacáridos.

Aquí se incluyen la lectina del *Phaseolus vulgaris* y *Sophora japónica*.

Para Damjanov (106), la clasificación de las lectinas se basa en la unión a carbohidratos específicos, independientemente de su origen heterogéneo. Propone una clasificación en 5 grupos según su preferencia en la unión a azúcares: grupo de la glucosa/manosa, grupo de la N-acetil-glucosamina, grupo de la galactosa/N-acetil-galactosamina, grupo de la  $\alpha$ -L-fucosa y grupo del ácido siálico.

A continuación se describen las principales características de las 5 lectinas utilizadas en este trabajo:

Dolichos biflorus (DBA).- Es una glucoproteína de un peso molecular de 140.000, formada por cuatro subunidades de dos tipos diferentes (A y B). Posee la capacidad de aglutinar los hematíes del grupo A (124,125) y los antígenos Tn (126). Se acopla específicamente a la N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina, localizada en el extremo no reductor de la cadena, reacción que es inhibida por el mismo monosacárido. Esta unión es favorecida por la siguiente secuencia sinérgica:



2

|

1

 $\alpha\text{-L-Fucosa}$ 

Según describieron Etzler y cols. (127), el centro activado para unirse con el azúcar se localiza en las subunidades del tipo A.

**Glycine max** (SBA).- Esta sustancia se aísla de la soja y muestra un peso molecular de 110.000. Está formada de un 5% de carbohidratos (D-NAc-Glc y D-Man) y por cuatro subunidades idénticas de un peso molecular de 30.000 cada una (128). Precipita con el grupo sanguíneo A y con los antígenos Le, y además muestra una gran afinidad por los terminales de N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina, N-acetil- $\beta$ -D-galactosamina y  $\beta$ - galactosa, en este mismo orden de preferencia (129). Los azúcares que inhiben estas interacciones complementarias son la N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina y la  $\beta$ -D-galactosa.

**Arachis hipogea** (PNA).- Proteína extraída del cacahuate, con un peso molecular de 100.000, formada por cuatro protómeros idénticos de 27.000 de peso molecular aproximado cada uno (130). Presenta gran especificidad hacia el disacárido  $\beta$ -D-Galactosa (1-3) N-acetil-galacto-

samina, y más débilmente por los restos  $\beta$ -D-galactósidos, localizados en el extremo no reducido de la cadena (131). Es muy habitual que estos receptores estén enmascarados por el ácido siálico existente en la cadena carbohidratada, y que sea necesario, por tanto, realizar un tratamiento enzimático previo antes de demostrarlos (12, 24, 132).

Ulex europaeus (UEA).- Es una lectina extraída de una planta leguminosa, la aulaga, con una especificidad por el grupo sanguíneo O (133). Hay dos variedades de UEA con características y afinidades diferentes. El primer tipo (UEA-I) es la que vamos a utilizar en el presente trabajo. Se trata de una glucoproteína de peso molecular 170.000, con un 5,2% de carbohidratos en su composición global (NAc-Glc y Man) y afinidad específica hacia receptores  $\alpha$ -L-fucósidos, localizados junto a oligosacáridos, tanto del tipo D-Gal- $\beta$  (1-4) D-NAc-Glc como D-Gal- $\beta$  (1-3) NAc-Glc (134, 135).

Triticum vulgare (WGA).- Se obtiene del germen del trigo. No posee afinidad por ningún determinante antigénico de grupos sanguíneos. Reacciona con cadenas lineales o ramificadas formadas por NAc-Glc y AcS (136, 137). Los residuos de NAc-Glc constituyen componentes típicos del ácido hialurónico, por lo que esta lectina muestra intensa reacción con el tejido conectivo (106).

Otra de sus características es que la succinilación reduce su afinidad por el AcS sin alterar su unión a residuos de NAc-Glc.

#### d. Aplicaciones en histoquímica

Desde que las lectinas se introdujeron en histoquímica en los años 60, han sido ampliamente utilizadas para identificar residuos glucídicos específicos en secciones histológicas (6, 12, 25, 26, 112-116). Además, han contribuido extensamente al conocimiento de la biología celular, y en el campo de la patología han permitido estudiar los cambios estructurales que se desarrollan en la transformación maligna (17, 110, 119, 138-141). En este sentido, se han utilizado como marcadores de alteraciones de las GP de la superficie celular en células con transformación neoplásica, así como en los productos de su secreción. Las alteraciones citoquímicas en la superficie celular pueden dividirse en cuatro grupos fundamentales, según Damjanov (106): 1) pérdida de componentes normales, 2) aumento en la cantidad de los componentes normales, 3) distribución alterada de éstos y 4) aparición de componentes no presentes en células normales.

Si bien, no existen aún marcadores reconocidos de malignidad (infiltración o tendencia a metastatizar) en algunos órganos se han conseguido avances en el estu-

dio de la patología tumoral. Así, permiten predecir el potencial maligno del carcinoma de vejiga (142), en patología mamaria los receptores de PNA en células tumorales guardan correlación con los de estrógenos (143) y esta misma lectina es un marcador fiable de histiocitos y células de Reed-Stenberg (144). Por otro lado, UEA-I es marcador de células endoteliales (145) y de tumores de origen vascular (146).

En el estudio del tracto gastrointestinal se han aplicado tanto en enfermedades inflamatorias como neoplásicas. La secreción de glucoproteínas anormales por las células proliferantes en el carcinoma gástrico, así como en la mucosa adyacente y metaplásica, ha sido puesta de manifiesto por diversos autores (8, 10-12, 21, 24, 147).

e. Métodos de tinción

Aunque se han empleado en histoquímica una gran variedad de métodos para demostrar los lugares de unión de las lectinas, éstos se agrupan en:

1.- Método directo: usando lectinas conjugadas con un marcador (peroxidasa, fosfatasa alcalina, fluoresceína, ferritina, oro coloidal...). Es un método muy simple y rápido, aplicable a secciones congeladas, cultivos celulares, extendidos citológicos y secciones ultrafinas para estudio ultraestructural.

\* Marcador

Ω Lectina

-----+----- azúcar terminal

2. Métodos indirectos:

- Método con anticuerpos: mediante anticuerpos antilectina conjugados con peroxidasa y amplificando la reacción con el complejo PAP (peroxidasa-antiperoxisadasa).

\* PAP

∩ Anticuerpo marcado antilectina

Ω Lectina

-----+----- azúcar terminal

- Método con avidina-biotina: usando lectinas biotiniladas y un complejo de avidina conjugada con un marcador (ferritina, oro coloidal ...).

\* Marcador

‡ Avidina (estreptavidina)

Ω Lectina biotinilada

----- † ----- azúcar terminal

- Método con carbohidrato: mediante lectinas conjugadas con un azúcar marcado.

\* Marcador

† Azúcar

Ω Lectina

----- † ----- azúcar terminal

#### METODO AVIDINA - BIOTINA

El complejo avidina - biotina (ABC) no fue originalmente concebido para inmunohistoquímica, ya que era empleado por bioquímicos en técnicas de cromatografía debido a la alta afinidad de estas dos proteínas (148).

La aplicación de estas moléculas en citoquímica fue propuesta por Heggeness y Ash en 1977 (149) para estudios con microscopía de fluorescencia. En 1979, Guesdon y cols. (150) describen las técnicas directas e indi-

rectas usando enzimas como marcadores. Warnke y Levi, en 1980 (151), emplearon el sistema ABC en inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales. Morris y Saelinger, en 1984 (152), utilizaron estreptavidina marcada con partículas de oro coloidal, para identificar una toxina intracelular biotinilada. Del mismo modo, Newman y Hobot (153) estudiaron los receptores ultraestructurales de lectinas.

La mayor popularidad de este complejo llegó con la publicación de Hsu y cols., en 1981 (154), en la que comparaban este método con el del PAP (peroxidasa - antiperoxidasa).

Todas las técnicas que emplean el método ABC se basan en cuatro características principales:

- 1) La extraordinaria afinidad entre ambas moléculas formando complejos prácticamente permanentes.
- 2) La posibilidad de acoplar la biotina a grandes moléculas, tales como enzimas, anticuerpos, lectinas, etc.
- 3) La posibilidad de unir la avidina con una amplia variedad de marcadores (enzimas, metales pesados y fluorocromos).
- 4) La posibilidad de usar la avidina como un puente entre dos moléculas biotiniladas diferentes.

La avidina es una GP básica, extraída de la clara del huevo, que consta de 4 subunidades. En la superficie de la molécula existen 4 "pockets" hidrofóbicos (uno por cada subunidad) que son los lugares de unión para 4 residuos de biotina.

Hoffman y cols., en 1980 (155), observaron que la presencia en la avidina de residuos oligosacáridos, así como el alto punto isoeléctrico de ésta, podían ser inconvenientes menores al emplear esta molécula. Los primeros por poder reducir la especificidad de la reacción, aumentando el fondo al unirse a proteínas endógenas similares a lectinas. Lo segundo porque al trabajar generalmente con un pH neutro la avidina podría reaccionar con membranas celulares o con el núcleo.

Para obviar estas limitaciones, la avidina fue reemplazada por la estreptavidina, que es una molécula, aislada de cultivos de "Streptomyces avidinii", con un punto isoeléctrico neutro y una estructura similar a la avidina pero sin residuos azucarados.

La biotina es una vitamina hidrosoluble (vitamina H) presente en la yema del huevo y en una amplia variedad de tejidos, animales y vegetales (156). Su estructura es muy simple. El grupo carboxilo es el responsable de la unión a los residuos de  $\text{NH}_2$  de las diferentes proteínas.

La reacción entre la estreptavidina y biotina es por un enlace no covalente que se produce extremadamente rápido. Sólo pueden ser separadas en condiciones muy adversas, tal como un pH muy bajo (1,5).

La biotinización es el procedimiento químico mediante el cual la biotina es conjugada con otra molécula (enzimas, lectinas, ácidos nucleicos, etc.) (157). La

avidina, o estreptavidina, puede ser ligada con un marcador tal como fluorocromo, enzima, ferritina o partículas de oro coloidal (152, 153, 158). Estas partículas, de diferentes tamaños (5-40 nm), se adhieren a la avidina por fuerzas electrostáticas no covalentes (158).

### **Ventajas del método ABC**

Las ventajas más importante de las técnicas que emplean el método biotina-estreptavidina son su sensibilidad y versatilidad (159). La sensibilidad viene dada por el mecanismo químico de biotinización, ya que al ser la biotina una molécula de pequeño tamaño ofrece la posibilidad de "cubrir" a otra con un gran número de residuos de la primera. La otra ventaja es la versatilidad, ya que puede emplearse no sólo en microscopía óptica sino también en estudios ultraestructurales y en hibridación in situ.

Algunos autores han confirmado la mayor sensibilidad de este método a nivel ultraestructural en comparación con el método del PAP (160, 161).

### **Inconvenientes del método ABC**

Como mencionamos previamente, el problema de la tinción inespecífica de componentes tisulares fue paliada



con la introducción de la estreptavidina. Pero, no obstante, existen dos problemas menores (159):

1) La posibilidad de tinción entre la avidina y biotina endógena. Esta se encuentra en varios tejidos y órganos como hígado, mama, tejido adiposo y riñón (162). Wood (162) propuso bloquear los lugares de unión con la avidina con un tratamiento previo con avidina libre. Sin embargo, Coggi y cols. (159) no observaron este problema en sus experiencias con el complejo ABC.

2) La tinción inespecífica de los mastocitos (163). Puede obviarse usando estreptavidina o aumentando el pH de la reacción a 9,4.

### 3. HISTOQUIMICA ULTRAESTRUCTURAL CON LECTINAS.

El estudio histoquímico ultraestructural con lectinas requiere un procesamiento muy delicado de las muestras para no dañar los receptores glucídicos intracelulares. Estas necesidades técnicas se hacen extensivas, no sólo a la fijación y deshidratación de los fragmentos tisulares, sino también al medio de inclusión y a las técnicas de incubación con las lectinas.

#### a. Métodos de Fijación y Deshidratación

Desde los primeros trabajos de microscopía electrónica con técnicas inmunohistoquímicas se planteó el problema de preservar la ultraestructura, en las mejores condiciones posibles, sin alterar la antigenicidad del tejido. Con este propósito se han desarrollado múltiples métodos de fijación, con o sin osmificación, diferentes procedimientos de deshidratación y se han desarrollado nuevos medios de inclusión. Para Newman y cols. (153) estos factores están tan estrechamente interrelacionados que deberían ser considerados como uno solo. En este sentido, Bendayan y cols. (164) trataron de comparar los resultados obtenidos aplicando diferentes técnicas citoquímicas ultraestructurales, todas ellas con oro coloidal, en tejidos procesados con diferentes procedimientos. Observaron que todos los pasos que intervienen

en el desarrollo de estas técnicas pueden modificar los componentes celulares objeto de estudio. Así, el lavado antes de la fijación, la naturaleza de la solución fijadora, la composición química de la resina y las condiciones físicas de la inclusión, se constituyen en factores susceptibles de alterar la actividad biológica de dichos componentes. Concluyeron, además, que las condiciones para obtener la mejor tinción dependen del tipo de molécula que se pretenda estudiar y por tanto no se puede recomendar una sola metodología en citoquímica ultraestructural.

En 1983, Newman y cols. (165) compararon los resultados obtenidos en tejidos incluidos en resina LR White y fijados con diferentes fijadores. La preservación ultraestructural, y de la antigenicidad, obtenida con una solución tamponada de glutaraldehído y ácido pícrico (BGPA) fue mejor que utilizando sólo glutaraldehído al 2,5%. Además, el tejido fijado con BGPA conservó mejor la antigenicidad si era deshidratado directamente con etanol al 70%.

Un año más tarde, este mismo autor y cols. (166), recomiendan utilizar glutaraldehído al 1-2% durante 3-4 horas. Cuando el tejido no vaya a ser osmificado aconsejan añadir ácido pícrico para conservar mejor las membranas celulares. Aconsejan, además, que los fragmentos del tejido antes de ser sumergidos en el fijador no excedan 1-2 mm<sup>2</sup>. En relación con la deshidratación,

Newman (167) refiere que debe realizarse, cuando el tejido vaya a ser incluido en resina LR White, con etanol al 70%, o bien empezar con 50% y llegar al 70%.

Ellinger y Pavelka (116) estudiaron las glucoproteínas de la mucosa del intestino delgado y tráquea, con lectinas unidas a oro coloidal y utilizando diferentes medios fijadores, obteniendo los mejores resultados con una mezcla de formaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,5%. La deshidratación, a pesar de incluir en resina LR White, fue realizada hasta llegar al alcohol absoluto.

Bendayan y Zollinger, en 1983 (168), demostraron, en páncreas de rata incluido en resina epon, que la osmificación, como se había considerado hasta entonces, no deteriora la antigenicidad y que el uso posterior de agentes oxidantes (metaperyodato sódico) restablece la posibilidad de estudiar diferentes antígenos.

Herrera, en 1989 (169), publica un estudio inmunohistoquímico ultraestructural de riñón y de diferentes tumores utilizando LR White como medio de inclusión, y una solución de Carson-Milloring como fijador. La deshidratación la realiza comenzando con alcohol al 60% hasta llegar, en pasos sucesivos, hasta etanol al 95%.

b. Medios de inclusión

Las resinas utilizadas en microscopía electrónica, de mayor flexibilidad tecnológica y mejores resultados, son agrupadas en dos tipos (170):

a) Tipo Epoxy

b) Acrílicas

En el primer tipo se incluyen las resinas Araldita, Epon y Spurr (171). La primera ofrece buena estabilidad debido a su carácter aromático, pero su principal componente (DGEBA) es una gran molécula y por tanto tiene poca difusión en los tejidos. Las resinas tipo Epon tienen buena estabilidad y menor viscosidad. La resina Spurr (172) tiene la mejor tasa de difusión de todas las resinas tipo epoxy, así como la mayor consistencia. Su mayor inconveniente es la toxicidad.

En general, las resinas de este primer grupo son hidrofóbicas, lo que dificulta el paso de anticuerpos y otra moléculas a su interior. Para aumentar la hidrofilia de estas sustancias existen varios métodos, a los que se les conoce con el término anglosajón de "etching". Para realizarlos se trata la resina con un agente oxidante (peróxido de hidrógeno, permanganato potásico o ácido peryódico) o bien con metóxido ó etóxido de sodio (170, 173-175). Estos procedimientos tienen el inconveniente de poder alterar la composición química de las sustancias que se tratan de identificar.

En el grupo de las resinas acrílicas fundamentalmente se incluyen dos, denominadas Lowicryl (176) y LR White (165). Estas resinas pueden tener grupos hidrofílicos en su molécula, no precisando, por tanto, la realización de los procedimientos de "etching". Por ello, son las resinas más utilizadas en las técnicas inmunocitoquímicas y citoquímicas a nivel ultraestructural (170).

La resina Lowicryl (176) tiene el inconveniente de que la inclusión ha de realizarse a baja temperatura (-20°C) y con luz ultravioleta.

La resina aromática LR White fue ideada para combinar un alto grado de hidrofília con una buena estabilidad (165). Se polimeriza a 50°C, o bien a temperatura ambiente con la ayuda de un acelerador. Newman y cols. (165) comunicaron mejores resultados con el primer método. Los monómeros de LR White son hidrofóbicos, pero cuando se polimerizan se hacen hidrofílicos.

La polimerización de las resinas acrílicas se realiza por una reacción en cadena que puede ser bloqueada por el oxígeno. Por ello, deben usarse cápsulas de gelatina. Estas resinas tienen la ventaja de tolerar el agua durante la polimerización por lo que no es necesario que la deshidratación del tejido sea total. Además, como se comentó previamente, no precisan procedimientos de "etching" cuando se emplean en histoquímica ultraestructural.

### c. Técnicas de incubación

Clásicamente, se han distinguido dos procedimientos de incubación en histoquímica ultraestructural, los métodos de "pre-inclusión" (177) y los de "post-inclusión" (166).

Los métodos de "pre-inclusión" tienen la ventaja de que la exposición de las sustancias tisulares (antígenos, GP, enzimas, etc.), a los reactivos utilizados para su identificación, se realiza antes de que se alteren por los solventes orgánicos empleados durante el procesamiento del tejido. Por lo tanto, este procedimiento es útil cuando la sustancia que queremos estudiar está en bajas concentraciones o cuando es particularmente sensible a la inclusión. El mayor inconveniente es que la penetración de la lectina o anticuerpo es dificultosa, en muchos casos, en la sección tisular previamente fijada. Otras ventajas de esta metodología son la posibilidad de observar la muestra en microscopía óptica y seleccionar las áreas más interesantes antes de incluirlas para microscopía electrónica, y poder utilizar osmio en los casos donde es necesario obtener buen contraste de las membranas. Por otra parte, tiene el inconveniente de no poder realizar tinciones alternativas y cortes control (177).

Los procedimientos de "pre-inclusión" se han realizado en fracciones y suspensiones celulares (64,

178), en incubaciones de secciones ultrafinas congeladas y de criosecciones (25, 26, 55, 95), y en secciones cortadas rutinariamente (179).

Los métodos de "post-inclusión" presentan la ventaja de preservar mejor la ultraestructura celular, pero existen varios problemas, prácticamente paliados actualmente. El primero de ellos es no poder utilizar osmio en la posfijación por su efecto adverso sobre la antigenicidad del tejido (166). Este punto ha sido clásicamente aceptado, pero Bendayan y Zollinger, en 1983 (168), demostraron, como ya hemos comentado, que la osmificación no destruye la antigenicidad y que el uso posterior de agentes oxidantes restablece la posibilidad de estudiar diferentes antígenos con técnicas de "post-inclusión". El segundo problema hace relación a la escasa penetrabilidad, ya referida, para los anticuerpos y lectinas, en las resinas tipo epoxy. Pero el desarrollo de resinas acrílicas ha solventado este inconveniente, sin la necesidad de realizar procedimientos de "etching" (116, 163, 165). Otra gran ventaja de esta metodología es la posibilidad de estudiar varias sustancias en la misma célula.

#### d. Marcadores ultraestructurales

La introducción, por Singer en 1959 (180), de la proteína ferritina como marcador electrón denso que podía conjugarse a otras proteínas, tales como anticuerpos, lectinas, enzimas etc., abrió nuevos campos en el estudio de la estructura molecular de células y tejidos a nivel de microscopía electrónica. El principal inconveniente de estas partículas radica en la gran afinidad que presentan con los plásticos utilizados en la inclusión.

Nakane y Pierce, en 1966 (181), utilizaron por primera vez en microscopía electrónica la reacción de la peroxidasa y diaminobencidina, introducida en inmunohistoquímica previamente por Grahan y Karnovsky (182), para localizar antígenos mediante anticuerpos conjugados con aquel enzima. El cromógeno 3,3-diaminobencidina reacciona con el tetróxido de osmio formando un compuesto electrón-denso ("negro de osmio") que, desafortunadamente, dificulta la observación de la organela celular sobre la que se deposita.

Feldherr y Marshall, en 1962 (183), emplearon por primera vez las partículas de oro coloidal como marcador para microscopía electrónica, pero hasta 9 años más tarde no se utilizaron en inmunohistoquímica ultraestructural por Faulk y Taylor (184).

### Ventajas del oro coloidal

El oro coloidal ofrece muchas ventajas como marcador ultraestructural, ya que son partículas granulares que permiten una fina localización de los lugares de marcaje. Poseen una alta densidad electrónica por lo que son fácilmente detectadas, a diferencia de la baja opacidad de las partículas de ferritina. Debido a su naturaleza granular, es posible cuantificar el grado de tinción mediante contaje directo del número de partículas en un área determinada. Esto último, obviamente, no puede ser realizado con el producto de reacción de las técnicas peroxidásicas.

Además de en microscopía electrónica de transmisión, las partículas de oro coloidal se han utilizado en estudios de microscopía de barrido (185, 186) y de microscopía óptica (187).

Las soluciones de oro coloidal están constituidas por partículas metálicas obtenidas por condensación de unidades micromoleculares. Estas partículas pueden obtenerse en un amplio margen de diámetros, desde 5 a 150 nm, lo que permite la identificación a la vez de diferentes moléculas en la misma célula (188, 189). No obstante, sólo las partículas de 5 a 20 nm son aconsejables para estos estudios, ya que al ser de menor tamaño son menos susceptibles al deterioro.

Su unión a antígenos, enzimas, lectinas, estreptavidina, proteína A, etc., no se realiza mediante reacciones químicas, sino como un simple mecanismo de adsorción por fuerzas electrostáticas de van der Waals (190).

Otras ventajas del oro coloidal son: la baja afinidad por las resinas, la no toxicidad y la posibilidad de conservar las soluciones preparadas durante, al menos, 1 año.

#### e. Aplicación de las lectinas en microscopía electrónica

La capacidad de las lectinas para unirse específicamente a ciertos residuos azucarados hace que sean sustancias muy válidas para tratar de identificar, en la propia célula, los diferentes oligosacáridos que forman parte de las secreciones mucosas así como en que organelas citoplásmicas tiene lugar su síntesis.

A diferencia del empleo tan extendido de las lectinas en microscopía óptica (7, 10, 12, 24), la investigación de los lugares intracelulares de unión de estas sustancias ha planteado problemas metodológicos. Fundamentalmente, estos problemas se derivan del tamaño de estas moléculas y por tanto su limitación para penetrar en los compartimentos celulares (25, 26).

Para los estudios ultraestructurales con lectinas se han aplicado las mismas metodologías que para los

estudios inmunocitoquímicos. Se han utilizado tanto técnicas de "pre-inclusión" (25, 26, 55, 64, 178, 179, 191, 192), como de "post-inclusión", en resinas tipo epoxy con necesidad de realizar procedimientos de "etching" (173-175), y en resinas acrílicas (116, 193, 194).

No existen muchos trabajos ultraestructurales sobre glucoproteínas aplicando lectinas y la mayoría de ellos se han realizado en muestras de tejidos animales, sobre todo de intestino, páncreas y riñón de rata (90, 95, 116, 193, 195) y muy pocos en mucosa gástrica (25, 26, 196, 197).

La visualización de los lugares de unión de las lectinas depende de la conjugación de éstas con enzimas o partículas electrón-densas (método directo) (116), o bien mediante la aplicación de técnicas indirectas tal como el sistema avidina-biotina (153). El primer trabajo en el que se identificaron GP mediante lectinas y partículas de oro coloidal fue realizado por Garland en 1971 (198). Este autor identificó los lugares de reacción de la ConA en las paredes del *S. faecalis*. El primer autor que describe el procedimiento de unión de la estreptavidina con oro coloidal fue Bonnard en 1984 (158), así como la metodología para realizar tinción indirecta de antígenos con anticuerpos biotinilados. Van de Pol (199) describió, desde el punto de vista teórico, el método de doble tinción con estreptavidina y partículas de oro de diferente tamaño. En la literatura revisada la mayoría de los tra-

bajos de histoquímica ultraestructural con lectinas han sido realizados con métodos directos (90, 95, 116, 195) y ocasionalmente con métodos indirectos (153).

### E. GLUCOPROTEINAS GASTRICAS.

Como ya hemos hecho referencia, las GP mucosas presentan un enlace covalente del tipo O-glicosídico entre la NAcGal y el grupo hidroxilo de la serina o treonina (88). Los oligosacáridos de estas GP son más cortos y variados que los ligados en -N y a diferencia de éstos son probablemente sintetizados en su totalidad en el aparato de Golgi (90, 94, 95).

En las GP mucosas del aparato digestivo el componente carbohidratado puede llegar a corresponder a más del 85% de la molécula (15). Clásicamente, en la cadena azucarada se han distinguido tres regiones:

A) **Región central o "core"**. Constituida por la NAc-Gal, que es el primer azúcar que se une a la serina o treonina, y una cadena de azúcares que puede variar en su estructura. Lo más frecuente es que se añada un residuo de Gal o bien el disacárido Gal- NAc-Glc (18, 23).

B) **Región intermedia**. Está compuesta por residuos alternantes de Gal y NAc-Glc (23, 200).

C) **Región periférica**. En esta región existe gran variabilidad ya que pueden añadirse residuos de Glu, NAc-Gal, Gal, NAc-Glc, AcS, Fuc etc... así como múltiples combinaciones entre ellos (23).

En los individuos que poseen el denominado "gen secretor" (201) (75% de la población) las GP mucosas expresan cadenas terminales de estructura similar a la de los antígenos de grupo sanguíneo. A estos individuos se les denomina "secretores". Algunos autores (9, 202-204) han correlacionado las diferencias existentes en la composición glucoproteica de las secreciones mucosas, en general, a las variaciones en el grupo sanguíneo. De este modo, se ha observado una pérdida en la expresión de estos antígenos de grupo en el carcinoma gástrico (205, 206).

#### 1. ESTUDIOS BIOQUIMICOS DEL MOCO GASTRICO

El estudio de la composición glicosilada del moco gástrico comenzó con la aplicación de métodos bioquímicos. Así, Schragger, en 1969 (18), realizó el primer estudio cuantitativo y cualitativo, mediante cromatografía líquido-gas en aspirados gástricos. Este autor sugirió que las fracciones carbohidratadas de la secreción gástrica contienen un "core" común básico, con menos heterogeneidad de la que hasta entonces había sido estimada. En el core encontró tres componentes fundamentales en la misma proporción: Galactosa, Glucosamina y Galactosamina, apuntando además que estos tres azúcares estaban ligados estructuralmente. Este autor observó poca cantidad de manosa por lo que concluyó que este azúcar no

forma parte integral de estas GP. Por otra parte, aisló treonina, serina, prolina y alanina como los principales aminoácidos, sugiriendo que la galactosamina es el azúcar de unión a la cadena proteica.

Con respecto a los grupos sulfatos, ácido siálico y fucosa, Schrager (18) confirmó su localización dispersa, en las cadenas glucoproteicas, como radicales terminales. Finalmente, para este investigador, la longitud de la cadena azucarada oscila entre 6 y 12 unidades.

Con esta misma metodología, Schultze y Heremans (207) advirtieron la presencia de GP del plasma (Ig G, Ig M, Ig A,  $\alpha$ -GP ácida, etc.) en la secreción gástrica. La presencia en pequeñas cantidades de estas GP plasmáticas podrían oscurecer, por tanto, la relación cuantitativa real de los componentes carbohidratados de las GP gástricas. Posteriormente, Schrager y Oates (19) estudiaron las fracciones glucídicas de dichas GP plasmáticas, con cromatografía líquido-gas, observando que éstas, a diferencia de las mucosas, contienen una considerable cantidad de manosa y no presentan galactosamina.

Las relaciones cuantitativas de los componentes carbohidratados encontradas por estos autores (19), sirvieron para dividir a las GP aisladas en 5 grupos. El hallazgo característico en el grupo 1 fue el bajo contenido en fucosa. El aumento de fucosa en el grupo 2 fue asociado con el grupo sanguíneo H. La presencia de galactosamina o galactosa en las GP de los grupos 3 y 4, respectiva-

mente, relacionó a éstos con los grupos A y B. El aumento de galactosa y glucosamina en el grupo 5 fue asociado, así mismo, con los grupos A y B. Además, en los grupos 1, 2 y 4 advirtieron cantidades proporcionales de galactosamina y serina más treonina, mientras que en el grupo 3 este azúcar se encontraba en mayor cantidad.

Los autores concluyeron sugiriendo que la estructura básica común de las GP gástricas, independientemente de la especificidad de grupo sanguíneo, está compuesta de 4 unidades de disacáridos que se repiten. Cada unidad consta de galactosa y una N-acetil-hexosamina (que en 3 es glucosamina y en la otra galactosamina).



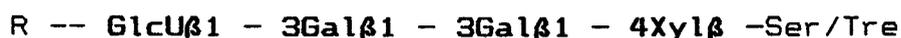
Similares hallazgos fueron publicados posteriormente por estos mismos autores (20).

En 1980, Hounsell y cols. (23), recopilan las investigaciones existentes hasta entonces acerca de las diferentes estructuras oligosacáridas de las GP gástricas, aportando una nueva. Emplean cromatografía y electroforesis para estudiar la composición del moco gástrico de las ovejas. Para liberar el enlace O-glicosídico de la cadena carbohidratada realizan una  $\beta$ -eliminación en solución acuosa alcalina en presencia de un agente reductor

(borhidruro). Con esta metodología consiguen aislar el "core", que aparece constituido por dos tipos de estructuras ramificadas estando presente en ambas la NAc-Gal como puente de unión con la serina o treonina. Esta estructura había sido previamente reportada por otros autores en diferentes secreciones mucosas (22, 200).

Con esta nueva estructura descrita por Hounsell (23) ya eran cuatro las conocidas en las proteínas glucosiladas: (los azúcares escritos en negrita están siempre presentes; los incluidos entre paréntesis no siempre están presentes)

Grupo 1: Es la estructura presente en los proteoglicanos (208).



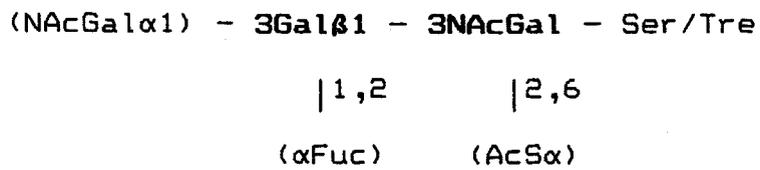
Grupo 2: Incluye cadenas cortas de oligosacáridos que tienen como estructura básica Gal $\beta$ 1 - 3NAcGal (que puede ser sustituida por ácido siálico o con los determinantes de los grupos sanguíneos H y A) (209).



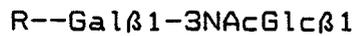
|2,6

(AcS $\alpha$ )

---



Grupo 3: En este grupo se incluyen las siguientes estructuras (200, 210):

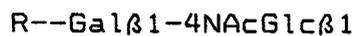


3



6

3



6



6



3

3



6



Grupo 4: Esta es la estructura que describieron Hounsell y cols. (23) en las mucinas gástricas de la oveja.

---

R -- Gal $\beta$ 1 - 4NAcGlc $\beta$ 1

6

NAcGal - Ser/Tre

3

R -- Gal $\beta$ 1 - 4NAcGlc $\beta$ 1

---

De todas ellas se extrae que la NAc-Gal es siempre el primer azúcar. A continuación pueden situarse ó NAc-Glc ó Gal ó ambas.

Fischer y cols, en 1984 (11), aislaron mediante cromatografía, con gel de agarosa unido a diferentes lectinas (ConA, PNA, UEA-I y WGA), las GP del moco gástrico, tanto de la mucosa normal como neoplásica. Observaron que la principal parte del moco no se unía a las lectinas; las GP mucosas que se unían a éstas correspondían a moléculas de relativo bajo peso molecular. Por cromatografía en gas, la relación molar entre aminohexosas y galactosa fue mayor en el moco unido a lectinas (3:1) que en la totalidad del moco de alto peso molecular (1:1). Este hecho sugiere que las lectinas tienen una mayor afinidad a los componentes del moco rico en hexosaminas. Los valores más altos de estos azúcares (10:1)

fueron encontrados en el moco aislado de adenocarcinomas gástricos con la lectina PNA. Ya que dicha lectina reconoce el disacárido  $\beta\text{Gal}(1-3)\text{NAC-Gal}$ , es altamente probable, según estos autores (11), que la elongación de la cadena oligosacárida esté alterada en las células tumorales.

Sobre la base de estos resultados y en relación al dato de que sólo una parte de las GP de alto pm se unen a las lectinas, estos autores concluyeron que las lectinas tienen mayor afinidad por las cadenas de oligosacáridos incompletamente glucosiladas.

## 2. ESTUDIOS HISTOQUIMICOS OPTICOS DEL MOCO GASTRICO

La demostración histológica de GP intraepiteliales comenzó con el trabajo de Mc Manus en 1946 (98). Este trabajo y posteriores se centraron en la determinación, mediante técnicas histoquímicas (Azul alcian, PAS ...), del tipo de moco secretado y no de los componentes del mismo. En este sentido, Glass (211) denominó **fucomucinas** a las mucinas neutras (PAS positivas) observadas en las células superficiales y foveolares de la mucosa gástrica humana. Para este autor (211), estas mucinas representan el mayor componente de la "barrera mucosa" protectora de la autodigestión.

En 1968, Lambert y cols. (212), estudiaron el moco del fundus gástrico de diferentes especies animales



mediante las técnicas del PAS, AA a pH 2,5 (para demostrar mucosustancias ácidas ricas en ácido siálico) y a pH 0,5 (para demostrar mucosustancias ácidas ricas en grupos sulfatos). También emplearon histoautorradiografía en estómagos de rata mediante un transportador de radiosulfato-35. Con esta metodología observaron una marcada heterogeneidad de las tinciones entre las diferentes especies y dentro de la misma especie. En el epitelio superficial y parte alta de las foveolas advirtieron tinción positiva con el PAS desde el núcleo a la membrana plasmática apical. La tinción con AA a pH 2,5 difería según las especies, siendo negativa en el hombre. Así mismo, la tinción con AA a pH 0,5 fue negativa en la mayoría de los casos. En la parte más profunda de las foveolas la positividad con el PAS fue evidente en todas las especies así como para AA a pH 2,5 y 0,5, aunque las dos últimas en el humano fueron más débiles o nulas. La incorporación del radiosulfato fue más marcada en la parte profunda de las foveolas.

Goldman y Ming, en 1968 (213), realizaron el primer trabajo histoquímico, con técnicas convencionales, de las variaciones en las mucinas gástricas secretadas por la mucosa normal, metaplásica y tumoral. Previamente a este trabajo existen pocas investigaciones histoquímicas que demuestren las variaciones en la composición del moco en el estómago patológico (8, 214) aunque sí de tipo bioquímico (18, 215, 216).

Goldman y Ming (213) observaron que la mayoría de las células mucosas normales contenían exclusivamente moco neutro. No obstante, mucinas ácidas no sulfatadas (sialomucinas) a veces fueron demostradas en las células foveolares más profundas y mucinas sulfatadas ocasionalmente en las células foveolares del antro.

En los casos con metaplasia intestinal observaron la presencia de mucosustancias ácidas, generalmente no sulfatadas, a nivel de las células caliciformes.

En los carcinomas, los tres tipos de mucinas fueron observados, incluso en el seno del mismo tumor. La presencia de mucinas ácidas, además de otros hallazgos morfológicos, hicieron sospechar la naturaleza metaplásica de algunas de las células tumorales. Aunque la presencia en el tumor de otras células con mucinas neutras no podía confirmar esta sugerencia. Además, no advirtieron una correlación estrecha entre las reacciones obtenidas en el tumor y mucosa adyacente. Por tanto, concluyeron que la metaplasia y el carcinoma son procesos independientes aunque a menudo coexistentes en el mismo tumor.

Sheahan y Jervis, en 1976 (217), realizaron un estudio, con AA-PAS y HID-AA, en muestras del tracto digestivo de 11 especies animales. En general, demostraron la presencia de mucosustancias neutras en el estómago de todas las especies, preferentemente en la superficie y epitelio foveolar. Menos cantidad fue observada en las

glándulas cardiales y en las células mucosas del cuello de las glándulas corporales y en las glándulas antrales. En la mucosa gástrica humana encontraron escasa cantidad de sialomucinas en las células mucosas del cuello y a nivel foveolar. Sulfomucinas no fueron observadas en ninguna región de la mucosa gástrica examinada.

En 1984, Fischer y cols (10), desarrollaron un importante estudio óptico con lectinas (HPA, RCA-I, PNA, ConA, WGA y UEA-I) del tracto gastrointestinal. Las células epiteliales normales, superficiales y foveolares, mostraron tinción con RCA-I, UEA-I y WGA, y ausencia de la misma con PNA y ConA, aunque estas últimas tiñeron la región supranuclear de las células del istmo y cuello glandular. En la superficie luminal de las células parietales y principales obtuvieron tinción con PNA, HPA y RCA-I. Los sistemas canaliculares de las células parietales fueron teñidos intensamente con HPA y en algunos casos con PNA.

Las células columnares en los casos de metaplasia intestinal mostraron un patrón de tinción similar al de las células absortivas intestinales normales, es decir, positividad manifiesta con PNA y HPA que aumentaba tras tratamiento con neuraminidasa.

En los adenocarcinomas pobremente diferenciados, PAS negativos, generalmente no observaron tinción, excepto en algunos casos en los que PNA fue muy positivo en la superficie luminal de las células tumorales. La

tinción con esta lectina fue muy manifiesta, sin embargo, en los casos bien diferenciados de tipo intestinal en la región del Golgi y en los gránulos de secreción de las células de aspecto caliciforme. Con RCA-I, HPA y WGA, la reacción fue generalmente menos intensa en este tipo tumoral.

Los carcinomas de tipo difuso mostraron una menor afinidad, antes del tratamiento con neuraminidasa, por PNA, y sin embargo la tinción fue muy positiva con HPA, RCA-I y UEA-I.

Bur y Franklin (12) emplearon lectinas fluorescentes para estudiar 9 carcinomas gástricos, y mucosa adyacente, en secciones de parafina. Con WGA y RCA-I obtuvieron tinción de las GP mucosas y no mucosas. PNA, SBA, DBA, BSA y UEA-I fueron positivas en las vacuolas y regiones apicales de las células epiteliales benignas. Las áreas tumorales fueron negativas aunque de modo ocasional se advertían focos positivos. La digestión con neuraminidasa aumentó la tinción en algunos casos. Ante estos resultados, sugirieron que la disminución de la tinción en las células tumorales podría ser debida a una "sobresialización" del moco, o bien a una pérdida de la actividad enzimática en la glucosilación. Con la ConA sólo obtienen resultados positivos en el epitelio metaplásico y en 2 de los 9 tumores. Esto indica o una anormal adicción de manosa o la producción de GP diferentes por algunos tumores gástricos.

Existen pocos trabajos en los que se describa con detalle la relación entre el grupo sanguíneo, el estado secretor o no, y el patrón de tinción con lectinas de la mucosa gástrica humana. En este sentido, McCartney, en 1986 (204), observó que la tinción de las células mucosas superficiales con PNA ocurría sólo en los individuos no secretores, independientemente del grupo sanguíneo. Esta correlación desaparecía en los carcinomas. Las lectinas DBA y HPA teñían selectivamente estas células en los individuos secretores del grupo A, y la tinción con SBA era independiente del grupo sanguíneo y del estado secretor. El enmascaramiento de la tinción con las diferentes lectinas en los casos de carcinoma, atribuido por este autor a la sobreespecialización del moco, fue más evidente con PNA.

Segura, en su tesis doctoral (218), realizó un estudio, óptico y ultraestructural, de la secreción mucosa gástrica normal y metaplásica. Para el estudio óptico empleó diferentes lectinas y métodos clásicos histoquímicos. En el estudio ultraestructural sólo utilizó los métodos clásicos (PAS, Azul alcian, HID, etc.). En la mucosa gástrica normal encontró tinción óptica exclusivamente con la técnica del PAS. En la secreción mucosa, del epitelio superficial foveolar y de las células del cuello, advirtió, mediante lectinas, la presencia de fucosa (UEA-I), NAc-Glc (WGA), Gal (PNA) y escasa cantidad de NAc-Gal (DBA). En la zona del Golgi de estas

células encontró estos mismos azúcares, siendo negativa, en esta localización la presencia de NAc-Gal (DBA). En las células parietales obtuvo reacción intensa, sobre los canalículos intracelulares, con LFA, PNA y UEA-I, débil con ConA y WGA, y negativa con DBA. Los resultados obtenidos en la mucosa antral fueron similares a los de la corporal. En el estudio ultraestructural es de resaltar la presencia de gránulos mucosos apicales, en las células del cuello, con un patrón de tinción trifásico con el método de Thiery.

En la metaplasia intestinal, Segura (218) observó un patrón de tinción con lectinas diferente al de la mucosa normal. Llama la atención la negatividad con ConA y DBA en todos los elementos epiteliales metaplásicos, y la diferencia de tinción entre las células caliciformes de la metaplasia incompleta y completa. En las células absortivas de la metaplasia completa la tinción fue positiva con WGA y UEA-I exclusivamente en las microvellosidades.

Okamoto y Forte, en 1988 (219), estudiaron la distribución de lectinas fluoresceinadas en células oxínticas y principales del estómago del conejo. Los canalículos de las parietales fueron teñidos con WGA, HPA y PNA, sugiriendo, por tanto, un predominio de N-acetilhexosaminas. Las estructuras tubulovesiculares se teñían fuertemente con WGA, HPA y RCA-I, lo que indica la presencia de glicoconjugados que contienen N-Acetil-hexosa-

minas y galactosa. Una tinción citoplasmática difusa con ConA sugirió la presencia de manosa.

Las membranas apicales de las células principales fueron teñidas con PNA, RCA-I, HPA y UEA-I. No obtuvieron tinción, con ninguna lectina, en el citoplasma y membranas basolaterales. Por el contrario, observaron tinción con UEA-I en los espacios laterales intercelulares.

### 3. ESTUDIOS HISTOQUIMICOS ULTRAESTRUCTURALES DEL MOCO GASTRICO.

Los estudios bioquímicos comentados previamente centraron el objeto de su investigación en conocer la composición del moco gástrico, sin hacer referencia a la localización celular del proceso de síntesis y secreción. Los estudios a nivel de microscopía óptica, con técnicas histoquímicas clásicas, han detallado las características del moco, así como su distribución en las diferentes células del epitelio gástrico normal y patológico. Con los trabajos a nivel ultraestructural, que a continuación comentaremos (autorradiografía, lectinas ...), se inició el conocimiento de la localización celular de la síntesis glucoproteica. Muchas de estas experiencias se basaron en la aplicación de los métodos convencionales ópticos. La dificultad del empleo de lectinas a nivel ultraestruc-

tural determina que existan pocos trabajos aplicando esta metodología a la patología gástrica.

En 1969, Rambourg y cols. (220), por primera vez, emplean la técnica del PAS en microscopía electrónica. La observación más relevante de estos autores fue un aumento en el gradiente de tinción, desde la parte proximal a la distal, del aparato de Golgi de la mayoría de las células epiteliales gástricas.

El primer trabajo ultraestructural, con diferentes técnicas histoquímicas convencionales, del moco gástrico de las ratas, fue realizado por Spicer y cols (13). Emplearon para ello una amplia batería de métodos ultraestructurales: hierro dializado (221), diaminas de alto contenido en hierro (HID) (102), método de Thiéry (107) y la técnica del ácido tánico-acetato de uranilo (222). Además realizaron secciones en parafina a las que aplicaron el método del AA-PAS y el de HID.

Encontraron que en la mayoría de las células epiteliales superficiales del estómago existían gotas mucosas bifásicas, con una zona periférica de mucosustancias neutras ricas en hexosas y una zona central ("core") más densa, así mismo de mucosustancias neutras. En muchas células superficiales de las foveolas, los gránulos monofásicos y bifásicos aparecen entremezclados con otros monofásicos que muestran reactividad uniforme al peryodato y HID, y variable con el hierro dializado. El epitelio foveolar más profundo presentaba sólo gotas monofásicas,

la mayoría de las cuales contenían carbohidratos reactivos al peryodato. En las células del istmo observaron gránulos monofásicos, y ocasionalmente bifásicos, con mucosustancias sulfatadas ricas en hexosas. Las células del cuello contenían una población uniforme de gránulos monofásicos con mucosustancias neutras dispuestas a modo de red. Con el método de Thiéry obtuvieron tinción en el aparato de Golgi con un incremento hacia la cara madurativa, similar al descrito por Rambourg y cols. (220) con la técnica del PAS.

Kramer y cols, en 1977 (60), mediante técnicas autorradiográficas, localizaron ultraestructuralmente la incorporación de galactosa y leucina titriadas en las células mucosas superficiales del estómago de rata. Observaron que la Gal marcada es incorporada fundamentalmente a nivel del Golgi, que muestra la más alta radioactividad a los 2' de la incubación, con decremento gradual en el tiempo. La radioactividad en las vacuolas condensantes y gránulos secretores jóvenes aparece a los 10', mientras que en los gránulos maduros lo hace a los 40'. En la capa mucosa externa aparece 20' después.

Previamente a estas observaciones, Ovtracht y cols (223) demostraron, en células hepáticas de ratas, la presencia de galactosiltransferasa en la subfracción del Golgi caracterizada por la existencia de vacuolas secretoras. Este hallazgo está en relación con los obtenidos por Kramer y cols. (60), ya que la mayor concentración de

Gal aparece en la cara madurativa del Golgi. No obstante, Bergeron (224) observó, mediante técnicas bioquímicas, la actividad del enzima citado en los elementos inmaduros del Golgi.

Kramer y cols. (225), en otro trabajo sobre la síntesis de GP, coinciden con Schrager y Oates (18) al sugerir que la NAcGal es el primer azúcar de la cadena glucosilada, aunque desconocen cuál es el lugar de unión a la serina o treonina. La Gal y NAcGlc alternativamente, y los grupos finales (Gal, NAcGal y Fuc) se unirían, según estos autores (225), en el complejo de Golgi.

También con técnicas autorradiográficas en hepatocitos de rata, Bennet (226) observó como el ácido siálico se incorporaba a las GP en la cara trans del Golgi.

El primer trabajo relevante en el que se utilizó una lectina (PNA ligada a peroxidasa) para la investigación ultraestructural de los lugares intracelulares de la síntesis glucoproteica, en mucosa gástrica de ratas, fue publicado por Sato y Spicer en 1982 (26). Además de realizar técnicas histoquímicas convencionales, compararon los resultados obtenidos con PNA en microscopía óptica y electrónica.

El hallazgo óptico de mayor interés con esta lectina fue la tinción selectiva de la zona del Golgi en las células superficiales y foveolares, y la no presencia de tinción en la secreción apical almacenada como se

había descrito previamente (227). Sin embargo, la superficie de la mayoría de las células epiteliales, así como el moco adherido, sí presentaron tinción. Esta, además, fue escasa o ausente en el citoplasma apical de las células foveolares profundas y en el moco secretado en las foveolas. La oxidación previa con peryodato eliminó la tinción con PNA.

La tinción supranuclear observada con microscopía óptica se correspondía ultraestructuralmente con la de la cara intermedia del aparato de Golgi. No observaron reacción ni en las caras cis y trans, ni en las vesículas mucosas maduras. En la superficie luminal de las células epiteliales superficiales observaron depósitos globulares intermitentes al igual que en el moco secretado en la luz (coincidiendo con los resultados a nivel óptico). La tinción negativa con PNA, en la cara madura (trans) del Golgi y gránulos de secreción, es explicada por Sato y Spicer (26) por la adicción de uno o más residuos azucarados tras la galactosa. Otra posible explicación, para estos autores, sería la falta de permeabilidad para PNA a través de las membranas citoplasmáticas que delimitan a los gránulos de secreción maduros y a las caras cis y trans del Golgi. Así, las membranas de las cisternas intermedias diferirían de las anteriores en que permitirían la difusión de la lectina, hecho por otra parte no confirmado. Los experimentos realizados por Stoward (227) en colon de ratas, donde tampoco demostró positividad

para PNA en los gránulos mucosos maduros pero sí tras tratamiento con neuraminidasa, dan mayor credibilidad a la primera hipótesis de Sato y Spicer (26). Estos autores sugieren que la fucosa sería el azúcar candidato a ocupar la posición final de la cadena carbohidratada.

La presencia de tinción en la superficie luminal y moco secretado es interpretada por la existencia a esos niveles de actividad glicosídica (por glicosidasas bacterianas, ácido clorhídrico y pepsina) lo que permitiría el desenmascaramiento de la galactosa.

Griffiths, en 1982 (55), utilizando la lectina RCA, encuentra tinción ultraestructural para Gal tanto en las cisternas trans como intermedias, mientras que Roth y cols. (228) sólo la observaron en la cara trans del aparato de Golgi de las células mucosas del duodeno. Previamente, Roth y Berger (229) demostraron con técnicas inmunocitoquímicas que la actividad galactosiltransferasa se localizaba en la cisterna trans.

Suzuki y cols, en 1982 (196), estudiaron estómagos de rata empleando 3 lectinas (ConA, RCA y WGA) y 2 metodologías diferentes, ambas con tinción "post-inclusión". El primer método es el de Nicolson y Singer (230), modificado por Suzuki y cols. (174), que emplea lectinas unidas a ferritina. El segundo fue descrito por Ackerman y Freeman (231) y usa como marcador de la lectina un complejo formado por oro coloidal y peroxidasa de rábano.

No encontraron diferencias en los resultados obtenidos con los dos métodos.

Con la ConA observaron tinción en las células mucosas del cuello y células pilóricas, y muy poca o ninguna en las mucosas superficiales y foveolares. Esta presencia escasa de manosa en la mucosecreción gástrica ya había sido comunicada por Schragger (18). RCA y WGA fueron observadas en los gránulos mucosos de las células superficiales, foveolares, del cuello y pilóricas, aunque con diferentes intensidades.

Estos autores (196) realizaron un tratamiento oxidativo con ácido peryódico, previo a la incubación de las rejillas con las lectinas. Esta oxidación generalmente provoca una abolición de la tinción excepto con ConA que aumenta, como describieron Katsuyama y Spicer (113) ("tinción paradójica de la ConA). Este hecho fue también observado con WGA. Estos resultados sugieren que el efecto oxidativo está relacionado con la posición del azúcar, al que se une la lectina, en la cadena glucoproteica. La Man y NAc-Glc deben ocupar posiciones no terminales por lo que la reacción difícilmente es inhibida. Por otro lado, se sabe que la Gal está usualmente presente en posición terminal, de ahí la inhibición de la tinción tras la oxidación.

Con respecto a la posición de la fucosa en la cadena azucarada, Roth, en 1983 (193), demostró ultraestructuralmente, en mucosa intestinal de rata, mediante

la lectina *Lotus tetragonolobus* marcada con oro coloidal, que ésta ocupaba las cisternas trans del aparato de Golgi de las células caliciformes. Estudios a nivel óptico realizados por Yonezawa y Nakamura (232) en mucosa colónica normal y neoplásica con la lectina UEA-I, demostraron que la  $\alpha$ -L-fucosa ocupa la posición terminal de las GP secretadas por la mucosa patológica, mientras que en las secretadas por la mucosa normal el ácido siálico competiría con ésta por dicha localización.

Ito y cols., en 1985 (197) estudiaron comparativamente la mucosa gástrica normal con lectinas a nivel óptico y ultraestructural. Emplearon lectinas biotiniladas para el estudio óptico y conjugadas con peroxidasa para el ultraestructural (con una técnica de "pre-inclusión").

En microscopía óptica, advirtieron tinción con las 7 lectinas utilizadas (ConA, RCA, DBA, UEA-I, PNA, SBA y WGA) en la superficie luminal y región supranuclear de las células mucosas superficiales. Además, todas, excepto ConA y DBA, tiñieron los gránulos mucosos, lo que implica la inexistencia a este nivel de Man y NAcGal. La tinción con DBA se limitó a la superficie luminal y región supranuclear. En las células parietales advirtieron tinción perinuclear con las 7 lectinas. En las células mucosas del cuello y principales, la tinción citoplasmática resultó más o menos difusa con todas las lectinas, excepto con DBA.

A nivel ultraestructural, observaron positividad para DBA, RCA y ConA en las cisternas y vesículas del Golgi de las células superficiales. En las parietales fue observada en los canaliculos intracelulares. Con DBA fue muy llamativa, tanto en los microvilli como en las membranas de los canaliculi. La RCA tiñó la membrana celular, los canaliculi y las membranas del Golgi. La ConA, además, fue positiva en el RE, envuelta nuclear y aparato de Golgi. En las células principales, el RER fue intensamente teñido con esta lectina.

Los hallazgos a nivel óptico son prácticamente superponibles a los obtenidos por Fischer y cols. (6, 10) con respecto a ConA, RCA-I, UEA-I y PNA. Parece, según Ito y cols. (197), que la Man entraría a formar parte de las GP mucosas debido a la tinción que obtienen con ConA.

La investigación del moco gástrico ha estado relativamente poco desarrollada, desde el punto de vista ultraestructural, en comparación con la de otros tejidos. Tartakoff y Vasalli, en 1983 (64), investigaron los lugares subcelulares de la maduración de los oligosacáridos, mediante lectinas conjugadas con peroxidasa (ConA y WGA), en suspensiones de células de mieloma secretor de IgM. La tinción con ConA fue observada en el espacio cisternal de la envuelta nuclear, RER y cisternas de la cara proximal del aparato de Golgi. La tinción con WGA fue observada en la cara distal del Golgi, vesículas de maduración y en la superficie celular.

Estas observaciones confirman la existencia de 2 compartimentos en el Golgi y muestran que las lectinas pueden ser empleadas como marcadores proximales o distales de dicha organela. Los hallazgos con WGA sugieren que la NAcGlc es añadida durante el transporte de la cadena carbohidratada desde la parte proximal a la distal del aparato de Golgi.

Roth, en 1983 (193), realizó un estudio ultraestructural en muestras de mucosa duodenal de ratas, incluidas en Lowicryl, con lectinas unidas a oro coloidal (método de tinción directa) y mediante el complejo peroxidasa-oro coloidal y ovomucuoide - oro coloidal (método de tinción indirecto o en dos pasos). Observó tinción con ConA exclusivamente en el RER, mientras que con HPA se advirtió en diversas localizaciones del aparato de Golgi y en el moco. La tinción observada sobre el espacio cisternal del RER con RCA, la cual reconoce residuos de galactosa, fue interpretada como inespecífica ya que la galactosiltransferasa no se encuentra en esta localización, sino en la cara trans del aparato de Golgi, como había sido demostrado previamente por este mismo autor (228, 229).

Pavelka y Ellinger, en 1985 (95), realizaron un estudio ultraestructural de células absortivas de intestino delgado de ratas con ConA, RCA-I y HPA, usando como marcador la enzima peroxidasa. Sus resultados más importantes fueron la tinción con ConA de la envuelta nuclear,

RE, cara cis y a veces trans del Golgi y lisosomas; la presencia de tinción con RCA en las cisternas intermedias del Golgi, lisosomas y vesículas citoplasmáticas; y la tinción de la cara cis con HPA, lo que indica que el primer azúcar de la cadena carbohidratada es la NAcGal. Sin embargo, no obtienen tinción con HPA en otras localizaciones.

Estos mismos autores (116) comunicaron los resultados obtenidos con lectinas unidas a oro coloidal, ferritina y peroxidasa, en mucosa de intestino delgado y tráquea de las ratas. Para este estudio incluyeron las muestras en resina LR White. En las células absortivas del duodeno observaron tinción con ConA en el borde microvillosos y lisosomas; con RCA-I y WGA encontraron tinción, además, en las vesículas apicales, aparato de Golgi y membrana plasmática basolateral. En las células caliciformes, la ConA fue advertida en el RE, Golgi y lisosomas, y en ningún caso en el moco. Las lectinas HPA, RCA-I y WGA tiñieron el aparato de Golgi y el moco, pero no el RE. Con la ConA se marcaron, además, los gránulos de los leucocitos eosinófilos. Los gránulos secretores de las células de Paneth mostraron tinción en la periferia con RCA-I, permaneciendo sin marcarje la central. Estos autores sugieren que los sacáridos marcados pertenecen a mucinas ácidas.

Jezernik y Pipan, en 1989 (233), publicaron sus resultados, con lectinas conjugadas con ferritina, en la

glándula parótida. Obtuvieron tinción de las superficies apicales de las células ductales con WGA y RCA-I. No observan tinción con ConA y muy débil con PNA. Los gránulos de secreción se teñían con WGA, RCA-I y PHA-E (Phaseolus vulgaris agglutinin). El citoplasma apical de las células acinares mostró alta densidad de tinción con todas las lectinas, así como los gránulos de secreción (excepto con ConA).

No sólo se han empleado lectinas marcadas con partículas electrón-densas para el estudio cualitativo del componente carbohidratado de las secreciones mucosas. Bendayan, en 1981 (234), introdujo una metodología basada en la afinidad existente entre un enzima y su sustrato para estudiar la localización ultraestructural de ácidos nucleicos. Para ello, une al enzima partículas de oro coloidal. Sin embargo, como en muchas técnicas citológicas, la preservación del sustrato durante el procesamiento, así como de su estructura para ser identificado por el enzima, se constituyen en los principales problemas metodológicos para obtener resultados satisfactorios. Entre la gran variedad de moléculas que pueden ser detectadas con este método, han recibido especial atención los polisacáridos (235, 236).

En 1987, Bendayan y Benhamou (236) observaron, mediante la enzima  $\beta$ -glucosidasa, restos glucosídicos a nivel del RER y estructuras nucleares de células hepáticas y pancreáticas. Estos resultados sugerían que el

sustrato para la  $\beta$ -glucosidasa está asociado a las membranas del RER, pudiendo corresponder, según estos autores (236), a los oligosacáridos ligados en N, así como a sus precursores (los oligosacáridos ligados a lípidos). Como ya comentamos, la síntesis de este tipo de oligosacáridos parece ser que comienza en el RER (87, 89, 90).

La tinción nuclear observada por Bendayan y Benhamou (236) concuerda con previos resultados obtenidos por otros autores (193, 237, 238) usando lectinas marcadas con oro coloidal. La tinción nuclear fue observada por los primeros (236) fundamentalmente sobre la heterocromatina o cromatina condensada, mientras que Kan (238) la observó en las regiones de la eucromatina. Estos residuos glucosilados nucleares pueden jugar, según Kan (237), un importante papel en la transcripción del ADN.

II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA.

La investigación de la composición de la secreción mucosa gástrica ha sido objeto de numerosos estudios. Estos se han enfocado desde un punto de vista bioquímico, así como histoquímico a nivel de microscopía de luz. En menor proporción se ha determinado la estructura glicoproteica de las mucinas gástricas bajo el prisma de la microscopía electrónica.

En general, los glicoconjugados, moléculas ampliamente distribuidas en la economía (enzimas, hormonas, anticuerpos, secreciones mucosas...), se han relacionado con los procesos secretores, con la diferenciación celular y con la transformación maligna.

En particular, las mucosustancias gástricas tienen fundamentalmente una función protectora y lubricante de la capa mucosa. Los múltiples estudios, bioquímicos e histoquímicos, sobre su estructura, se han centrado en la composición de la parte carbohidratada, ya que la proteica es de difícil acceso. En estos trabajos se ha encontrado que el moco gástrico, compuesto por GP de alto peso molecular, presenta una gran heterogeneidad, con variaciones individuales en relación con el grupo sanguíneo.

Además de investigar su estructura química, se ha tratado de objetivar sus posibles alteraciones, intentando relacionarlas con procesos patológicos gastrointestinales y con la carcinogénesis.

Las GP que entran a formar parte de las mucinas gástricas están constituidas, en su mayor parte, por cuatro sacáridos : N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, galactosa y fucosa. Estas moléculas están ligadas a la cadena proteica por un enlace O-glicosídico entre los aminoácidos serina o treonina y el grupo hidroxilo de la N-acetil-galactosamina. Esta hexosamina es, por tanto, el primer azúcar de la cadena carbohidratada. No existe acuerdo, entre los diferentes autores, sobre la localización intracelular dónde se realiza el "acoplamiento" entre los dos componentes.

Se han constatado diferencias en la composición de las GP del moco normal y del secretado por estómagos con patología. Estas podrían estar en relación con una glicosilación incompleta, o bien ser consecuencia de la adición de otros sacáridos. Debido a la heterogeneidad de la estructura molecular de las GP gástricas en normalidad, es muy difícil demostrar los cambios que ocurren en el moco durante los estados patológicos.

Por tanto, el estudio de las alteraciones cuantitativas y/o cualitativas del moco gástrico, en patología tumoral y no tumoral, podría ser un marcador en el diagnóstico precoz del carcinoma gástrico en sujetos de alto riesgo.

Con estos antecedentes, hemos realizado un trabajo histoquímico ultraestructural con lectinas, en muestras de mucosa gástrica normal, metaplásica y neoplá-

sica, con los siguientes objetivos: en primer lugar, investigar cuáles son los principales sacáridos que entran a formar parte de la secreción mucosa gástrica normal; en segundo lugar, demostrar su localización intracelular en el proceso de síntesis de las cadenas azucaradas; y en tercer lugar, tratar de interpretar las posibles diferencias existentes entre la composición del moco gástrico normal y "patológico".

III. MATERIAL Y METODOS

#### A. OBTENCION DEL MATERIAL.

Para la realización de este trabajo experimental hemos utilizado 35 piezas de gastrectomía de pacientes diagnosticados de carcinoma gástrico. Todo el material procedía del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla y fue obtenido durante el año 1988-1989.

Las piezas de gastrectomía fueron recogidas directamente del quirófano y llevadas al Departamento de Anatomía Patológica envueltas en gasas empapadas en suero fisiológico, en el menor tiempo posible. Una vez abierta la pieza por curvadura mayor, se tomaron varias muestras del tumor, zona adyacente y alejada, sumergiéndolas en gotas del fijador sobre una placa de cera y, bajo el microscopio de disección, fueron cortadas en fragmentos de 1-2 mm<sup>2</sup>, separando y orientando la capa mucosa.

Cada grupo de muestras se dividieron en dos subgrupos: uno para inclusión rutinaria en resina Spurr y otro para inclusión en resina LR White (London Resin Company, Basingstoke, UK).

De los 35 carcinomas gástricos estudiados, 20 correspondían a la variedad intestinal y 15 a la difusa (71).

## B. FIJACION.

Las muestras que se incluyeron en Spurr (172), fueron fijadas en una solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato salino (PBS) durante al menos 4 horas. Posteriormente se realizó posfijación en tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora.

Las muestras incluidas en resina LR White fueron fijadas en solución de glutaraldehído al 1% con amortiguador cacodilato sódico 0,1 M a pH 7,2 durante 2 horas a 40C. Alternativamente, algunas muestras fueron fijadas en una mezcla de formaldehído al 4% (preparado en fresco) y glutaraldehído al 0,5%, en el mismo amortiguador y en las mismas condiciones de tiempo y temperatura.

## C. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

### 1. EN RESINA SPURR

Tras la fijación, las muestras fueron lavadas en agua destilada y deshidratadas en alcohol etílico a concentraciones crecientes (30%, 50%, 70%, 90%, 100% x 2) durante 15 minutos en cada paso, y a temperatura ambiente, y posteriormente en óxido de propileno en 2 pasos de 15 minutos. La inclusión y realización de los bloques en cápsulas de polietileno fue llevada a cabo en resina

Spurr (172) según la metodología habitual de nuestro laboratorio de microscopía electrónica.

## 2. EN RESINA LR White

La inclusión en esta resina fue realizada con una modificación de la técnica descrita por Ellinger y Pavelka (116). Tras la fijación, las muestras fueron introducidas en cloruro amónico 0,05 M en tampón PBS para bloquear los radicales aldehidos libres. A continuación fueron deshidratadas en alcohol etílico a diluciones crecientes (70%, 80%, 95%, 100% x 2) en pasos de 15 minutos a temperatura ambiente.

La inclusión se realizó directamente en resina pura, permaneciendo en un aparato giratorio durante 4 horas, tras las cuales se efectuó un cambio de resina. En esta nueva resina las muestras se mantuvieron a 40°C hasta el día siguiente. Para la polimerización se utilizó una mezcla de resina con su acelerador (1 gota por cada 10cc), que tras ser agitada durante pocos minutos, fue depositada sobre los fragmentos introducidos en cápsulas de gelatina, permaneciendo en estufa a 50°C durante 24 horas.

Se realizaron, en ambos tipos de inclusión, cortes "semifinos" (de 1µm de espesor y teñidos con azul de toluidina) para seleccionar las zonas que iban a ser estudiadas con el microscopio electrónico. Las secciones

"ultrafinas", de 800-1000 Å de espesor, fueron cortadas con cuchillas de vidrio y montadas en rejillas de níquel de 300 Mesh, sin colodion. Los cortes que no se utilizaron para estudio histoquímico ultraestructural, fueron teñidos con acetato de uranilo metanólico y citrato de plomo, ambos al 2%.

La observación ultraestructural se realizó en un microscopio electrónico Zeiss EM 900 Turbo.

#### D. TECNICA HISTOQUIMICA ULTRAESTRUCTURAL.

##### 1. REACTIVOS EMPLEADOS

Para este estudio hemos empleado 5 tipos de lectinas biotiniladas (Ulex europaeus agglutinin-I, Peanut agglutinin, Wheat germen agglutinin, Soybean agglutinin y Dolichus biflorus agglutinin) (Lab. Vector, Burlingame, USA). Además, dispusimos de las lectina UEA-I y PNA conjugadas con partículas de oro coloidal de 20 nm (Lab. Jansen, Olen, Bélgica). La estreptavidina utilizada estaba unida, comercialmente, a partículas de oro coloidal de 15 nm (Lab. Janssen, Olen, Bélgica) y 30 nm (Lab. Vector, Burlingame, USA).

Para la incubación, en todas las lectinas, de las secciones incluidas en resina LR White se utilizaron diferentes concentraciones (40, 100 y 200 µg/ml) en solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS. La

concentración de las lectinas marcadas con oro coloidal era de 40  $\mu\text{g/ml}$ . En los fragmentos incluidos en resina Spurr la concentración utilizada, para el método indirecto, fue de 200 $\mu\text{g/ml}$ . La estreptavidina marcada con oro coloidal se utilizó, en ambas inclusiones, a una dilución 1:20 en BSA-PBS 1%.

## 2. PROCEDIMIENTOS DE INCUBACION

### a. Método Indirecto

El procedimiento de incubación utilizado fue el descrito por Bonnard y cols. (158) para anticuerpos biotinilados, con alguna modificación. Todos los pasos fueron realizados en cámara húmeda y a temperatura ambiente, depositando la rejilla "flotando" sobre las gotas de los diferentes reactivos. La metodología fue la siguiente:

- 1) Se depositan sobre una gota de BSA-PBS al 1% durante 15 minutos.
- 2) Se pasan posteriormente a la gota de lectina permaneciendo sobre ésta durante 1 hora, de forma que los cortes contacten con la gota.

- 3) Se realizan tres pasos de 5 minutos cada uno en tampón BSA-PBS al 1%.
- 4) A continuación las rejillas son transferidas a las gotas de estreptavidina marcada con oro coloidal de 15 nm. durante 30 minutos.
- 5) Se lavan abundantemente con agua bidestilada a chorro.
- 6) Se contratiñen suavemente con acetato de uranilo al 2% en alcohol metanílico al 70%, durante 2 minutos.
- 7) Se lavan de nuevo con agua bidestilada.

Los fragmentos incluidos en resina Spurr fueron teñidos con esta misma metodología sin realizar ningún procedimiento de "etching" previo.

Las muestras fueron estudiadas en un microscopio electrónico Zeiss EM900.

#### b. Método Directo

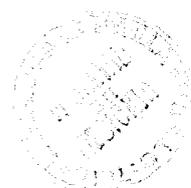
El procedimiento de incubación se realiza en un solo paso. Fue realizado con las lectinas UEA-I y PNA en algunos fragmentos exclusivamente para comparar los resultados obtenidos con esta metodología y la técnica indirecta.

c. Incubación con dos lectinas

El doble marcaje con lectinas fue realizado ocasionalmente, ya que la laboriosidad metodológica de-estructura notablemente el tejido, dificultando el estudio ultraestructural.

Para llevar a cabo la tinción simultánea con dos lectinas se utilizó el método descrito por Bendayan (188) para identificar dos antígenos en la misma sección. Este método consiste en marcar una cara de la rejilla con una lectina y estreptavidina conjugada con oro coloidal de un tamaño, y la otra, a continuación, con otra lectina y estreptavidina marcada con oro coloidal de diferente tamaño.

Los controles se realizaron incubando las rejillas exclusivamente con estreptavidina conjugada con partículas de oro coloidal, sin añadir previamente la lectina. En ningún caso observamos reacción inespecífica entre la estreptavidina y biotina endógena, u oligosacáridos similares a lectinas.



**IV. RESULTADOS.**

## A. METODOLOGIA.

### 1. FIJACION

La fijación de las muestras incluidas en resina LR White (en solución de glutaraldehído al 1%, en tampón cacodilato durante 2 horas) fue suficiente para mantener una aceptable preservación de la ultraestructura celular. Se pudieron delimitar las membranas celulares, estructuras nucleares, mitocondrias y gránulos de moco. El retículo endoplásmico y las cisternas del aparato de Golgi fueron, en muchos casos, más difíciles de identificar. No encontramos diferencias, ni en la conservación ni en el marcaje de restos azucarados, cuando utilizamos como fijador una solución de formaldehído y glutaraldehído. Los fragmentos procesados para ser incluidos en resina Spurr presentaron una ultraestructura mejor conservada, debido al mayor tiempo de fijación y a la refijación con tetróxido de osmio. Sin embargo, estos resultados contrastaron con la disminución en el marcaje con oro coloidal de los restos azucarados, al compararlos con los obtenidos en las muestras incluidas en LR White, a pesar de incrementar la concentración de las lectinas al doble (Fig. 1, 15).

## 2. INCUBACION

El tiempo de incubación que garantizó un marcaje intenso de las glucoproteínas mucosas, intra y extracelulares, sin aparecer tinción de fondo, fue de 60 minutos.

Las secciones ultrafinas que fueron incubadas con el método directo ("lectinas - oro coloidal") mostraron una reacción menos intensa que las estudiadas con el método indirecto (biotina - estreptavidina) (Fig. 2). Esta discordancia podría ser debida a la menor concentración con la que se comercializa las lectinas unidas a oro coloidal, o bien a la mayor sensibilidad del método avidina-biotina. En los estudios realizados con el método indirecto utilizando diferentes concentraciones de lectinas biotiniladas, hemos observado que a igualdad de concentraciones este método es más sensible que el directo. La concentración empleada para realizar este trabajo fue de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

En cuanto a la incubación con lectinas de las muestras incluidas en resina Spurr, ya hemos hecho referencia a la disminución observada en la intensidad de marcaje. No obstante, en muchos casos la reacción fue muy llamativa sin tener que realizar procedimiento de "etching" previo (Fig. 1).

Cuando realizamos doble marcaje con partículas de oro coloidal de dos diámetros (15 y 30 nm) la conser-

vación de las secciones ultrafinas apareció deteriorada por el procesamiento tan laborioso, e incluso en muchos casos, las secciones se desprendían de la rejilla. Este problema fue relativamente paliado introduciendo los cortes, previamente a la incubación, en estufa (Fig. 12, 13, 21).

## B. ESTUDIO HISTOQUIMICO.

El estudio ultraestructural con lectinas ha sido realizado con los resultados obtenidos con el método indirecto en el material incluido en resina LR White, por los motivos expuestos previamente.

### 1. MUCOSA GASTRICA NORMAL

El marcaje con oro coloidal de las glucoproteínas mucosas del epitelio gástrico aparentemente normal, reveló una gran heterogeneidad en cuanto a la intensidad de reacción en cada célula.

En las células epiteliales superficiales y foveolares, del antro y cuerpo gástrico, encontramos intensa reacción positiva, en la mayoría de los casos, en las vacuolas mucosas maduras y en la zona del aparato de Golgi con PNA, WGA, SBA y UEA-I (Fig. 2, 3, 4, 5). Con la lectina DBA la reacción fue menos evidente y en células aisladas. Observamos gránulos mucosos bifásicos con un marcaje periférico y una zona, más o menos central, electrón-densa, negativa para PNA (Fig. 4) y ocasionalmente para WGA (Fig. 5). La tinción del ribete microvellositario y glucocálix fue manifiesta con WGA y UEA-I.

El moco extracelular adherido a la superficie mucosa fue marcado fundamentalmente con PNA (Fig. 3, 4) y

UEA-I. El marcaje con la lectina WGA fue nulo o muy discreto.

Las vacuolas mucosas de las células del cuello glandular se tiñeron, así mismo, con todas las lectinas, excepto con DBA.

En las células parietales obtuvimos marcaje del moco perinuclear con PNA (Fig. 6B), WGA y UEA-I. También observamos, con estas mismas lectinas, marcaje más escaso a nivel de los sistemas canaliculares intracelulares (Fig. 6A).

El marcaje del aparato de Golgi fue difícil de valorar debido a la mala preservación ultraestructural de esta organela. Cuando la identificación fue posible, observamos como la lectina PNA marcaba fundamentalmente las cisternas de la cara de maduración (trans), aunque también se advirtió reacción sobre la cara de formación (cis) (Fig. 7, 8). La lectina WGA marcó fundamentalmente la cara intermedia y trans. Las tres caras del complejo de Golgi fueron marcadas, en algunos casos, con la lectina SBA (fig. 9), mientras que en otros la intermedia fue negativa y sólo se observó reacción en las caras cis y trans (Fig. 10). En muchos de éstos la reacción sobre la cara cis "dibujaba" la convexidad de ésta con respecto al núcleo (Fig. 10).

El resultado más importante con la lectina SBA fue el marcaje obtenido, en 5 casos, sobre el retículo endoplásmico rugoso. Esta reacción fue focal y ocurrió

sobre las membranas y en el interior del espacio de la lumen del retículo (Fig. 11).

Ocasionalmente observamos marcaje de estructuras nucleares con PNA, WGA, SBA y DBA. También con WGA advertimos reacción en las membranas basales, así como en los gránulos de los mastocitos, y con UEA-I sobre el ribete luminal de las células endoteliales.

En los casos que realizamos incubación con dos lectinas los resultados más relevantes fueron obtenidos con la combinación PNA-SBA y PNA-WGA. Con la primera combinación, en células epiteliales foveolares y superficiales, la reacción con PNA se localizó fundamentalmente sobre las vacuolas mucosas y la reacción con SBA sobre la zona del Golgi, más en la cara de maduración (trans) (Fig. 13). En las vacuolas de moco también advertimos marcaje con SBA pero fue menos intenso que con PNA (Fig. 12). Con el doble marcaje PNA-WGA apreciamos mayor concentración de restos de Gal sobre la zona del Golgi que de NAc-Glc.

## 2. MUCOSA GASTRICA METAPLASICA

En 28 de los 35 casos con carcinoma estudiados encontramos focos de metaplasia adyacentes a la neoplasia. No clasificamos la metaplasia en sus variedades ya que no es objetivo de este trabajo el estudio histoquímico convencional de esta patología gástrica.

En las áreas metaplásicas advertimos, en general, una reacción con todas las lectinas menos intensa que en el epitelio aparentemente normal. La diferencia en la intensidad de marcaje fue más evidente con WGA.

El moco de las células caliciformes se marcó con menor intensidad que el moco de las células normales con todas las lectinas utilizadas (Fig. 14, 15). Sin embargo en muchos casos, las células columnares mucosas presentaron intensa reacción con SBA y PNA (Fig. 16).

El moco extracelular en estas áreas metaplásicas fue positivo con PNA (Fig. 16) y discretamente con UEA-I y, al igual que en el moco adherido a las células de la mucosa normal, fue constantemente negativa la reacción con WGA.

La reacción en las células absortivas columnares fue observada, fundamentalmente con UEA-I, WGA, PNA y SBA, sobre el ribete microvellositario y moco de la zona apical del citoplasma (Fig. 17). Con PNA obtuvimos marcaje del aparato de Golgi, que resultó ser similar al observado en las células mucosas del epitelio normal, es

decir, sobre las caras cis y trans. Similar reacción fue obtenida con WGA sobre estas estructuras.

### 3. MUCOSA GASTRICA NEOPLASICA

Al igual que en la mucosa gástrica metaplásica, la disminución del marcaje con todas las lectinas fue el hallazgo más sobresaliente en todos los casos de carcinoma.

#### a. Carcinoma gástrico de tipo "célula intestinal"

De los 20 casos de este tipo tumoral estudiados sólo en 14 obtuvimos reacción positiva con todas las lectinas.

En los casos positivos el marcaje fue zonal, coexistiendo células positivas junto a otras con escasa o ninguna reacción. En general, ésta fue menos intensa que en la mucosa normal y metaplásica.

El marcaje más llamativo en los casos bien diferenciados fue obtenido con la lectina PNA y WGA, localizándose en las vacuolas mucosas supranucleares (Fig. 18), glucocálix y moco luminal. Fue evidente, así mismo, la tinción del moco observado en las luces intracitoplasmáticas (Fig. 19).

Con la lectina SBA la reacción en el moco de las vacuolas del citoplasma apical fue menos intensa que

con PNA y WGA (Fig. 20). Sin embargo, obtuvimos marcaje de la zona del Golgi, aunque éste fue escaso y de modo disperso sin concentrarse sobre alguna de las caras de esta organela (Fig. 20). Una distribución azarosa, similar a la descrita, fue observada al marcar conjuntamente el aparato de Golgi con PNA y WGA (Fig. 21).

La reacción con UEA-I fue generalmente débil y localizada en el ribete microvellositario.

#### b. Carcinoma gástrico de tipo difuso

Estudiamos 15 casos de este tipo tumoral, observando en todos ellos la presencia de los tres tipos de células descritos clásicamente (A, B y C) (79). Al igual que en los carcinomas de tipo intestinal, la reacción con lectinas fue heterogénea dentro de la población tumoral, coexistiendo células neoplásicas positivas con otras negativas.

Los tipos A y B (estadio inicial e intermedio de la diferenciación, respectivamente) fueron positivos para PNA, WGA, SBA y DBA. Fue muy intensa la reacción con la lectina WGA a nivel de los gránulos oscuros pequeños y de mediano tamaño.

El marcaje de estos tipos celulares con UEA-I fue muy débil o nulo. Sin embargo, el moco de las células en "anillo de sello" (células tipo C) fue positivo para

esta lectina y con menor intensidad para el resto, a excepción de WGA (fig. 22).

La presencia de luces intracitoplasmáticas fue observada frecuentemente en esta variedad histológica de carcinoma. El marcaje del moco contenido en estos espacios luminales intracelulares fue intenso con la lectina WGA, así como el tapizamiento microvellositario (Fig. 23). La reacción con esta lectina sobre estas estructuras no fue observada en todos los casos. LLama la atención que el moco luminal intra y extracelular reaccione tan intensamente con la lectina WGA a diferencia del moco extracelular del epitelio normal y metaplásico, donde el marcaje fue escaso o nulo.

V. DISCUSSION

## A. METODOLOGIA.

La detección de los lugares intracelulares de unión de las lectinas ha estado muy limitada. Esta limitación es consecuencia de la pobre penetración de estas macromoléculas en el interior de células y tejidos (25, 26, 179). En consecuencia, la investigación ultraestructural de las secreciones glucoproteicas se ha visto poco desarrollada, existiendo escasas publicaciones en relación con las mucinas gástricas (25, 26, 196, 197).

En el presente trabajo hemos comprobado como es posible estudiar, con lectinas, la composición de estas mucinas en microscopía electrónica utilizando una resina acrílica denominada LR White (116, 153). La preservación de la ultraestructura celular nos ha permitido identificar los lugares de unión de las lectinas, sin necesidad de realizar ningún procedimiento de "etching" (116, 165, 170). Esto se debe a que este medio de inclusión tolera una deshidratación parcial del tejido (153), y por tanto, permite el paso de macromoléculas como lectinas. Sin embargo, se ha sugerido que las partículas marcadoras (oro coloidal, en este caso) podrían reducir la capacidad de penetración limitando la localización de las lectinas a las capas más superficiales de las secciones tisulares ultrafinas. Por ello, Ellinger (116) recomienda el empleo de lectinas conjugadas con peroxidasa. En nuestra opinión, este problema ha sido solventado utilizando una

técnica indirecta con el método avidina - biotina (158) con resultados satisfactorios. En las secciones que fueron incubadas con el método directo (lectina - oro coloidal) fue evidente la menor intensidad de marcaje en comparación con el método indirecto. Este hecho podría estar relacionado con la sugerencia referida previamente, aunque nos inclinamos por la mayor sensibilidad del método ABC (159) como causa del incremento en el marcaje con oro coloidal.

Existe un acuerdo general entre los diferentes investigadores acerca de la necesidad de realizar tratamientos para aumentar la hidrofilia cuando se utilizan resinas de tipo epoxy. Así, Roth, en 1983 (193), realizó un estudio ultraestructural de mucosa duodenal de ratas incluida en resina Lowicryl y epon. En las muestras incluidas en esta última resina no advirtió tinción o fue mínima, sin realizar "etching". Nuestros resultados con la resina Spurr indican que es posible obtener marcaje con oro coloidal sin realizar ningún método para aumentar la hidrofilia, aunque obviamente el marcaje fue de menor intensidad comparándolo con el obtenido en las muestras incluidas en resina acrílica.

En cuanto a las condiciones en las que se realizan los diferentes pasos del procesado de las muestras, nuestra opinión coincide con la expresada por Bendayan y cols. (164), en el sentido de que éstas dependen del tipo de sustancia y tejido que se pretenda estudiar. Todos los

pasos que intervienen en el desarrollo de estas técnicas son susceptibles de modificar los componentes tisulares.

La mejor tinción fue obtenida fijando en glutaraldehído durante 1 hora, deshidratando en cortos periodos de tiempo desde etanol al 70%, e incubando con la lectina durante 1 hora. Estas condiciones son similares a las utilizadas por otros autores (116, 169). Pensamos que la deshidratación exclusiva con etanol al 70%, como recomienda Newman (167), puede conducir a inconvenientes a la hora de identificar los lugares de unión de las lectinas.

En los casos incluidos en resina Spurr se realizó posfijación con osmio, sin afectar, aparentemente, al marcaje con lectinas. Clásicamente, se ha obviado el uso de osmio en inmunohistoquímica ultraestructural por razones de pérdida de antigenicidad. En la literatura revisada no hemos encontrado ningún trabajo con lectinas en microscopía electrónica en el que se use esta sustancia tras la fijación. Sin embargo, Bendayan y Zollinger (168) demostraron, en tejido pancreático de rata incluido en epon, que la osmificación no deterioraba la antigenicidad si se empleaban después agentes oxidantes.

En resumen, nuestros resultados muestran la capacidad de esta técnica post-inclusión para la localización ultraestructural de oligosacáridos con lectinas biotiniladas, en los diferentes compartimentos y membranas celulares, así como en los productos de secreción y en el moco extracelular. Los controles realizados confir-

man que el marcaje obtenido depende de la interacción específica del receptor sacárido con su lectina.

## B. GLUCOPROTEINAS GASTRICAS

### 1. MUCOSA GASTRICA NORMAL.

Las GP mucosas del estómago están constituidas fundamentalmente por 4 sacáridos: NAc-Gal, NAc-Glc, Gal y Fuc (18, 23). Nuestros resultados confirman este dato, ya que con las lectinas que interaccionan con dichos azúcares el marcaje fue constante en el moco de las células epiteliales gástricas. Generalmente, la tinción fue más evidente con PNA, WGA y SBA que con UEA-I, lo que sugiere que las hexosaminas están en mayor proporción que la fucosa en la estructura ramificada de la cadena carbohidratada. En este sentido, Schrager (18), mediante estudios con cromatografía líquido - gas, detectó que el azúcar que aparece en mayor proporción en el moco gástrico aspirado es la glucosamina. Del mismo modo, Fischer y cols. (11), empleando cromatografía en gel de agarosa unido a diferentes lectinas y cromatografía en gas, obtuvieron resultados similares a los de Schrager (18). Además, observaron que la relación entre hexosaminas y galactosa era de 3:1. Para estos autores (11) las lectinas tienen mayor afinidad por los componentes del moco rico en hexosaminas, lo que cuestiona si realmente estos sacáridos son los más abundantes en el moco gástrico. No obstante, nuestros resultados así lo sugieren.

La presencia de GP del plasma en la secreción mucosa podría oscurecer la relación cuantitativa real de los componentes carbohidratados de las mucinas gástricas. Sin embargo, como han demostrado numerosos autores (10, 12, 15, 18, 207, 239), la secreción mucosa gástrica no contiene manosa, o bien está en poca cantidad (197), mientras que este sacárido está en gran cantidad en las GP plasmáticas (207); además, estas GP no contienen galactosamina (207).

Los diferentes investigadores están de acuerdo al señalar que el primer azúcar de la cadena de sacáridos en las GP gástricas, y en general de las GP ligadas a la cadena proteica por un enlace O-glicosídico, es la NAc-Gal. Este dato ha sido constatado tanto en estudios bioquímicos (18, 23) como histoquímicos (90, 95). Roth, en 1984 (90), y posteriormente Pavelka (95), obtuvieron marcaje ultraestructural sobre la cara cis del aparato de Golgi con la lectina HPA. Nuestras observaciones con la lectina SBA coinciden con las de estos autores (90, 95) y ya que sólo con esta lectina obtuvimos marcaje sobre la cara de formación del aparato de Golgi, es sugestivo pensar que la NAc-Gal sea el "puente de unión" con la cadena de aminoácidos.

Existen controversias en la literatura revisada respecto al lugar dónde se llevaría a cabo la unión de los dos componentes de las GP mucosas. Para algunos autores (50, 51) la glicosilación es una de la funciones

del RER, y así se ha demostrado (87, 89, 90) que en esta organela se inicia la síntesis de los oligosacáridos ligados en -N (constituyentes de las GP no mucosas), ocurriendo los últimos pasos en el Golgi. La capacidad de este complejo para la maduración de GP y glicolípidos ha sido confirmada por numerosos estudios autorradiográficos, enzimológicos y de fracciones celulares (59-64). Además, se sabe que el complejo de Golgi es el principal director de la circulación macromolecular, es decir, el lugar de divergencia de las rutas de transporte intracelular desde el RE (52, 58, 59). Sin embargo, existen menos datos en relación al lugar de unión de la NAc-Gal a la serina o treonina en las GP mucosas. Para Hanover (89) y Kim (92) el enlace se realizaría en los microsomas lisos, mientras que para Strous (93) se llevaría a cabo en los ribosomas sobre la cadena proteica. Para otros autores (90, 94, 95) ocurriría la unión en la cara de formación o cis del aparato de Golgi. Estos autores (90, 95) fundamentan su hipótesis en el marcaje histoquímico ultraestructural de este compartimento con la lectina HPA en células mucosas intestinales. Como comentamos previamente, nuestros resultados con SBA apoyarían esta idea. Sin embargo, hemos de mencionar el marcaje focal que hemos obtenido con esta lectina sobre la membrana y lumen del RER. Aunque se trata de una observación casual (sólo en 5 casos) y de modo focal, este hallazgo es lo suficientemente atractivo para pensar que si bien lo más

frecuente es que el lugar de "acoplamiento" de la NAc-Gal sea el complejo de Golgi, podría ocasionalmente situarse en el RER sobre la cadena proteica en formación. Otros autores (13, 220) con técnicas histoquímicas convencionales aplicadas a microscopía electrónica (PAS y método de Thiéry) observaron exclusivamente tinción del aparato de Golgi, con un gradiente de la misma desde la parte proximal a la distal. Los estudios histoquímicos ópticos con lectinas (10, 12, 24, 218, 239) han sugerido, sin poder confirmar, que la síntesis de las GP se realiza en dicho aparato por la frecuente tinción supranuclear observada. El marcaje obtenido con SBA, en nuestros casos, sobre la cara trans del Golgi y vacuolas maduras, sugiere además que la NAc-Gal no sólo es el primer azúcar sino que puede ocupar posiciones intermedias y periféricas en la secuencia de carbohidratos.

En general, el marcaje obtenido con las diferentes lectinas del resto de las estructuras celulares coincide con el de otros autores, con ciertas diferencias sobre todo en relación con PNA. Desde el punto de vista óptico, la mayoría de los investigadores refieren resultados positivos con esta lectina a nivel de región supranuclear, vacuolas mucosas y zona apical del citoplasma celular (12, 24, 204, 218, 239). Sin embargo, Fischer y cols. (10) no la observaron en células superficiales y foveolares, y sí en la región supranuclear de las células indiferenciadas del istmo y cuello. Para estos autores

(10) la tinción de estas células estaría en relación con una glicosilación incompleta, lo que explicaría que el disacárido  $\beta$ -Gal (1-3) NAc-Gal se sitúe en posición terminal. Sato (26) obtiene tinción con PNA en la zona del Golgi, superficie apical y moco adherido, mientras que no la observa en la secreción mucosa madura apical de las células superficiales. En este mismo trabajo (26), este autor confirma estos resultados de microscopía óptica con los obtenidos a nivel ultraestructural, argumentando que la adición de otros sacáridos sería la causa de la tinción negativa de las vacuolas mucosas maduras, mientras que la presencia de actividad glicosidasa a nivel apical explicaría el marcaje sobre dicha zona. La otra posibilidad que apunta Sato (26), acerca de la falta de permeabilidad para esta lectina de la membrana de las vacuolas mucosas, es más cuestionable.

Nuestras observaciones con PNA sugieren que la Gal y el disacárido  $\beta$ -Gal (1-3) NAc-Gal pueden ocupar tanto posiciones centrales, intermedias como periféricas en la estructura carbohidratada. La adición del monosacárido Gal se ha demostrado, por estudios autorradiográficos (60), enzimológicos (223), inmunocitoquímicos (229) e histoquímicos con lectinas (55, 95, 228) realizados en diferentes tejidos, que se localiza sobre la cara de maduración e intermedia del aparato de Golgi. Este hecho coincide con el marcaje obtenido con PNA, en nuestros casos, sobre estos compartimentos. Además, hemos observa-

do, ocasionalmente, con esta lectina reacción sobre la cara de formación.

Fue llamativa la presencia de gránulos mucosos maduros, electrón-densos, con marcaje periférico con PNA y con la zona central sin reacción. Este hallazgo podría estar en relación con los gránulos bifásicos, descritos por Spicer y cols. ((13) en la mayoría de las células mucosas superficiales, que presentan una zona periférica de mucosustancias neutras (PAS +) y una zona central, más densa, también constituida por mucosustancias neutras. Así mismo, Ellinger y Pavelka (116) advirtieron una tinción periférica en los gránulos secretores de las células de Paneth con la lectina RCA, sin marcaje central. Esta presencia de gránulos mucosos con reacción periférica fue advertida, de modo ocasional, con WGA.

Con respecto a la NAc-Glc, nuestras observaciones sugieren que este azúcar se añade tras la NAc-Gal en la cara intermedia y trans del aparato de Golgi. Esta sugerencia coincide con la estructura descrita por Hounsell (23) en las mucinas gástricas de las ovejas. La presencia de marcaje en la secreción mucosa madura indica que la NAc-Glc puede ocupar, además, otras posiciones en la cadena de carbohidratos. Fue, no obstante, sorprendente la negatividad manifiesta con la lectina WGA en el moco extracelular. Este hallazgo no ha sido encontrado referido en la bibliografía consultada. Podríamos pensar que otros sacáridos añadidos posteriormente "enmascara-

rían" el receptor de esta lectina, impidiendo la unión con aquél. Pero ya que WGA es una endolectina, según la clasificación de Gallagher (122), no podemos comprender el por qué de la ausencia de marcaje a ese nivel. En este sentido, Suzuki (196) demostró, en estómagos de rata, que tras realizar un tratamiento oxidativo con ácido peryódico previo a la incubación con WGA, la tinción con esta lectina, al igual que con Con A, aumentaba. Esta observación sugiere que tanto la Man como la NAc-Glc deben ocupar posiciones no terminales, por lo que la tinción difícilmente es inhibida por la oxidación.

El moco extracelular fue marcado fundamentalmente con PNA y UEA-I, por lo que al tratarse de exolectinas, la Gal, el disacárido  $\beta$ -Gal (1-3) NAc-Gal y la Fuc, se constituyen en nuestro estudio como los azúcares que más frecuentemente ocupan posiciones periféricas. En el trabajo referido de Suzuki (196), este autor llega a la misma conclusión con respecto a la Gal, ya que la tinción con RCA es inhibida tras el efecto oxidativo del ácido peryódico.

Las vacuolas mucosas de las células del cuello glandular fueron teñidas con todas las lectinas, a excepción de DBA. En muchos trabajos histoquímicos con lectinas a nivel óptico se describe la ausencia de NAc-Gal a este nivel (5, 10, 204, 240), aunque Bur (5) refiere tinción con DBA, e Ito (197) encuentra tinción difusa con

casi todas las lectinas excepto con DBA. Rubí (24) describió una tinción intensa en estas células tras tratamiento con sialidasa. No hemos encontrado en la literatura ningún trabajo ultraestructural que haga referencia a este aspecto. De cualquier forma, nuestros resultados indican que la composición del moco secretado por las células del cuello no debe diferir mucho del de las células superficiales y foveolares.

Nosotros hemos relacionado la tinción ocasional observada con DBA con el alto peso molecular (pm) de esta lectina, en comparación con el resto de las utilizadas en este estudio, a excepción de UEA-I. Este elevado pm dificultaría su penetración en las estructuras celulares. Sin embargo, UEA-I, que tiene un pm aún mayor, marcó el moco intra y extracelular en todos los casos, aunque con menor intensidad que las otras 3 lectinas. El marcaje con esta lectina, como ya se ha comentado, fue más evidente en el moco extracelular, ya que la  $\alpha$ -L-Fuc ocupa posiciones terminales (10, 12, 18, 23, 218).

Los resultados tan variables en cuanto a la intensidad de reacción para cada lectina en cada caso, sugieren la existencia de heterogeneidad en la composición glicoproteica, o bien la presencia de cadenas carbohidratadas en diferente grado de glicosilación. En este punto coincidimos con Fischer y cols. (10). Para McCartney (204) esta variabilidad está relacionada con el "estado secretor" del individuo y el grupo sanguíneo.

Para este autor la tinción con PNA sólo es observada en los "no secretores" (25% de la población según Watkins (201)). Ya que el 75% de la población corresponde a individuos "secretores", pensamos, a la vista de nuestros resultados con PNA, que esta relación no debe ser del todo cierta.

Con respecto a las células parietales existen resultados contradictorios. La mayoría de los autores (10, 24, 197, 218, 219) obtienen tinción con lectinas en los sistemas canaliculares y túbulovesiculares en microscopía óptica. Generalmente, ésta fue evidente con HPA, PNA, LFA, UEA-I y WGA. Con DBA Ito (197) obtuvo reacción, mientras que Segura (218) no. Rubí (24) tampoco la observó con PNA. Nuestros resultados coinciden con Segura (218) en relación a la ausencia de NAc-Gal como sacárido terminal. Este hecho podría interpretarse, siguiendo a Fischer (10), en base a una glicosilación incompleta presente en células especializadas en la secreción ácida y no mucosa. Por tanto, podríamos pensar que existen diferencias enzimáticas, respecto a esta actividad, entre estos dos tipos celulares. La tinción perinuclear a nivel óptico, referida por algunos autores (24, 239), podría corresponder en nuestro trabajo al marcaje observado sobre gránulos mucosos dispuestos en esa localización.

Algunos autores han señalado la presencia de restos glicosilados en las regiones de la cromatina, tanto heterocromatina (236) como eucromatina (238). Según

Kan (237) estos residuos pueden jugar un importante papel en la transcripción del ADN. En varios de nuestros casos pudimos observar marcaje de estructuras nucleares con WGA, DBA, PNA y SBA.

Al igual que Bussolati (163), observamos marcaje, de modo ocasional con WGA, sobre los gránulos de los mastocitos. Aunque se ha referido que el uso de estreptavidina obviaría esta tinción inespecífica, no es del todo cierto esta afirmación. Sin embargo, no hemos observado en los controles reacción inespecífica entre la estreptavidina y biotina endógena.

## 2. MUCOSA GASTRICA METAPLASICA.

El concepto de metaplasia intestinal (MI) es heterogéneo, ya que esta alteración del epitelio gástrico se encuentra asociada frecuentemente al carcinoma y también a lesiones benignas. No obstante, se ha relacionado la presencia de áreas de MI incompleta con el carcinoma gástrico de tipo intestinal (218, 241-244). En nuestros casos hemos observado zonas metaplásicas en relación con los dos tipos de carcinoma. En el estudio ultraestructural realizado por Nevalainen (70) se describen células tumorales de ambos tipos histológicos de carcinoma con características similares a las células metaplásicas. Del mismo modo, Tatematsu (81) encuentra características ultraestructurales de células intestinales en células en anillo de sello. Por lo tanto, en la actualidad se cuestiona si la MI se relaciona exclusivamente con el tipo intestinal de carcinoma.

Con los métodos histoquímicos convencionales se ha demostrado la presencia de sialomucinas en las células caliciformes (24, 213, 218). En los estudios ópticos realizados con lectinas sobre esta patología (10, 24, 218, 239) se ha observado un incremento de tinción tras tratamiento con neuroaminidasa, lo que confirma la sialización del moco "enmascarando" los receptores de lectinas.

En este tipo de epitelio metaplásico, nuestros resultados expresan una disminución apreciable en el marcaje del moco con todas las lectinas utilizadas, respecto al de la mucosa normal. Este hecho podría estar en relación con la sobreespecialización del moco. Con la lectina que menor intensidad obtuvimos fue con WGA y de modo sorprendente, no encontramos explicación para el marcaje ocasional tan abundante con PNA y SBA en células caliciformes. Podríamos cuestionarnos la presencia de AcS en estos casos, o bien si éste no sería una "barrera" para la unión de estas lectinas a sus receptores. También cabe la posibilidad, como apuntaron Bur y Franklin (12), de una pérdida de la actividad glicosiltransferasa, o como señalaron Fischer y cols. (10) (en las células indiferenciadas de la mucosa normal) que se trate de cadenas en diferente grado de glicosilación. Por otra parte, cabe resaltar que el moco adherido al epitelio metaplásico, al igual que en la mucosa normal, no se tiñó con WGA.

La presencia de NAc-Glc y Fuc en las células columnares ha sido muy discutida (10, 24, 204, 218, 240, 245). Fischer (10), sin hacer distinción entre los diferentes tipos de metaplasia, no obtuvo tinción con UEA-I y WGA, mientras que otros autores (240, 245) obtuvieron positividad con UEA-I, y otros (24, 218) con ambas lectinas. Nuestros resultados coinciden con estos últimos. Segura (218) sólo observó tinción con WGA y UEA-I a nivel

de las vellosidades de las células columnares absortivas. El marcaje en nuestros casos se localizó sobre el ribete microvellositario y zona apical del citoplasma.

La NAc-Glc y Fuc se han observado en las células absortivas de la mucosa duodenal (218), pero no en las de intestino delgado y colon (218, 232). En esta última localización, Yonezawa y Nakamura (232) encontraron restos de  $\alpha$ -L-Fuc en la mucosa colónica patológica, mientras que en normalidad este azúcar es sustituido por AcS. Por otra parte, Pongchairerks (245) observó tinción positiva en las células columnares de la MI completa y negativa en las de la mucosa intestinal normal con las lectinas UEA-I, DBA y PNA. En este sentido, en las células columnares mucosas de la MI incompleta nuestros resultados con PNA y SBA coinciden con los de Rubí (24) y contrastan con los de Pongchairerks (245).

Por todo lo anterior, es obvio pensar que posiblemente existan diferencias en la composición glicoproteica del moco de las células columnares metaplásicas y de las células de la mucosa intestinal normal. Así, desde el punto de vista bioquímico se pone en duda la relación, por otra parte ya cuestionada, entre el carcinoma de tipo intestinal y la metaplasia intestinal.

### 3. MUCOSA GASTRICA NEOPLASICA.

A la vista de nuestras observaciones, cabe destacar, como hallazgo más relevante en ambos tipos de carcinomas, la importante disminución en el marcaje del moco con todas las lectinas utilizadas. Además, la coexistencia de células positivas junto a otras negativas, con la misma lectina y en el mismo campo tumoral, da idea de la variabilidad existente en la composición glicoproteica de los elementos neoplásicos.

En general, existen evidencias considerables de la presencia en carcinomas de una glicosilación aberrante. Este hecho ha sido bien documentado en los carcinomas gástricos, donde la expresión de GP de grupos sanguíneos (en individuos "secretores") está a menudo alterada (17, 204-206). En este sentido, la correlación observada por McCartney (204) entre la tinción con PNA y la condición de individuo "no secretor" desaparece en los carcinomas.

La transformación maligna se ha asociado, por algunos autores (204, 246), con un incremento en la sialización del moco y en la ramificación de las GP de membrana. Estos cambios se piensa que alterarían la adhesión celular, favoreciendo por tanto la infiltración tumoral y las metástasis (17, 247). Smets (246) encuentra que la transformación neoplásica, además de asociarse a la sobresialización del moco, también se relaciona con la

formación de ramificaciones "anómalas" en las cadenas azucaradas que contienen fucosa.

En los estudios con lectinas es difícil de separar las alteraciones ocurridas en la tinción de las GP de membrana de los cambios acaecidos en las GP secretadas en los carcinomas gástricos.

Con la lectina PNA, utilizada en cromatografía, Fischer y cols. (11) observaron que la relación existente entre hexosaminas y galactosa, en el moco aislado de carcinomas gástricos, es de 10:1, mientras que en normalidad es de 3:1. Estos autores concluyeron que la causa radicaría en una alteración en la elongación de la cadena carbohidratada.

No hemos encontrado ningún trabajo histoquímico ultraestructural con lectinas en carcinomas gástricos. En investigaciones a nivel de microscopía de luz, algunos autores (24, 204, 239) ponen de manifiesto el enmascaramiento de los receptores glucídicos por el ácido siálico en el carcinoma gástrico, excepto para WGA (quizás por tratarse de una endolectina). Fischer (10) observa este hecho con PNA en los carcinomas difusos, y Bur (12) en los de tipo intestinal. Para Macartney (204) el mecanismo por el que se incrementa la sialización de las regiones terminales de las cadenas carbohidratadas es desconocido. Ya que la fucosilación y sialización son pasos bioquímicos alternantes, una disminución en el primero produciría un aumento en el segundo. Cambios en los enzimas implica-

dos (fucosil y sialil-transferasa) podrían explicar, según este autor (204) estas observaciones. Para Schauer (248) podría existir otro mecanismo más complejo relacionado con una alteración en los receptores de la enzima sialil-transferasa, ocasionando que dicha enzima catalice la sialización de diferentes receptores.

En nuestro estudio, dentro de la disminución general en el marcaje con lectinas, observamos en los carcinomas de tipo intestinal bien diferenciados la presencia de reacción con PNA y WGA sobre las vacuolas mucosas supranucleares, glicocálix y moco luminal, siendo aún menos intensa con SBA. En relación con PNA, estos hallazgos concuerdan con los de Fischer y cols. (10, 11). La presencia en el moco luminal de Gal,  $\beta$ -Gal 1-3 NAc-Gal y sobre todo de NAc-Glc (este último no observado en el moco luminal de la mucosa normal y metaplásica), pensamos que podría estar relacionada con una alteración en la elongación de la cadena glicoproteica, y por tanto coincidimos con Fischer (11) en este aspecto. Si la base de estos cambios es o no de naturaleza enzimática precisa de estudios más profundos enfocados en este sentido. El marcaje disperso de la zona del Golgi con SBA, sin concentrarse sobre algunas de sus caras como en la mucosa normal, podría encuadrarse dentro del posible disturbio enzimático. La debilidad del marcaje con UEA-I, junto a la disminución general con el resto de lectinas, no podemos determinar si está relacionada con la competencia

con el ácido siálico y con la sobresialización, respectivamente.

En los carcinomas difusos fue relevante el marcaje con WGA, tanto sobre los gránulos mucosos, como sobre el tapizamiento microvellositario y luces de los "microquistes intracelulares" descritos por Sasano (76). Al igual que Nevalainen (78), nosotros hemos observado estas estructuras en ambos tipos de carcinomas. Estos resultados con WGA coinciden con estudios ópticos realizados en nuestro laboratorio (24, 239). También fue intenso el marcaje obtenido sobre los gránulos mucosos de las células en "anillo de sello" con UEA-I, mientras que éste fue muy débil o nulo en las células tumorales en estadio inicial e intermedio (células en estadio A y B según Yamashiro (79)). Fischer y cols. (10) también advierten una marcada positividad con esta lectina en su serie de carcinomas difusos. Para este autor (10), la reactividad con lectinas en los carcinomas aumenta con la diferenciación tumoral. En este sentido, McCartney (204) no encuentra relación entre estos dos aspectos. Nuestras observaciones con UEA-I en este tipo de carcinomas avalían la teoría de Fischer (10). La presencia de fucosa en el extremo terminal no reductor de las GP de las células tumorales bien diferenciadas hace pensar que la actividad enzimática, presumiblemente centro de las alteraciones de la glicosilación, en estos casos sería similar a la de la célula epitelial de origen.

VI. CONCLUSIONES

1. El empleo de la resina acrílica LR White y de lectinas biotiniladas, con una técnica de post-inclusión, permite el estudio ultraestructural de la composición glicoproteica de las mucinas gástricas.

2. Las GP mucosas del estómago están constituidas fundamentalmente por cuatro sacáridos: NAc-Gal, NAc-Glc, Gal y Fuc, en proporciones variables. La heterogeneidad en el marcaje con lectinas de estos azúcares podría estar relacionada con el grado de glicosilación de las mucinas.

3. La unión del primer azúcar (NAc-Gal) a la cadena proteica se realiza en la cara cis, o de formación, del aparato de Golgi. No descartamos que ocasionalmente este enlace pudiera realizarse en el RER, continuándose la maduración de la cadena carbohidratada en el complejo de Golgi.

4. Desde el punto de vista ultraestructural, Gal, Fuc y el disacárido  $\beta$ -Gal (1-3) NAc-Gal se constituyen como los azúcares que ocupan más frecuentemente las posiciones terminales en la estructura de las GP gástricas.

5. En el carcinoma gástrico existe mayor variabilidad en la composición de las GP secretadas en comparación con la metaplasia, y aún más con la mucosa normal. La presencia de NAc-Glc en el moco secretado pudiera constituirse en un marcador clínico sugestivo de la existencia de un carcinoma.

6. La heterogeneidad en la secreción GP de las células tumorales podría ser consecuencia de alteraciones, posiblemente de naturaleza enzimática, en la elongación de las cadenas azucaradas. El predominio de hexosaminas, en estos casos, sería interpretado bajo esta hipótesis.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- HOUNSELL EF, FEIZI T. Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease. *Med Biol* 1982; 60: 227.
- 2.- SPIRO RG. Glycoproteins: structure, metabolism and biology. *New Eng J Med* 1963; 269: 566-573, 616-621.
- 3.- HORI T, NISHIYAMA F, TERAMOTO A y cols. Localization of Concanavalin A binding sites in human pituitary adenoma cells as revealed by HRP - labelling method. *Acta Neuropathol* 1983; 62: 59-66.
- 4.- TAKATA K, HIRANO H. Changes in soybean agglutinin (SBA) and peanut agglutinin (PNA) binding pattern in the epidermis of the developing chick embryo. *Develop Growth Differ* 1983; 25: 299-305.
- 5.- RENNERT OM. Glycoproteins in disease. *Ann Clin Lab Sci* 1978; 8: 176-183.
- 6.- FISCHER J, KLEIN PJ, VIERBUCHEN M, FISCHER R, UHLEMBRUCK G. Lectin binding properties of glycoproteins in cells of normal gastric mucosa and gastric cancers: A comparative histochemical and biochemical study. *Cancer Detection and Prevention* 1983; 6: 137-147.

- 7.- OOKUSA Y, TAKATA K, NAGASHIMA M, HIRANO H. Lectin - binding pattern in extramammary Paget's disease by horseradish peroxidase (HRP) - labeling method - specific staining with Dolichos biflorus agglutinin (DBA). *Arc Dermatol Res* 1985; 277: 65-70.
- 8.- LEV R. The mucin histochemistry of normal and neoplastic gastric mucosa. *Lab Invest* 1966; 14: 2080-2100.
- 9.- SPICER SS, HARDIN JH, SETSER ME. Ultrastructural visualization of sulphated complex carbohydrates in blood and epithelial cells with the high iron diamine procedure. *Histochem J* 1978; 10: 435.
- 10.- FISCHER J, KLEIN PJ, VIERBUCHEN M, SCUTTA B, UHLENBRUCK G, FISCHER R. Characterization of glycoconjugates of human gastrointestinal mucosa by lectins. I Histochemical distribution of lectin binding sites in normal alimentary tract as well benign and malignant gastric neoplasms. *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 681-689.
- 11.- FISCHER J, KLEIN PJ, VIERBUCHEN M, UHLENBRUCK G, FISHER R. Characterization of glycoconjugates of human gastrointestinal mucosa by lectins. II Lectin binding to the isolated glycoproteins of normal and malignant gastric mucosa. *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 690-696.
- 12.- BUR M, FRANKLIN WA. Lectin binding to human gastric adenocarcinoma and adjacent tissues. *Am J Pathol* 1985; 119: 279-287.

- 13.-SPICER SS, KATSUYAMA T, SANNES PL. Ultrastructural carbohydrate cytochemistry of gastric epithelium. *Histochem J* 1978; 10: 309-331.
- 14.-PODDAR S, JACOB S. Mucosubstances histochemistry of Brunner's glands, pyloric glands and duodenal goblet cells in the ferret. *Histochemistry* 1979; 65: 67-81.
- 15.-SPIRO RG. Glycoproteins : their biochemistry, biology and role in human disease. *New Engl J Med* 1969; 281: 991-1001, 1043-1056.
- 16.-FORSTNER G, WESLEY A, FORSTNER J. Mucus in health and disease. New York, Plenum Press, 1982: 199-224.
- 17.-HAKDMORI SI. Aberrant glycosilation in cancer cells membranes as focused on glycolipids. *Cancer Res* 1985; 45: 2405-2414.
- 18.-SCHRAGER J. The composition and some structural features of the principal gastric glycoprotein. *Digestion* 1969; 2: 73-89.
- 19.-SCHRAGER J, DATES MDG. Further observations on the principal glycoprotein of the gastric secretion. *Digestion* 1979; 3: 231-242.
- 20.-SCHRAGER J, DATES MDG. The isolation and partial characterization of the principal gastric glycoprotein of "visible mucosa". *Digestion* 1971; 4: 1-12.

- 21.-SCHRAGER J, OATES MDG. A comparative study of the major glycoprotein isolated from normal and neoplastic mucosa. *Gut* 1973; 14: 324-329.
- 22.-OATES MDG, ROSBOTTOM AC, SCHRAGER J. Further investigations into the structure of human gastric mucin. The structural configuration of the oligosaccharide chains. *Carbohydr Res* 1974; 34: 115-137.
- 23.-HOUNSELL FF, FUKUDA M, POWELL MF, FEIZI T, HAKOMORI S. A new O-glycosidically linked tri-hexosamine core structure in sheep gastric mucin: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 92: 1143-1150.
- 24.-RUBI J. Caracterización de glicoconjugados en la mucosa gástrica normal y patológica. Su relación con el antígeno carcinoembrionario. Tesis Doctoral presentada en la Facultad de Medicina de Sevilla. 1988.
- 25.-SATO A, SPICER SS. Ultrastructural visualization of galactosyl residues in various alimentary epithelial cells with the peanut lectin - horseradish peroxidase procedure. *Histochemistry* 1982; 73: 607-624.
- 26.-SATO A, SPICER SS. Ultrastructural visualization of galactose in the glycoprotein of gastric surface cells with a peanut lectin conjugate. *Histochemical J* 1982; 14: 125-138.

- 27.-KUROSUMI K, SHUBASAKI S, UCHIDA G, TAMAKA Y. Electron microscope studies on the gastric mucosa of normal rats. *Archs Histol Jap* 1958; 15: 587-624.
- 28.-SHUBASAKI S. Experimental cytological and electron microscopic studies on the rat gastric mucosa. *Arch Histol Jap* 1961; 21: 251-258.
- 29.-HELANDER HF. Ultrastructure of gastric fundus glands of refeed mice. *J Ultrastruc Res* 1964; 10: 160-175.
- 30.-HAYWARD AF. The fine structure of gastric epithelial cells in the suckling rabbit with particular reference to the parietal cell. *Z Zellforsch* 1967; 78: 474-483.
- 31.-LILLIBRIDGE CB. The fine structure of normal human gastric mucosa. *Gastroenterology* 1964; 47: 269-290.
- 32.-RUBIN W, ROSS LL, JEFFRIES GH, SLEISENGER MH. Intestinal heterotopia. A fine structural study. *Lab Invest* 1966; 15: 1024.
- 33.-RUBIN W, ROSS LL, SLEISENGER MH, JEFFRIES GH. The normal human gastric epithelium.- A fine structural study. *Lab Invest* 1968; 19: 598-626.
- 34.-KUROSUMI K. Electron microscopic analysis of the secretion mechanism. *Intern Rev Cytol* 1961; 11: 1-124.

- 35.-KRAUSE WJ, IVEY KJ, BASKIN WN, MACKERCHER P. Ultrastructure of the human pyloric glands with emphasis on the mucous cell component. *Acta Anat* 1977; 99: 1-10.
- 36.-JOHNSON FR, YOUNG BA. Undifferentiated cells in gastric mucosa. *J Anat (Lond)* 1968; 10: 541-551.
- 37.-HAMMOND JB, LE DEUR L. Fibrillovesicular cells in the fundic glands of the canine stomach: Evidence for a new cell type. *Anat Record* 1968; 161: 393-394.
- 38.-NEWBOLD KM, MC DONALD F, ALLUM WH. Undifferentiated columnar cells on the gastric interfoveolar crest: A previously undescribed observation. *J Pathol* 1988; 155: 311-316.
- 39.-HALLY AD. Functional changes in the vacuole containing bodies of the gastric parietal cell. *Nature* 1959; 183: 408.
- 40.-SEDAR AW, FRIEDMAN MHF. Correlation of the fine structure of the gastric parietal cell (dog) with functional activity of the stomach. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 11: 349-363.
- 41.-SEDAR AW. The fine structure of the oxyntic cell in relation to functional activity of the stomach. *Ann N Y Acad Sci* 1962; 99: 9-29.
- 42.-ZALEWSKY CA, MOODY FG. Stereological analysis of the parietal cell during acid secretion and inhibition. *Gastroenterology* 1977; 73: 66-74.

- 43.-VIAL JD, ORREGO H. Electron microscope observations on the fine structure of parietal cells. *J Biophys Biochem Cytol* 1960; 7: 367-372.
- 44.-ITO S. Fine structure of the gastric mucosa. In: *Gastric secretions: mechanisms and control*. Shnitka TK (ed). Oxford, Pergamon Press, 1966.
- 45.-ITO S. Anatomic structure of the gastric mucosa. In: *Handbook of Physiology*, vol 2. Code CF, Heidel W (eds). Washington DC, American Physiological Society, 1967: 705.
- 46.-ITO S, SCHOFIELD GC. Studies on the depletion and accumulation of microvilli and changes in the tubulovesicular compartment of mouse parietal cells in relation to gastric acid secretion. *J Cell Biol* 1974; 63: 368-382.
- 47.-JAMIESON JD, PALADE GE. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I Role of the peripheral elements of the Golgi complex. *J Cell Biol* 1967; 34: 577.
- 48.-DE PIERRE JW, DALLNER G. Structural aspects of the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1975; 415: 411-472.
- 49.-REDMAN C, SABATINI D. Vectorial discharge of peptides released by puromycin from attached ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; 56: 608-615.
- 50.-KORNFELD R, KORNFELD S. Comparative aspects of glycoprotein structure. *Annu Rev Biochem* 1976; 45: 217-238.

- 51.-GIBSON R, KORNFELD S, SCHLESINGER S. A role for oligosaccharides in glycoprotein biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 1980; 5: 290-294.
- 52.-FARQUHAR MG, PALADE GE. The Golgi apparatus (complex) (1954-1981) -from artefact to center stage. *J Cell Biol* 1981; 91: 77-103.
- 53.-GOLGI O. Sur la structure des cellules nerveuses. *Arch Ital Biol* 1898; 30: 60-71.
- 54.-DUNPHY WG, ROTHMAN JE. Compartmental organization of the Golgi stack. *Cell* 1985; 42: 13.
- 55.-GRIFFITHS G, BRANDS R, BURKE B, LOUVARD D, WARREN G. Viral membrane proteins acquire galactose in trans Golgi cisternae during intracellular transport. *J Cell Biol* 1982; 95: 781-792.
- 56.-CHICHEPORTICHE Y, VASALLI P, TARTAKOFF AM. Characterization of cytoplasmically oriented Golgi proteins with a monoclonal antibody. *J Cell Biol* 1984; 99: 2200-2210.
- 57.-BERGMANN JE, SINGER SJ. Immunoelectron microscopic studies of the intracellular transport of the membrane glycoprotein (G) of vesicular stomatitis virus infected Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* 1983; 97: 1777-1787.
- 58.-ROTHMAN JE. The Golgi apparatus: two organelas in tandem. *Science* 1981; 213: 1212-1219.
- 59.-THMAN JE, LENARD J. Membrane traffic in animal cells. *TIBS* 1984; 9: 176-178.

- 60.-KRAMER MF, GENZE JJ. Glycoprotein transport in the surface mucous cells of the rat stomach. *J Cell Biol* 1977; 73: 533-547.
- 61.-KORNFELD S. Oligosaccharide processing during glycoprotein biosynthesis. In: *The Glycoconjugates*. Horowitz M, Pigman R (eds). New York, Press Inc, 1982: 3-23.
- 62.-TARTAKOFF A. The Golgi complex. Crossroads for vesicular traffic. *Int Rev Exp Pathol* 1980; 22: 228-251.
- 63.-TARTAKOFF A. Simplifyng the complex Golgi. *Trends Biochem Sci* 1982; 7: 174-176.
- 64.-TARTAKOFF AM, VASALLI P. Lectin - binding as markers of Golgi subcompartments: proximal to distal maturation of oligosaccharides. *J Cell Biol* 1983; 97: 1243-1248.
- 65.-JARVI O, LAUREN P. On the role of heterotopia of the intestinal epithelium in the pathogenesis of gastric cancer. *Acta Path Microbiol Scand* 1951; 29: 26-43.
- 66.-MING SC, GOLDMAN H, FRIEDMAN DG. Intestinal metaplasia and histogenesis of carcinoma in human stomach. Light and electron microscopic study. *Cancer* 1967; 20: 1418-1429.
- 67.-RUBIN W, ROSS LL, JEFFRIES GH, SLEISENGER MH. Some physiological properties of heterotopic intestinal epithelium. Its role in transporting lipid into the gastric mucosa. *Lab Invest* 1967; 16: 813-827.

- 68.-CHIAO SF, WEISBERG H, GLASS BBJ. Ultrastructure of the gastric mucosa in atrophic gastritis y gastric atrophy. *Gastroenterology* 1968; 54: 1225.
- 69.-TARGILA S, TELKKA A, SIURALA M. Ultrastructure of various metaplasias of the stomach. *Acta Path Microbiol Scand* 1969; 77: 187-195.
- 70.-NEVALAINEN TJ, JARVI O. Ultrastructure of intestinal and diffuse type gastric carcinoma. *J Pathol* 1977; 122: 129-136.
- 71.-LAUREN P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so called intestinal - type carcinoma. An attempt at a histo - clinical classification. *Acta Path Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49.
- 72.-STEMMERMAN GN, BROWN C. A survival study of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. *Cancer* 1974; 33: 1190-1195.
- 73.-MING SC. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer* 1977; 39: 2475-2485.
- 74.-SUGANO H, NAKAMURA K, KATO Y. Pathological studies of human gastric cancer. *Acta Pathol Jpn* 1984; 32: 329-347.
- 75.-GOLDMAN H, MING SC. Fine structure of intestinal metaplasia and adenocarcinoma of the human stomach. *Lab Invest* 1968; 18: 203-210.

- 76.-SASANO N, NAKAMURA K, ARAI M, AKAZAKI K. Ultrastructural cell patterns in human gastric carcinoma compared with non neoplastic gastric mucosa. Histogenetic analysis of carcinoma by mucin histochemistry. *J Natn Cancer Inst* 1969; 43: 783-802.
- 77.-KONDO K, TAMURA H, TANIGUCHI H. Intracellular microcyst in gastric cancer cells. *J Electron Microsc* 1970; 19: 41-49.
- 78.-NEVALAINEN TJ, JARVI O. Intracellular cysts in gastric carcinoma. *Acta Path Microbiol Scand* 1976; 84: 517-522.
- 79.-YAMASHIRO K, SUZUKI H, NAGAYO T. Electron microscopic study of signet ring cells in diffuse carcinoma of the human stomach. *Virchows Arch A Path Anat Hist* 1977; 374: 275-284.
- 80.-JOHANNESSEN JV. Stomach. In: *Electron microscopy in human medicine*, vol 7. Mc Graw-Hill Ed. International Book Company 1980: 108-207.
- 81.-TATEMATSU M, FURIHATA C, KATSUYAMA T y cols. Gastric and intestinal phenotypic expressions of human signet ring cell carcinomas revealed by their biochemistry, mucin histochemistry and ultrastructure. *Cancer Res* 1986; 46: 866-872.
- 82.-SUGIHARA H, HATTORI T, FUKUDA M, FUJITA S. Cell proliferation and differentiation in intramucosal and advanced signet ring cell carcinomas of the human stomach. *Virchows Arch A* 1987; 411: 117-127.

- 83.-TRIER JS. Studies on small intestinal crypt epithelium. I The fine structure of the crypt epithelium of the proximal small intestine of fasting humans. *J Cell Biol* 1963; 18: 559-620.
- 84.-SUGIHARA H, TSUCHIHASHI Y, HATTORI T, FUKUDA M, FUJITA S. Cell proliferation and cell loss in intramucosal signet ring cell carcinoma of canine stomachs induced by N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Cancer Res Clin Oncol* 1985; 100: 87-94.
- 85.-FIOCCA R, VILLANI L, TENTI P. Characterization of four main cell types in gastric cancer: foveolar, mucoprotic, intestinal columnar and goblet cells. *Pathol Res Pract* 1987; 182: 308-325.
- 86.-ZINN AB, PLANTNER JJ, CARLSON DM. Nature of linkages between protein core and oligosaccharides. In: *The glycoconjugates*. Horowitz MJ, Pigman W (eds). New York, Academic Press Inc, 1977; 1: 69-85.
- 87.-HUBBARD SC, IVATT RJ. Synthesis and processing of asparagine - linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 1981; 50: 555-583.
- 88.-HARBON S, HERMAN G, CLAUSER H. Quantitative evaluation of O-glycoside linkages between sugars and aminoacids in ovine submaxillary gland mucoprotein. *Europ J Biochem* 1968; 4: 265-272.

- 89.-HANOVER JA, LENNARZ WJ. Transmembrane assembly of membrane and secretory glycoprotein. Arch Biochem Biophys 1981; 211: 1-19.
- 90.-ROTH J. Cytochemical localization of terminal N - acetyl-d-galactosamine residues in cellular compartments of intestinal goblet cells: Implications for the topology of O-glycosilation. J Cell Biol 1984; 98: 399-406.
- 91.-HILL HD, SCHWYZER M, STEINMAN HM, HILL RL. Ovine submaxillary mucin. Primary structure and peptide substrates of UDP-N-acetylgalactosamine: mucin transferase. J Biol Chem 1977; 252: 3799-3804.
- 92.-KIM YS, PERDOMO J, NORDBERG J. Glycoprotein biosynthesis in small intestinal mucosa. I A study of glycosyltransferases in microsomal subfractions. J Biol Chem 1971; 246: 5466-5476.
- 93.-STROUS GJAM. Initial glycosilation of proteins with acetylgalactosaminylserine linkages. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 2694-2698.
- 94.-JOHNSON DC, SPEAR PG. O-linked oligosaccharides are acquired by herpes simplex virus glycoproteins in the Golgi apparatus. Cell 1983; 32: 987-997.
- 95.-PAVELKA M, ELLINGER A. Localization of binding sites for Concanavalin A, Ricinus comunis I y Helix pomatia lectin in the Golgi apparatus of rat small intestinal absorptive cells. J Histochem Cytochem 1985; 33: 905-914.

- 96.- LEBLOND C, BENNETT G. In: International Cell Biology. Brinkley B, Porter K (eds). New York, Rockefeller University Press, 1977: 326-336.
- 97.- PALADE G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science 1975; 189: 347-358.
- 98.- MC MANUS JFA. Histological demonstration of mucins after periodic acid. Nature 1946; 158: 202.
- 99.- STEEDMAN HF. Alcian blue: a new stain for mucin. Quart J Micr Sci 1950; 91: 477-479.
- 100.- JONES R, LYNNE R. The effect of pH on Alcian blue staining of epithelial acid glycoproteins. I Sialomucins and sulphomucins (singly or in simple combinations). Histochem J 1973; 5: 9-18.
- 101.- RITTER HB, OLESON JJ. Combined histochemical staining of acid polysaccharides and 1,2 glycol groupings in paraffin sections of rat tissues. Am J Pathol 1950; 26: 639-645.
- 102.- SPICER SS. Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. J Histochem Cytochem 1965; 13: 211-234.
- 103.- SHARON N, LIS H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 1972; 177: 949-958.
- 104.- DULANEY JT. Binding interactions of glycoproteins with lectins. Molec Cell Biochem 1979; 21: 43-63.
- 105.- WALKER RA. The use of lectins in histopathology. Histopathology 1985; 9: 1121-1124.

- 106.- DAMJANOV I. Lectin cytochemistry and histochemistry biology of disease. Lab Invest 1987; 57: 5-20.
- 107.- THIERY JP. Mise en évidence des polysaccharides sur congés fines en microscopie électronique. J Microscopie 1967; 6: 987-1018.
- 108.- KRAMER MF, GENZE JJ. Comparison of various methods to localize a source of radioactivity in ultrastructural autoradiographs. The site of [3H] galactose incorporation in surface mucous cells of the rat stomach. J Histochem Cytochem 1980; 28: 381-387.
- 109.- BOYD WC. The lectins: their present status. Vox Sang 1963; 8: 1-32.
- 110.- GOLDSTEIN JJ, HAYES CE. The lectins: carbohydrate binding proteins of plants and animals. Adv Carbohydr Chem Biochem 1978; 35: 127-340.
- 111.- STILLMARK H. Über rizin, ein giftiges ferment aus dem samen von Ricinus communis I und einigen anderen euporbiacen. Inang Dis Dorpart 1888.
- 112.- BERNHARD W, AVRAMEAS S. Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of Concanavalin A. Exp Cell Res 1971; 64: 232-236.

- 113.- KATSUYAMA T, SPICER SS. Histochemical differentiation of complex carbohydrates with variants of the Concanavalin horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem* 1978; 26: 233-250.
- 114.- HSU SM, RAINE L. Versatility of biotin - labelled lectins and avidin - biotin - peroxidase complex for localization of carbohydrates in tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 157-161.
- 115.- ROTH J. Carbohydrate - cytochemistry on thin sections by lectins. *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 1982.
- 116.- ELLINGER A, PAVELKA M. Post - embedding localization of glycoconjugates by means of lectins on thin sections of tissues embedded in LR White. *Histochemical J* 1985; 17: 1321-1336.
- 117.- GOLDSTEIN IJ, HUGHES RC, MONSYGNI M, OSAWA T, SHARON N. What should be called a lectin?. *Nature* 1980; 286: 66.
- 118.- PEREIRA MEA, KABAT EA. Immunochemical studies on lectins and their application to the fractionation of blood group substances and cells. *Critic Rev Immunol* 1979; 1: 33-78.
- 119.- NICOLSON GL. The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int Rev Cytol* 1974; 39: 89-190.

- 120.- HOFMANN K, KISO Y. An approach to the targeted attachment of peptides and proteins to solid supports. Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73:3516-3518.
- 121.- ALROY J, UCCI AA, PEREIRA MEA. Lectins: histochemical probes for specific carbohydrate residues. In: Diagnostics Immunochemistry, vol 2. De Lellis RA (ed). New York, Masson Inc, 1984: 67-78.
- 122.- GALLAGHER JT. Carbohydrate - binding properties lectins: a possible approach to lectin nomenclature and classification. Biosciencie Reports 1984; 4: 621-632.
- 123.- MORENO A. Aplicación de las lectinas al conocimiento de las mucosustancias del tiroides de la rata. Estudio histoquímico y metodológico. Tesis doctoral presentada en la Facultad de Medicina. Sevilla. 1985.
- 124.- ETZLER ME, KABAT EA. Purification and characterization of a lectin (plant agglutinin) with blood group. A specificity from Dolichos biflorus. Biochemistry 1970; 9: 869-877.
- 125.- PEREIRA MEA, KABAT EA. Immunochemical studies on blood groups LXII. Fraction of hog and human A, H and AH blood active substances on insoluble immunoabsorbents of Dolichos and Lotus lectins. J Exp Med 1976; 143: 422-436.

- 126.- RACE RR, SANGER R. Tn and anti-Tn. In: Bloods groups in man. Oxford, Blackwell Scientific Publishers, 1975: 488-491.
- 127.- ETZLER ME, GUPTA S, BORREBAECK C. Carbohydrate binding properties of the Dolichos biflorus lectin and subunits. J Biol Chem 1981; 256: 2367-2370.
- 128.- LOTAN R, LIS H, SHARON N. Aggregation and fragmentation of Soybean agglutinin. Biochem Biophys Res Commun 1975; 62: 144-150.
- 129.- PEREIRA MEA, KABAT EA, SHARON N. Immunochemical studies on the specificity of Soybean agglutinin. Carbohydr Res 1974; 37: 89-102.
- 130.- LOTAN R, SKUTELSKY E, DANON D, SHARON N. The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). J Biol Chem 1975; 250: 8518-8523.
- 131.- PEREIRA MEA, KABAT EA, LOTAN R, SHARON N. Immunochemical studies on the specificity of the Peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. Carbohydr Res 1976; 51: 107-118.
- 132.- NOVAGRODSKY A, LOTAN R, RAVID A, SHARON N. Peanut agglutinin. A new mitogen that binds to galactosyl sites exposed after neuraminidase treatment. J Immun 1975; 115: 1243-1248.

- 133.- KENT SP. The demonstration and distribution of water soluble blood groups O (H) antigen in tissue sections using a fluorescein labelled extract of *Ulex europaeus* seed. *J Histochem Cytochem* 1964; 12: 591-599.
- 134.- ALLEN HJ, EAZ J, MATTA KL. A comparison of the binding specificities of lectins from *Ulex europaeus* and *Lotus tetragonolobus*. *Immunol Commun* 1977; 6: 585.
- 135.- PEREIRA MEA, KISALLUS EC, GRUEZO F, KABAT EA. Immunochemical studies on combining site of the blood group H - specific lectin I from *Ulex europaeus* seeds. *Arch Biochem Biophys* 1978; 185: 108-115.
- 136.- GOLDSTEIN IJ, HAMMARSTROMS A, SUNBALD G. Precipitation and carbohydrate binding studies on wheat germ agglutinin. *Biochim Biophys Acta* 1975; 405: 53-61.
- 137.- BHAVANANDAN VP, KATLIC AW. The interaction of wheat germ agglutinin with sialoglycoproteins. *J Biol Chem* 1979; 253: 4000-4008.
- 138.- SHARON N, LIS H. Use of lectins for the study of membranes. *Methods Membr Biol* 1975; 3: 143-200.
- 139.- KORNFELD S, KORNFELD R. Use of lectins in the study of mammalian glycoproteins. In: *The glycoconjugates*. Horowitz MI, Pigman W (eds). New York, Academic Press, 1978: 437-449.

- 140.- WEIR DM. Surface carbohydrates and lectins in cellular recognition. *Immunology Today* 1980; 45-51.
- 141.- LIS H, SHARON N. Lectins as molecules and as tools. *Ann Rev Biochem* 1986; 55: 35-67.
- 142.- LEHMANN TP, COOPER HS, MULHOLLAND SG. Peanut lectin binding sites in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 1984; 53: 272-277.
- 143.- HELLE M, KROHN K. Reactivity of a monoclonal antibody recognizing an estrogen receptor regulated glycoprotein in relation to lectin histochemistry in breast cancer. *Virchows Arch A* 1986; 410: 23.
- 144.- REE HJ, HADIN ME. Lectin distinction of benign from malignant histiocytes. *Cancer* 1985; 56: 2046-2050.
- 145.- GONZALEZ-CAMPORA R, MONTERO C, MARTIN-LACAVE I, GALERA H. Demonstration of vascular endothelium in thyroid carcinoma using *Ulex europaeus* I agglutinin. *Histopathology* 1986; 10: 261-266.
- 146.- MIETTINEN M, HOLTHOFER H, LEHTO VP, MIETTINEN A, VIRTANEN J. *Ulex europaeus* I lectin as marker for tumours derived from endothelial cells. *Am J Clin Pathol* 1983; 79: 32-36.

- 147.- STEMMERMAN GN. Comparative study of histochemical patterns in non neoplastic gastric epithelium. A study of japanese in Hawaii. JNCI 1967; 39: 375-383.
- 148.- FINN FM, TITUS G, HORSTMAN D, HOFMANN K. Avidin - biotin affinity chromatography application to the isolation of human placental insulin receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 7328-7332.
- 149.- HEGGENESS MH, ASH JF. Use of the avidin - biotin complex for the localization of actin and myosin with fluorescence microscopy. J Cell Biol 1977; 73: 783-788.
- 150.- GUESDON JL, TERNYNCK T, AVRAMEAS S. The use of avidin - bitoin interaction in immunoenzymatic techniques. J Histochem Cytochem 1979; 27: 1131-1139.
- 151.- WARNKE R, LEVY R. Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin - avidin - horseradish peroxidase method. J Histochem Cytochem 1980; 28: 771-776.
- 152.- MORRIS RE, SAELINGER CB. Visualization of intracellular trafficking: use of biotinylated ligands in conjunctions with avidin - gold colloids. J Histochem Cytochem 1984; 32: 124-128.
- 153.- NEWMAN GR, HOBOT JA. Modern acrylics for post-embedding immunostaining techniques. J Histochem Cytochem 1987; 35: 971-981.

- 154.- HSU SM, RAINE L, FANGER H. Use of avidin - biotin - peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
- 155.- HOFFMANN K, WOOD SW, BRANSTON CC, MONTIBELLER JA, FINN FM. Iminobiotin affinity columns and their application to retrieval of streptavidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 4666-4668.
- 156.- MOSS J, LANE MD. The biotin - dependent enzymes. *Adv Enzymol* 1971; 35: 321-442.
- 157.- BAYER EA, SKUTELSKY E, WILCHEK M. The avidin - biotin complex in affinity cytochemistry. *Methods Enzymol* 1979; 62: 308-315.
- 158.- BONNARD C, PAPERMASTER DS, KRAEHEBUHL JP. The streptavidin - biotin bridge technique: application in light and electron microscope immunocytochemistry. In: *Immunolabelling for electron microscopy*. Polak JM, Varndell IM (eds). Amsterdam, Elsevier, 1984: 95-111.
- 159.- COGGI G, DELL'ORTO P, VIALE G. Avidin - biotin methods. In: *Immunocytochemistry. Modern methods and applications*. Polak JM, Van Noorden S (eds). Wright, Bristol, 1986: 54-70.

- 160.- CHILDS GV, UNABIA G. Application of a rapid avidin - biotin peroxidase complex (ABC) technique to the localization of pituitary hormones at the electron microscopic level. *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 1320-1324.
- 161.- BERTI E, MONTI M, CAVICCHINI S, CAPUTO R. The avidin - biotin - peroxidase complex (ABCPx) in skin immunoelectron microscopy. *Arch Dermatol Res* 1983; 275: 134-138.
- 162.- WOOD GS, WARNKE R. Suppression of endogenous avidin - binding activity in tissues and its relevance to biotin - avidin detection systems. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 1196-1204.
- 163.- BUSSOLATI G, GUGLIOTTA P. Non - specific staining of mast cells by avidin - biotin - peroxidase complexes (ABC). *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1419-1421.
- 164.- BENDAYAN M, NANJI A, KAN FWK. Effect of tissue processing on colloidal gold cytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 983-996.
- 165.- NEWMAN GR, JASANI B, WILLIAMS ED. A simple post - embedding system for the rapid demonstration of tissue antigens under the electron microscope. *Histochem J* 1983; 15: 543-555.
- 166.- NEWMAN GR, JASANI B. Post-embedding immunoenzyme techniques. In: *Immunolabelling for electron microscopy*. Pollack JM, Varndell IM (eds). Amsterdam, Elsevier, 1984: 53-70.

- 167.- NEWMAN GR. Use and abuse of LR White. *Histochem J* 1987; 19: 118-120.
- 168.- BENDAYAN M, ZOLLINGER M. Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium - fixed tissues applying the protein A - gold technique. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 101-109.
- 169.- HERRERA GA. Ultrastructural postembedding immunogold labeling: applications to diagnostic pathology. *Ultrastruct Pathol* 1989; 13: 485-499.
- 170.- CAUSTON BE. The choice of resins for electron immunocytochemistry. In: *Immunolabelling for electron microscopy*. Polak JM, Varndell IM (eds). Amsterdam, Elsevier, 1984: 29-36.
- 171.- FINCK H. Epoxy resins in electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 1960; 7: 27-30.
- 172.- SPURR AR. A low - viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 1969; 26: 31-43.
- 173.- GROS D, OBRENOVITCH A, CHALLICE CE, MONSIGNY M, SCHREVEL J. Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of lectins on ultrathin glycol methacrylate sections *J Histochem Cytochem* 1977; 25: 104-114.
- 174.- SUZUKY S, TSUYAMA S, SUJANUMA T, YAMAMOTO N, MURATA F. Post-embedding staining of Brunner's gland with lectin - ferritin conjugates. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 946-952.

- 175.- YAMAMOTO N. Electron microscopic analysis of sugar residues of glycoproteins in the acrosomes of spermatids using various lectins. *Acta Histochem Cytochem* 1982; 15: 139.
- 176.- KELLENBERGER E, CARLEMALM E, VILLIGER W, ROTH J, GARAVITO M. Low denaturation embedding for electron microscopy of thin sections. *Chemische Werke Lowi GmbH, Walkraiburg, FRG, 1980.*
- 177.- PRIESTLEY JV. Pre-embedding ultrastructural immunocytochemistry: Immunoenzyme techniques. In: *Immunolabeling for electron microscopy.* Pollack JM, Varndell IM (eds). Amsterdam, Elsevier, 1984: 37-52.
- 178.- RODRIGUEZ-BOULAN E, KREIBICH G, SABATINI DD. Spacial orientation of glycoproteins in membranes of rat liver rough microsomes. I Localization of lectin - binding sites in microsomal membranes. *J Cell Biol* 1978; 78: 874-893.
- 179.- WOOD JG, MCLAUGHUN BJ, BARBER RP. The visualization of Concanavalin A binding sites in Purkinje cells somata and dendrites of rat cerebellum. *J Cell Biol* 1974; 63: 541-549.
- 180.- SINGER SJ. Preparation of an electron dense antibody conjugate. *Nature (London)* 1959; 183: 1523-1524.
- 181.- NAKANE PK, PIERCE GB. Enzymes - labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 1966; 14: 929-931.

- 182.- GRAHAM RC, KARNOVSKY MJ. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 1966; 14: 291-302.
- 183.- FELDHERR CM, MARSHALL JM. The use of colloidal gold for studies of intracellular exchange in amoeba *Chaos Chaos*. *J Cell Biol* 1962; 12: 640-645.
- 184.- FAULK WP, TAYLOR GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochimistry* 1971; 8: 1081-1083.
- 185.- HORISBERGER M, ROSSET J, BAVER H. Colloidal gold granules as markers for cell surface receptors in the scanning electron microscope. *Experientia* 1975; 31: 1147-1149.
- 186.- HORISBERGER M, ROSSET J. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1977; 25: 295-305.
- 187.- GEOGHEGAN WD, SCILLIAN JJ, ACKERMAN GA. The detection of human B Lymphocytes by both light and electron microscopy utilizing colloidal gold labelled-antiimmunoglobulin. *Immunol Commun* 1978; 7: 1-12.
- 188.- BENDAYAN M. Double immunocytochemical labeling applying the protein A-gold technique. *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 81-85.

- 189.- HOLM R, NESLAND J, ATTRAMADAL A, JOHANNESSEN JV.  
Double - staining methods at the ultrastructural level  
applying colloidal gold conjugates. *Ultrastruc Pathol*  
1988; 279-290.
- 190.- GEOGHEGAN WD, ACKERMAN GA. Adsorption of horseradish  
peroxidase and anti-ovomucoid to colloidal gold for  
the indirect detection of Concanavalin A, wheat germen  
agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on  
cell surfaces at electron microscopic levels: a new  
method, theory and application. *J Histochem Cytochem*  
1977; 25: 1187-1200.
- 191.- HIRANO H, PARKHOUSE B, NICOLSON GL, LENNOX ES, SINGER  
SJ. Distribution of saccharide residues on membrane  
fragments from a myeloma - cell homogenate: its impli-  
cations for membrane biogenesis. *Proc Natl Acad Sci*  
USA 1972; 69: 2945-2949.
- 192.- BRETTON R, BARIETY J. A comparative ultrastructural  
localization of Concanavalina A, wheat germen and  
*Ricinus communis* on glomeruli of normal rat kidney. *J*  
*Histochem Cytochem* 1976; 24: 1093-1200.
- 193.- ROTH J. Application of lectin - gold complexes for  
electron microscopic localization of glycoconjugates  
on thin sections. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 987-  
999.

- 194.- LUCOCQ JM, BERGER EG, ROTH J. Detection of terminal N-linked N-acetylglucosamine residues in the Golgi apparatus using galactosyltransferase and endoglucosaminidase F/peptide N-glycosidase F: adaptation of a biochemical approach to electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 67-74.
- 195.- ROTH J. Electron microscopic localization of sugar residues in intracellular compartments of intestinal goblet cells by lectin - gold complexes. In: *Proceedings of the 7th International Symposium on Glycoconjugates*. Chester MA, Heinegard D, Lundblad A, Svensson S (eds). 1983: 313-314.
- 196.- SUZUKI S, TSUYAMA S, MURATA F. Post-embedding staining of rat mucous cells with lectins. *Histochemistry* 1982; 73: 563-575.
- 197.- ITO M, TAKATA K, SAITO S, AOYAGI T, HIRANO H. Lectin - binding pattern in normal human gastric mucosa. A light and electron microscopy study. *Histochemistry* 1985; 83: 189-193.
- 198.- GARLAND JM. Preparation and performance of gold - labelled Concanavalin A for the location of specifically reactive sites in walls of *S. faecalis* 8191. In: *Electron microscopy and cytochemistry*. Wisse E, Daems W Th, Molenaar I, van Dujin P (ed). Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1971: 303-307.
- 199.- VAN DER POL AN. Colloidal gold and biotin - avidin conjugates as ultrastructural markers for neural antigens. *Q J Exp Physiol* 1984; 69: 1-33.

- 200.- DEREVITSKAYA VA, ARBATSKY NP, KOCHETKOV NK. The structure of carbohydrate chains of blood group substance. Isolation and elucidation of the structure of higher oligosaccharides from blood groups substance. *H Eur J Biochem* 1978; 86: 423-437.
- 201.- WATKINS WM. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P, blood group systems. In: *Advances in human genetics*. Harris H, Hirschorn K (eds). Plenum Publishing Co. 1980; 10: 1-136, 379-385.
- 202.- SCHULTE BA, RAD KPP, SPICER SS. Histochemical examination of glycoconjugates of epithelial cells in the human Fallopian tube. *Lab Invest* 1985; 52: 207-219.
- 203.- HENNIGAR RA, SCHULTE BA, SPICER SS. Heterogeneous distribution of glycoconjugates in human kidney tubules. *Anat Rec* 1985; 211: 376.
- 204.- MACARTNEY JC. Lectin histochemistry of galactose and N-acetyl-galactosamine glycoconjugates in normal gastric mucosa and gastric cancer and the relation with ABO and secretor status. *J Pathol* 1986; 150: 135-144.
- 205.- KAPADIA A, FEIZI T, JEWELL D, KEELING J, SLAVIN G. Immunocytochemical studies of blood A, H, I and i antigens in gastric mucosae of infants with normal gastric histology and of patients with gastric carcinoma and chronic benign peptic ulceration. *J Clin Pathol* 1981; 34: 320-337.

- 206.- FINAN PJ, WIGHT DGD, LENNOX ES, SACKS SH, BLEEHEN NM.  
Human blood group isoantigen expression on normal and malignant gastric epithelium studied with anti-A and anti-B monoclonal antibodies. J Natl Cancer Inst 1983; 70: 679-685.
- 207.- SCHULTZE HE, HEREMANS JF. The proteins of digestive secretions. Molec Biol 1966; 1: 773-815.
- 208.- RODEN L. Biochemistry of glycoproteins and related substances. In: Cystic fibrosis Pt II. Rossi E, Stoll E (eds). Basel, Karger, 1968: 185-202.
- 209.- TAKASAKI S, YAMASHITA K, KOBATA A. The sugar chain structures of ABO blood group active glycoproteins obtained from human erythrocyte membrane. J Biol Chem 1978; 253: 6086-6091.
- 210.- ROVIS L, ANDERSON B, KABAT EA, GRUEZO F, LIAO J. Heterogeneity of carbohydrate fragments isolated from human blood group H and Le a active glycoproteins by base - borohydride degradation. Biochemistry 1973; 12: 1955-1961.
- 211.- GLASS GBJ. Mucosubstances of gastric secretion in man and their biologic activity. Ann NY Acad Sci 1963; 106: 775-793.
- 212.- LAMBERT R, MARTIN F, ANDRE C, DESCOS L, VOUILLON G. Apical localization of glycoproteins in gastric mucous cells. Am J Dig Dis 1968; 13: 941-951.
- 213.- GOLDMAN H, MING SC. Mucus in normal and neoplastic gastrointestinal epithelium. Histochemical distribution. Arch Path 1968; 85: 580-586.

- 214.- MOWRY RW, JONES PB. Detection and properties of acidic polysaccharides in gastric carcinomas and in stomachs resected for peptic ulcer. *J Histochem Cytochem* 1959; 7: 321.
- 215.- GLASS GBJ. Biologically active materials related to gastric mucins in the normal and the diseased stomachs of man. *Gastroenterology* 1962; 43: 310-325.
- 216.- HOSKINS LC, ZAMCHECK N. Studies on gastric mucins in health and disease. *Ann NY Acad Sci* 1963; 106: 767--774.
- 217.- SHEAHAN DG, JERVIS HR. Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances. *Am J Anat* 1976; 146: 103-132.
- 218.- SEGURA DI. Estudio histoquímico de glicoproteínas mucosas de metaplasia intestinal en el estómago a nivel óptico y ultraestructural. Importancia en la patología gástrica. Tesis doctoral presentada en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla. 1987.
- 219.- OKAMOTO CT, FORTE JG. Distribution of lectin - binding sites in oxyntic and chief cells of isolated rabbit gastric glands. *Gastroenterology* 1988; 95: 334-342.
- 220.- RAMBOURG A, HERNANDEZ W, LEBLOND C. Detection of complex carbohydrates in the Golgi apparatus of rat cells. *J Cell Biol* 1969; 40: 395-414.
- 221.- RINEHART JF, ABUL-WAJ SK. An improved method for histologic demonstration of acid mucopolysaccharides in tissues. *AMA Archs Pathol* 1951; 52: 189-194.

- 222.- SANNES PL, KATSUYAMA T, SPICER SS. Tannic acid - metal salt sequences in histochemistry and ultrastructural cytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1978; 26: 55.
- 223.- OVTRACHT L, MORRE DJ, CHHETHAM RD, MOLLENHAUER HH. Subfractionation of Golgi apparatus from rat liver: method and morphology. *J Microsc (Paris)* 1973; 18: 87-102.
- 224.- BERGERON JJM, EHRENREICH JH, SIEKEVITZ P, PALADE GE. Golgi fractions prepared from rat liver homogenates. II Biochemical characterization. *J Cell Biol* 1973; 59: 73-78.
- 225.- KRAMER MF, GENZE JJ, STROUS GJ. Site of synthesis, intracellular transport and secretion of glycoproteins in exocrine cells. *Ciba Found Symp* 1978; 54: 25-51.
- 226.- BENNET G, O'SHAUGHNESSY D. The site of incorporation of sialic acid residues into glycoproteins and the subsequent fates of these molecules in various rat and mouse cell types as shown by radioautography after injection of [<sup>3</sup>H]N-acetylmannosamine. I Observations in hepatocytes. *J Cell Biol* 1981; 88: 1.
- 227.- STOWARD PJ, SPICER SS, MILLER RL. Histochemical reactivity for peanut lectin - horseradish peroxidase conjugate. *J Histochem Cytochem* 1980; 28: 979-990.
- 228.- ROTH J, LENTZE MJ, BERGER EG. Localization of galactosyltransferase (GT) and galactose (Gal) residues in human duodenal mucosa: demonstration of ecto-galactosyltransferase. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1072.

- 229.- ROTH J, BERGER EG. Immunocytochemical localization of galactosyltransferase in HeLa cells: codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans Golgi cisternae. *J Cell Biol* 1982; 92: 223-229.
- 230.- NICOLSON GL, SINGER SJ. Ferritin conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains for electron microscopy: Application to saccharides bound to cell membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 942-945.
- 231.- ACKERMAN GA, FREEMAN WH. Membrane differentiation of developing hemic cells of the bone marrow demonstrated by changes in Concanavalin A surface labeling. *J Histochem Cytochem* 1979; 27: 1413-1423.
- 232.- YONEZAWA S, NAKAMURA T, TANAKA S, SATO E. Glycoconjugate with *Ulex europaeus* agglutinin I binding sites in normal mucosa, adenoma, and carcinoma of the human large bowel. *J N C I* 1982; 69: 777-785.
- 233.- JEZERNIK K, PIPAN N. Cytochemical localization of carbohydrates in intercalated duct and acinar cells of mouse parotid gland. *Histochem J* 1989; 21: 131-135.
- 234.- BENDAYAN M. Ultrastructural localization of nucleic acids by the use of enzyme - gold complexes. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 531.
- 235.- BENHAMOU N, OVELLETTE GB. Ultrastructural study and cytochemical investigation by means of enzyme - gold complexes of the fungus *Ascocalyx abietine*. *Can J Bot* 1987; 65: 168.

- 236.- BENDAYAN M, BENHAMOU N. Ultrastructural localization of glucoside residues on tissue sections by applying the enzyme - gold approach. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 1149-1155.
- 237.- KAN FWK, BENDAYAN M, PUVION E. Lectin - gold cytochemistry of glycoconjugates in the nucleus of liver cells cultured under normal and experimental conditions. *J Cell Biol* 1986; 103: 48.
- 238.- KAN FWK, PINTO DA SILVA P. Preferential association of glycoproteins to the euchromatin regions of cross - fractured nuclei is revealed by fracture - label. *J Cell Biol* 1986; 102: 576.
- 239.- RIVERA F, RUBI J, RIOS JJ, MARTINEZ F, DIAZ-CANO S. Aproximación al conocimiento de las glucoproteínas gástricas tipo CEA mediante un estudio histoquímico e inmunohistoquímico. *Patología* (en prensa).
- 240.- KUHLMANN WD, PESCHKE P. Comparative study of procedures for histological detection of lectin binding by use of *Griffonia simplicifolia* agglutinin I and gastrointestinal mucosa of the rat. *Histochemistry* 1984; 81: 265-272.
- 241.- HATTORI T. Development of adenocarcinoma in the stomach. *Cancer* 1986; 57: 1528-1534.
- 242.- HUANG CB. Sulphomucin colonic type intestinal metaplasia and carcinoma in the stomach. *Cancer* 1986; 57: 1370-1375.

- 243.- IIDA P, KUSAMA S. Gastric carcinoma and intestinal metaplasia. Significance of types of intestinal metaplasia upon development of gastric carcinoma. *Cancer* 1982; 52: 2854-2858.
- 244.- JASS JR, FILIPE MI. The mucin profiles of normal gastric mucosa, intestinal metaplasia and its variants and gastric carcinoma. *Histochem J* 1981; 13: 931-939.
- 245.- PONGCHAIRERKS P, MATSUKURA N, TOKUNAGA A, TANAKA A, ONDA M, MIKI M et al. Lectin histochemical studies on gastric intestinal metaplasia with UEA-I, Dolichus biflorus and Peanut agglutinins in comparison with gastric and small and large intestinal mucose. *Act Histochem Cytochem* 1987; 20: 147-161.
- 246.- SMETS LA, VAN BEEK WP. Carbohydrate of the tumor cell surface. *Biochem Biophys Acta* 1984; 738: 237-249.
- 247.- FEIZI T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco - development antigens. *Nature* 1985; 314: 53-57.
- 248.- SCHAUER R. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carb Chem Biochem* 1982; 40: 131-234.

VIII. TABLAS Y FIGURAS

## **TABLA.I Relación de lectinas utilizadas.**

<b><u>LECTINA</u></b>	<b><u>AZUCAR ESPECIFICO</u></b>	<b><u>AZUCAR INHIBIDOR</u></b>
<b>PNA</b>	<b>Gal<math>\beta</math>(1-3)NAcGal<math>\beta</math>-D-Gal</b>	<b><math>\beta</math>-D-Gal</b>
<b>WGA</b>	<b>(<math>\beta</math>-D-NAcGlc)<math>n</math>AcS</b>	<b>NAcGlc, AcS</b>
<b>SBA</b>	<b><math>\alpha</math> y <math>\beta</math>NAcGal<math>\beta</math><math>\alpha</math> y <math>\beta</math>Gal</b>	<b>NAcGal</b>
<b>UEA-I</b>	<b><math>\alpha</math>-L-Fuc</b>	<b><math>\alpha</math>-L-Fuc</b>
<b>DBA</b>	<b><math>\alpha</math>-D-NAcGal</b>	<b><math>\alpha</math>-D-NAcGal</b>

## TABLA II. Mucosa gástrica "normal"

	MOCO		MOCO
	<u>INTRACELULAR</u>	<u>MICROVELLOS.</u>	<u>EXTRACELULAR</u>
PNA	++	+	++
WGA	++	++	-
SBA	++	+	++
UEA-I	++	++	++
DBA	+	+	+

- Negativo + Positivo ocasional ++ Positivo

**TABLA III. Mucosa gástrica "normal".**  
**Marcaje con lectinas del Aparato de Golgi.**

	<b>PNA</b>	<b>WGA</b>	<b>SBA</b>	<b>UEA-I</b>	<b>DBA</b>
<b>Cara CIS</b>	+	-	++	-	-
<b>Cara Intermedia</b>	+	++	+	-	-
<b>Cara TRANS</b>	++	++	++	++	-

**- Negativo    + Positivo ocasional    ++ Positivo**

## TABLA IV. Mucosa gástrica metaplásica

	<u>Células</u> <u>Caliciformes</u>	<u>C.Columnar</u> <u>Mucosa</u>	<u>C.Columnar</u> <u>Absortiva</u>	<u>Moco</u> <u>Extracelular</u>
PNA	+	++	+	++
WGA	+	+	+	-
SBA	+	++	+	-
UEA-I	+	+	+	+
DBA	+	-	-	-

- Negativo    + Positivo débil    ++ Positivo

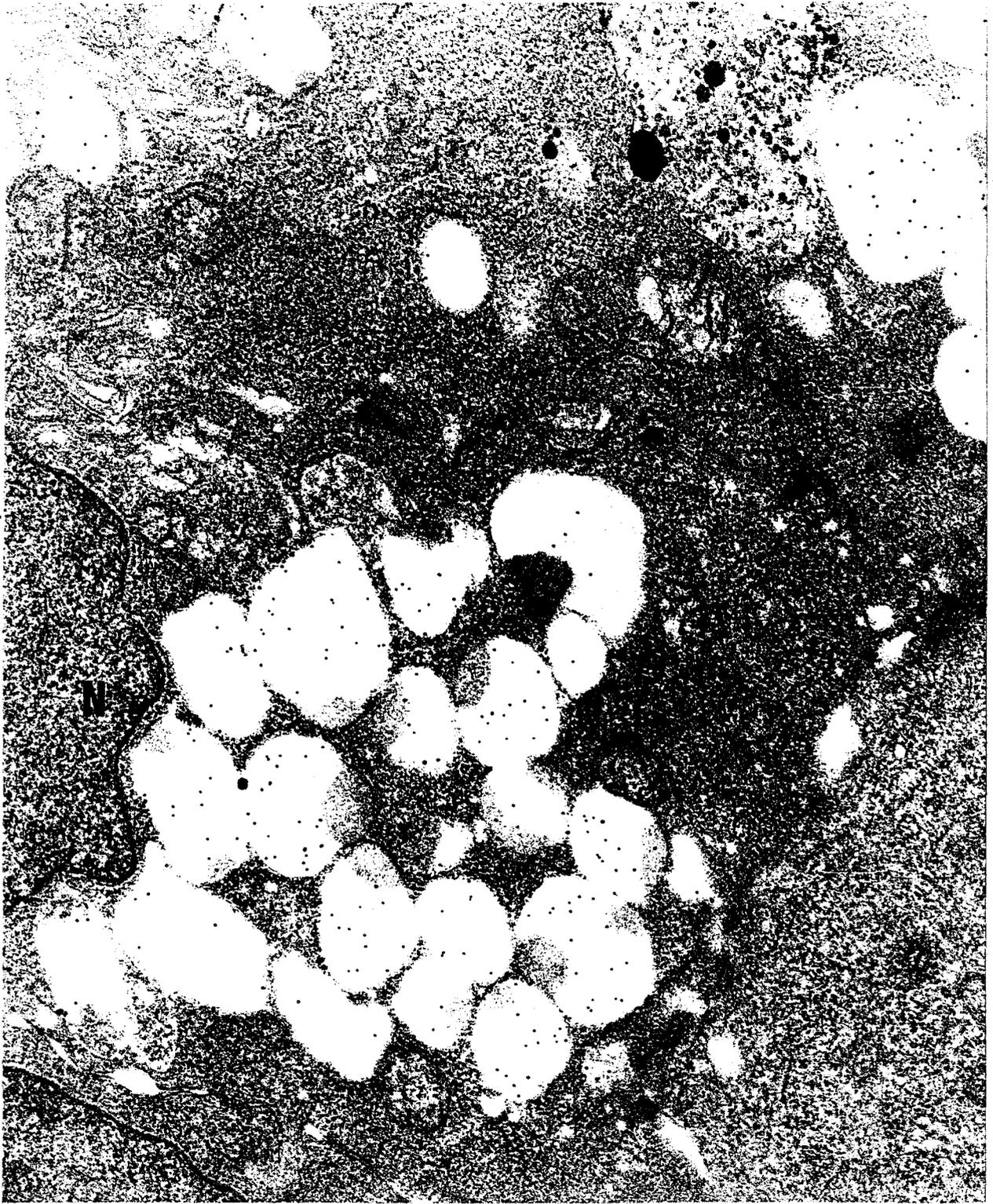


FIGURA.1: Mucosa gástrica normal. Inclusión en resina Spurr. Marcaje de restos de  $\alpha$ -Fuc en vacuolas mucosas supranucleares. (UEA-I. Método indirecto. 7.000x)

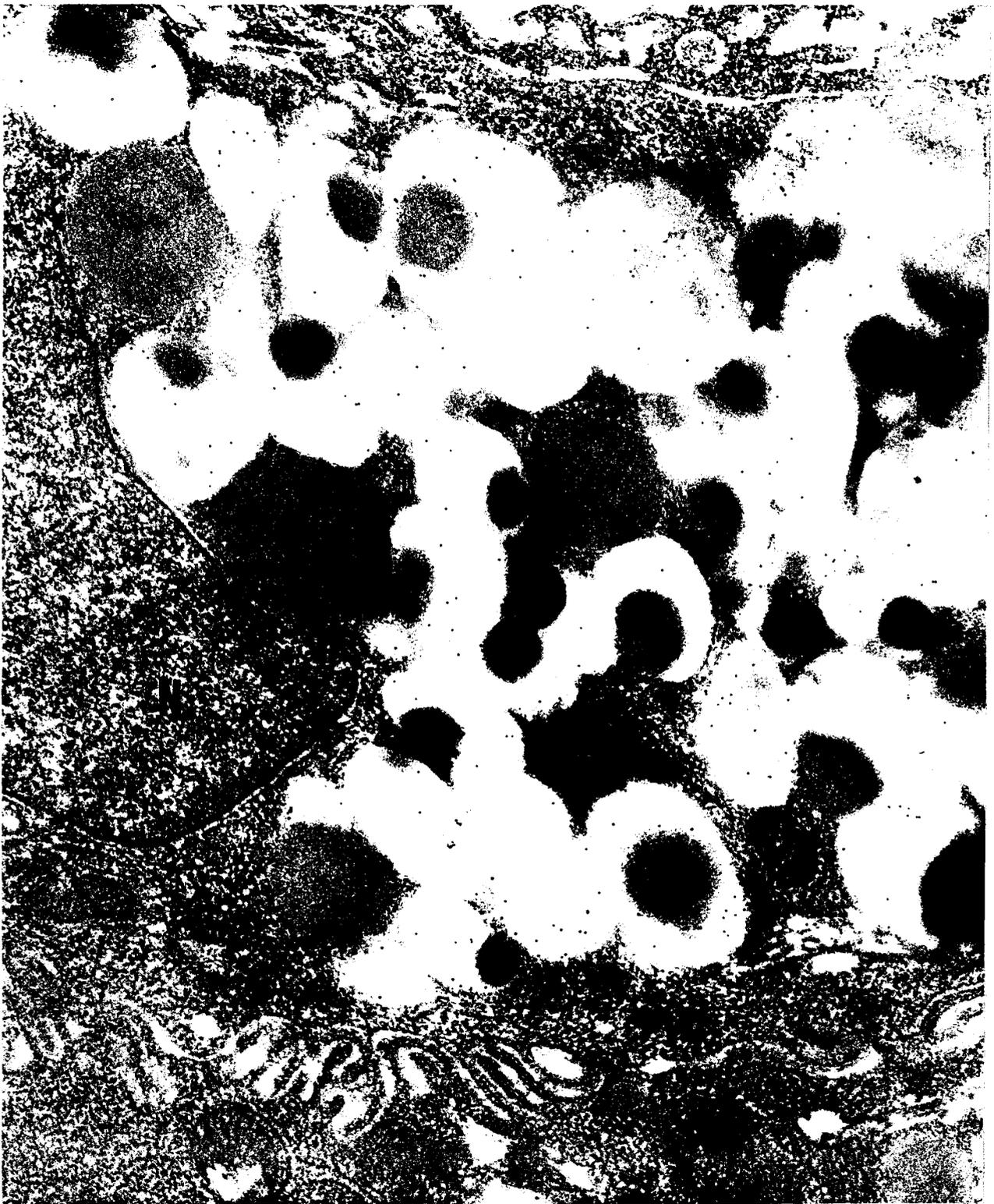
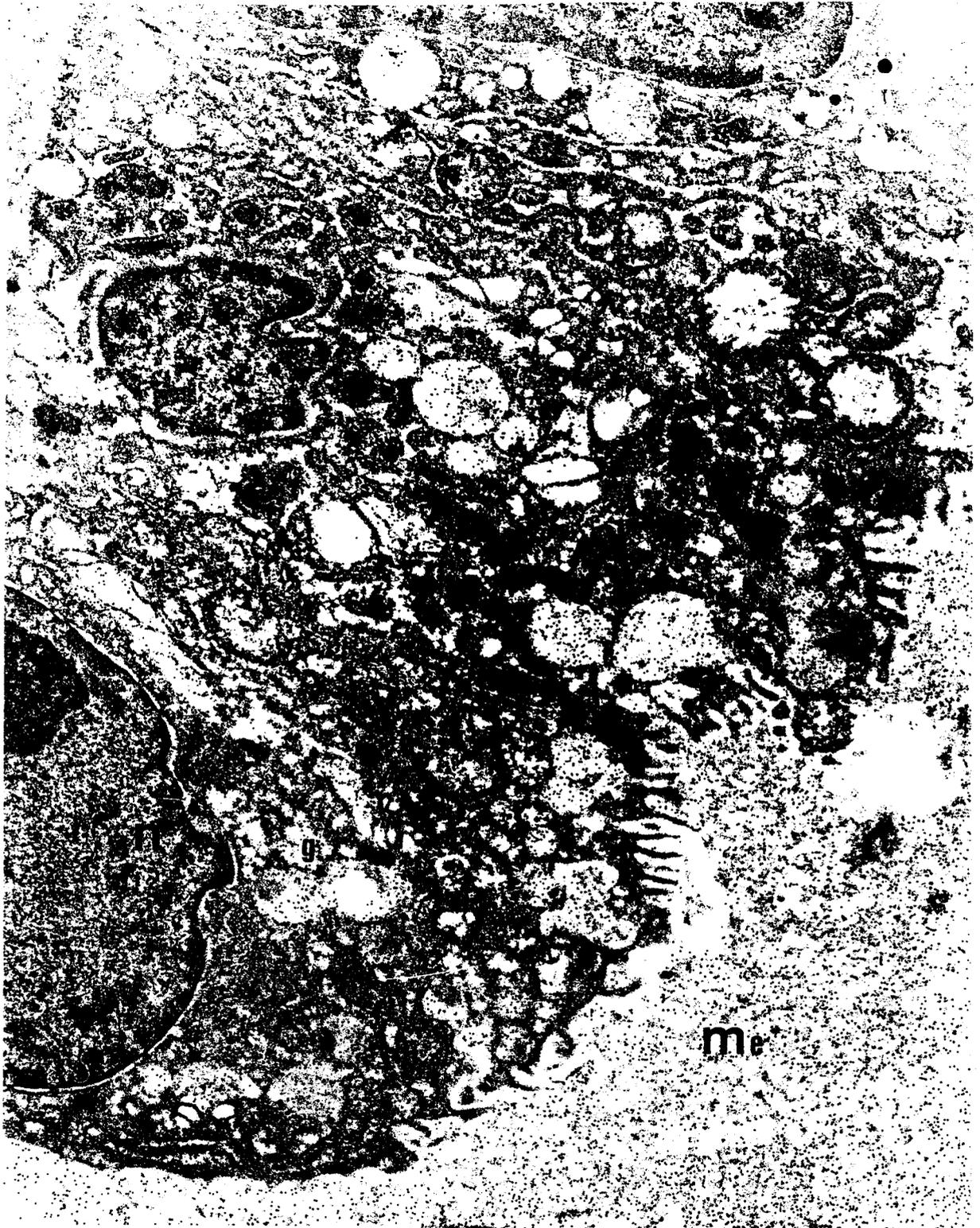


FIGURA.2: Mucosa gástrica normal. Inclusión en resina LR White. Marcaje de restos de  $\alpha$ -Fuc en moco intracelular. (UEA-I. Método directo. 12.000x)



**FIGURA.3:** Mucosa gástrica normal. Marcaje de restos de Gal y de Gal $\beta$ (1-3)NacGal a nivel de la zona del aparato de Golgi (g), moco intracitoplásmico y extracelular (Me). (PNA. 4.400x)

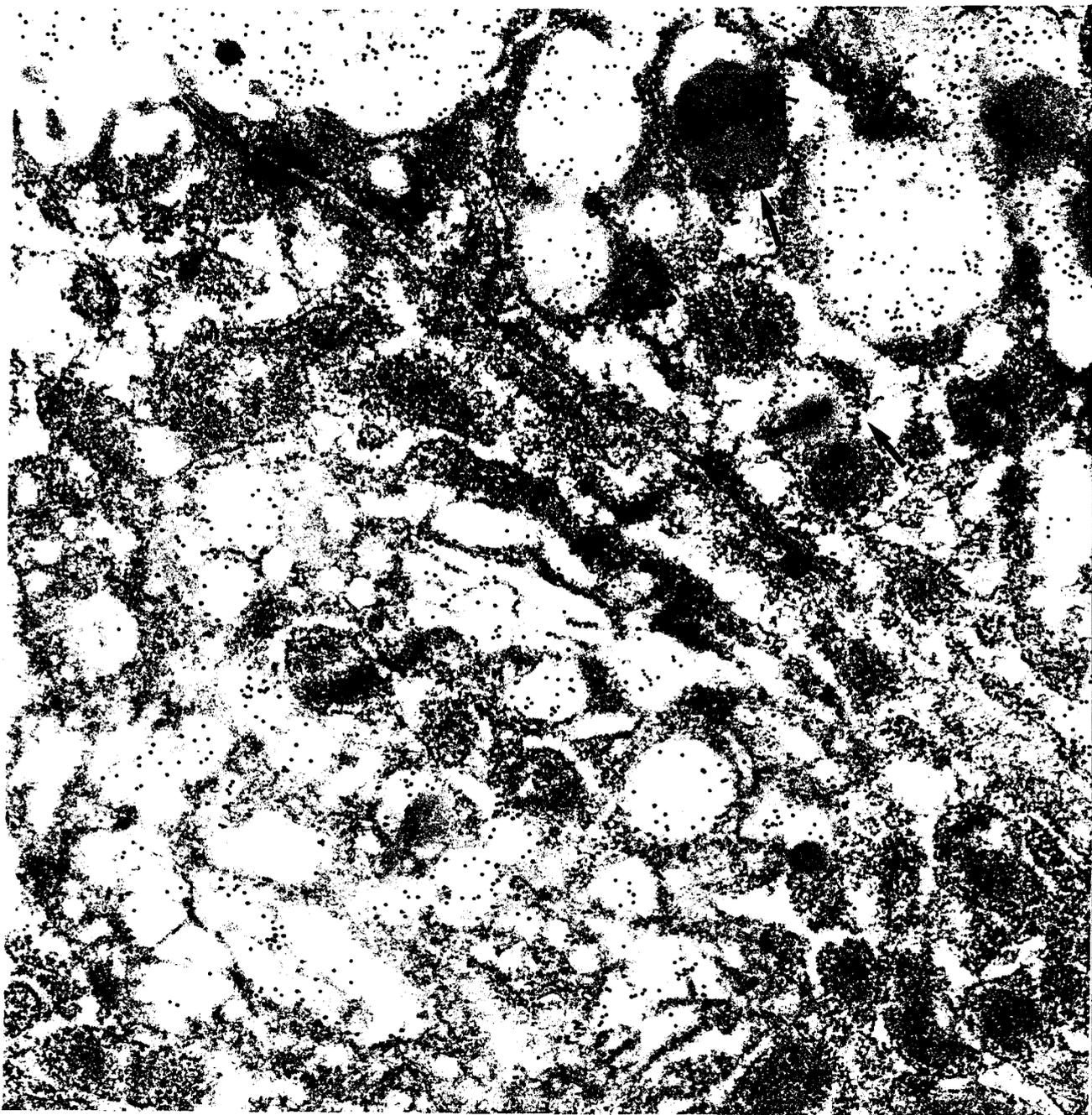
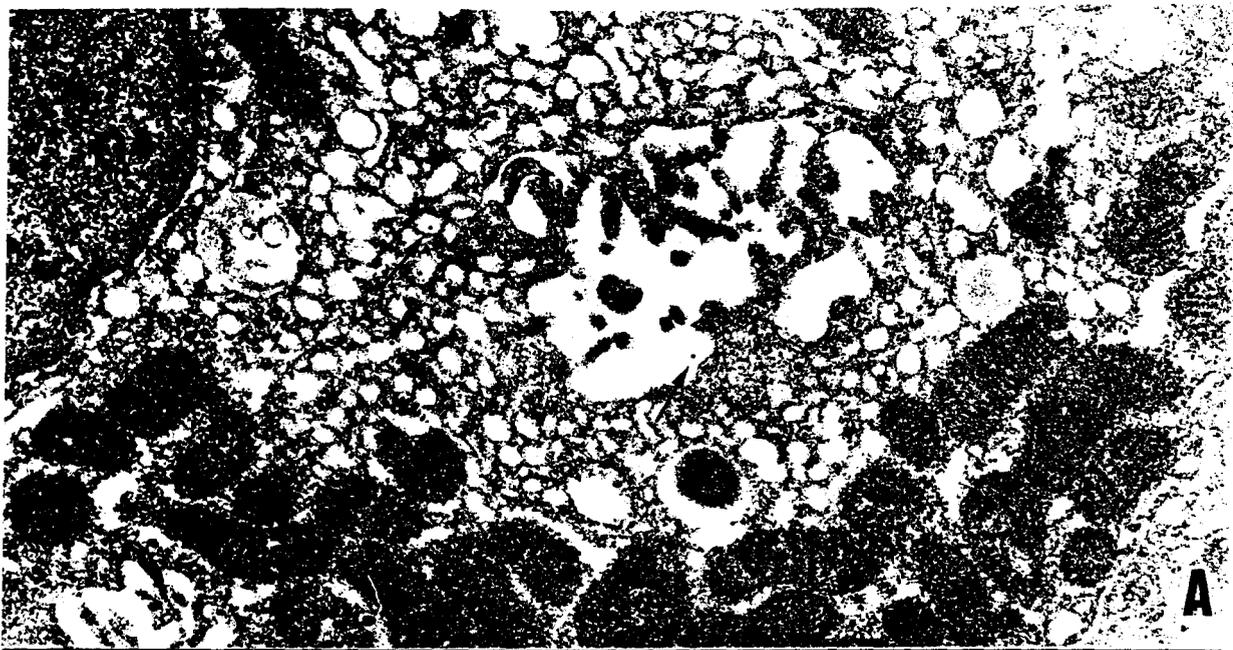


FIGURA.4: Mucosa gástrica normal. Distribución periférica del marcaje con PNA sobre el moco de las vacuolas más electróndensas (flechas). (PNA. 12.000x)



FIGURA.5: Mucosa gástrica normal. Marcaje de restos de NAc- Glc. (WGA. 7.000x)



**FIGURA.6:** Mucosa gástrica normal. Células parietales. A.- Marcaje ocasional con PNA a nivel del sistema canalicular (flechas). B.- Marcaje con PNA sobre el moco de vacuolas perinucleares. (PNA. 7.000x)

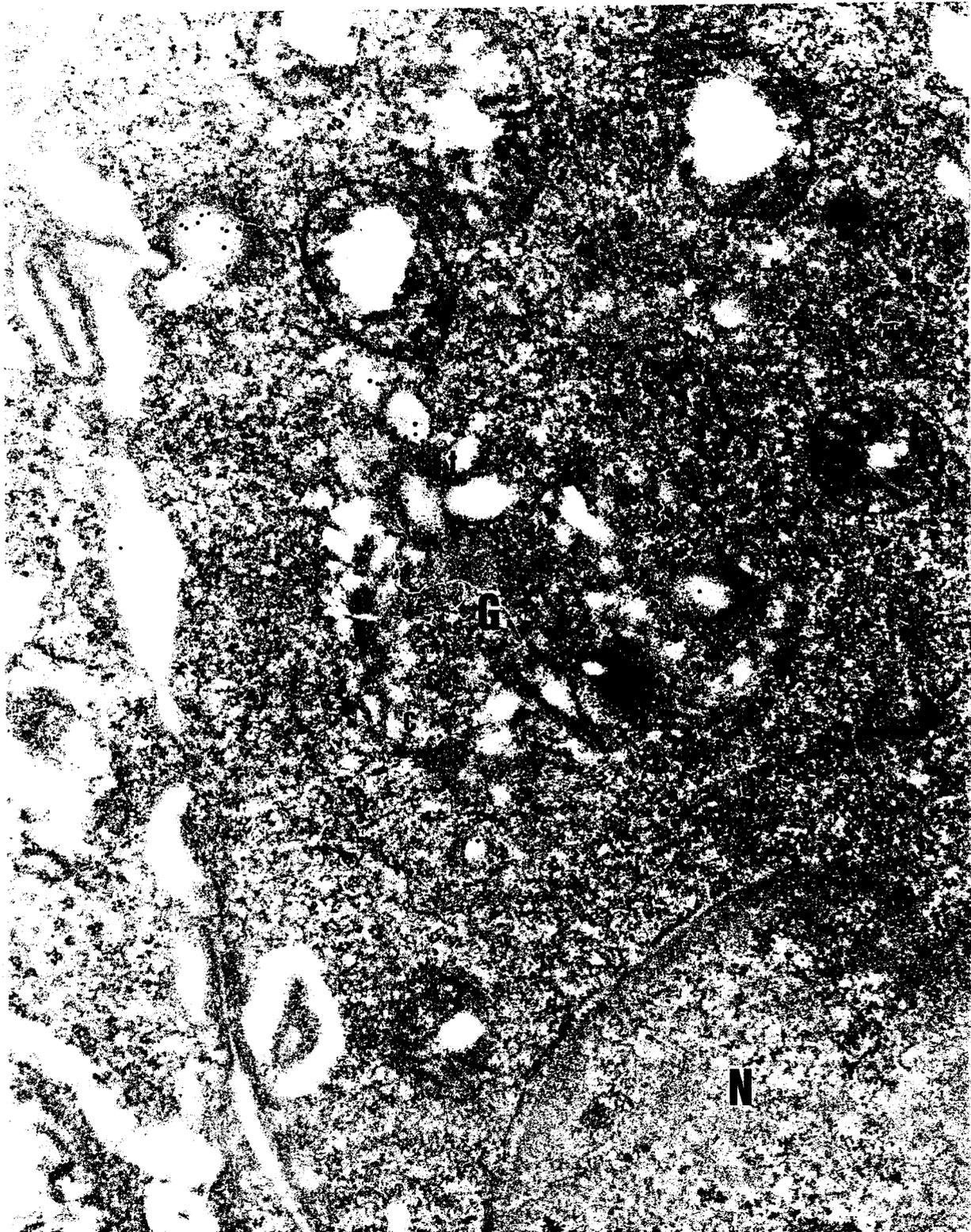


FIGURA.7: Mucosa gástrica normal. Marcaje con PNA de la zona del aparato de Golgi (G), más evidente sobre la cara trans (t). (PNA. 12.000x)

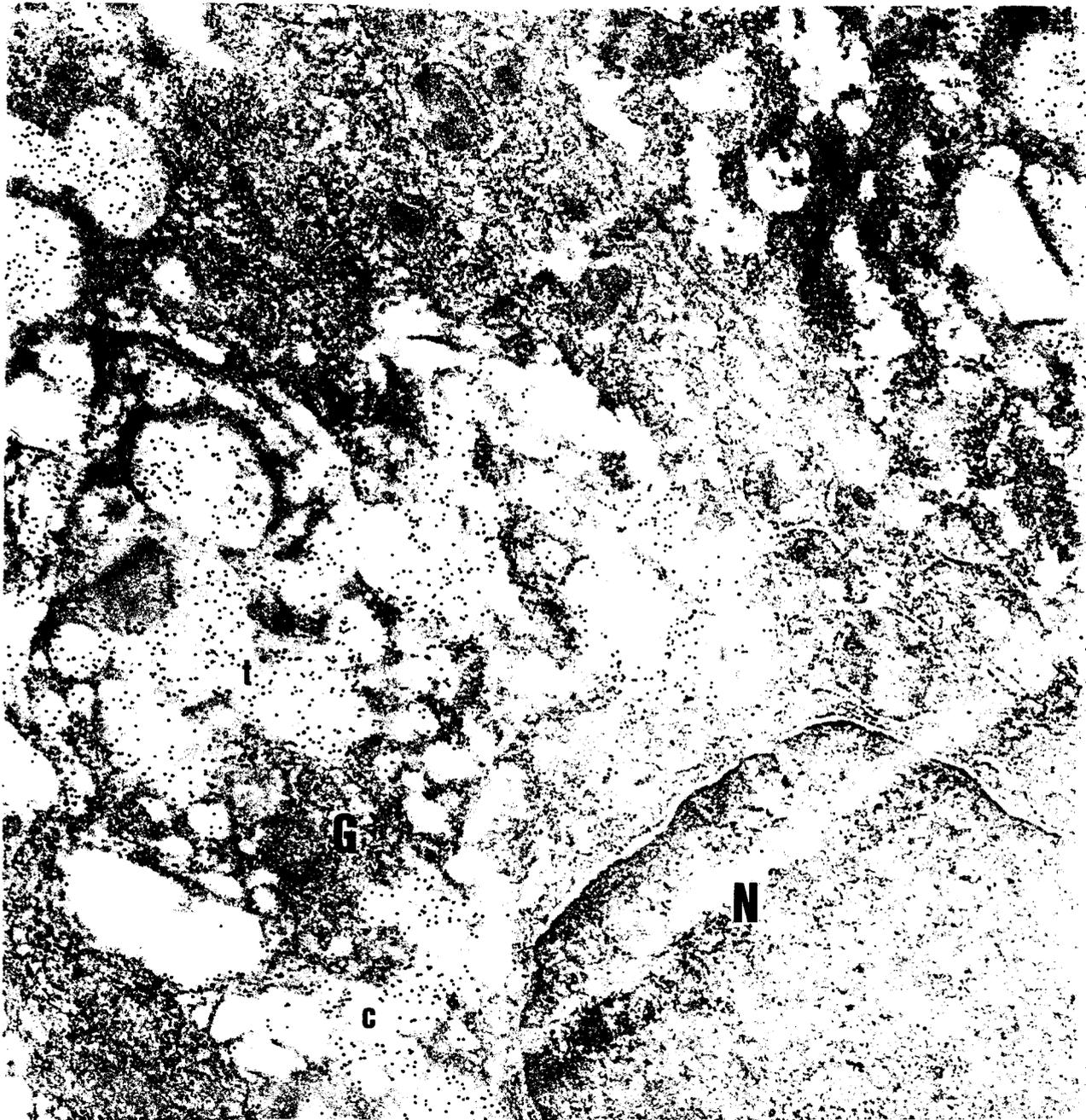


FIGURA.8: Mucosa gástrica normal. Marcaje sobre la zona del aparato de Golgi (G) con mayor intensidad que en la figura anterior. (PNA. 12.000x)

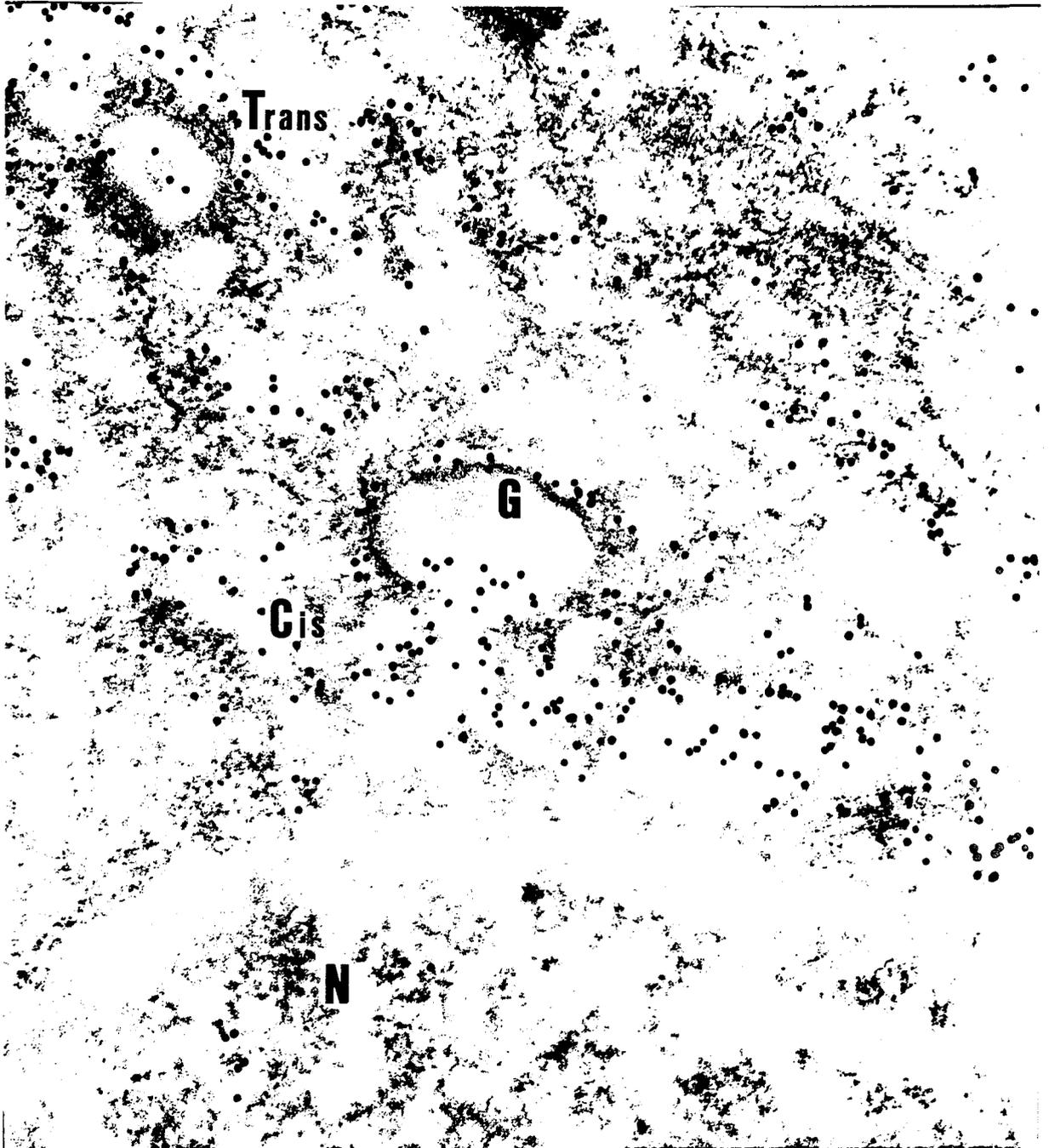


FIGURA.9: Mucosa gástrica normal. Marcaje de restos de NAc-Gal a nivel del aparato de Golgi (G), más relevante sobre la cara de formación (Cis). (SBA. 30.000x)



FIGURA.10: Mucosa gástrica normal. Marcaje de restos de NAc-Gal "dibujando" la convexidad de la cara de formación (Cis) del aparato de Golgi (G). También se advierte reacción sobre la cara de maduración (Trans). (SBA. 30.000x)



FIGURA.11: Mucosa gástrica normal. Marcaje focal con SBA sobre las membranas y lumen del RER. (SBA. 30.000x)

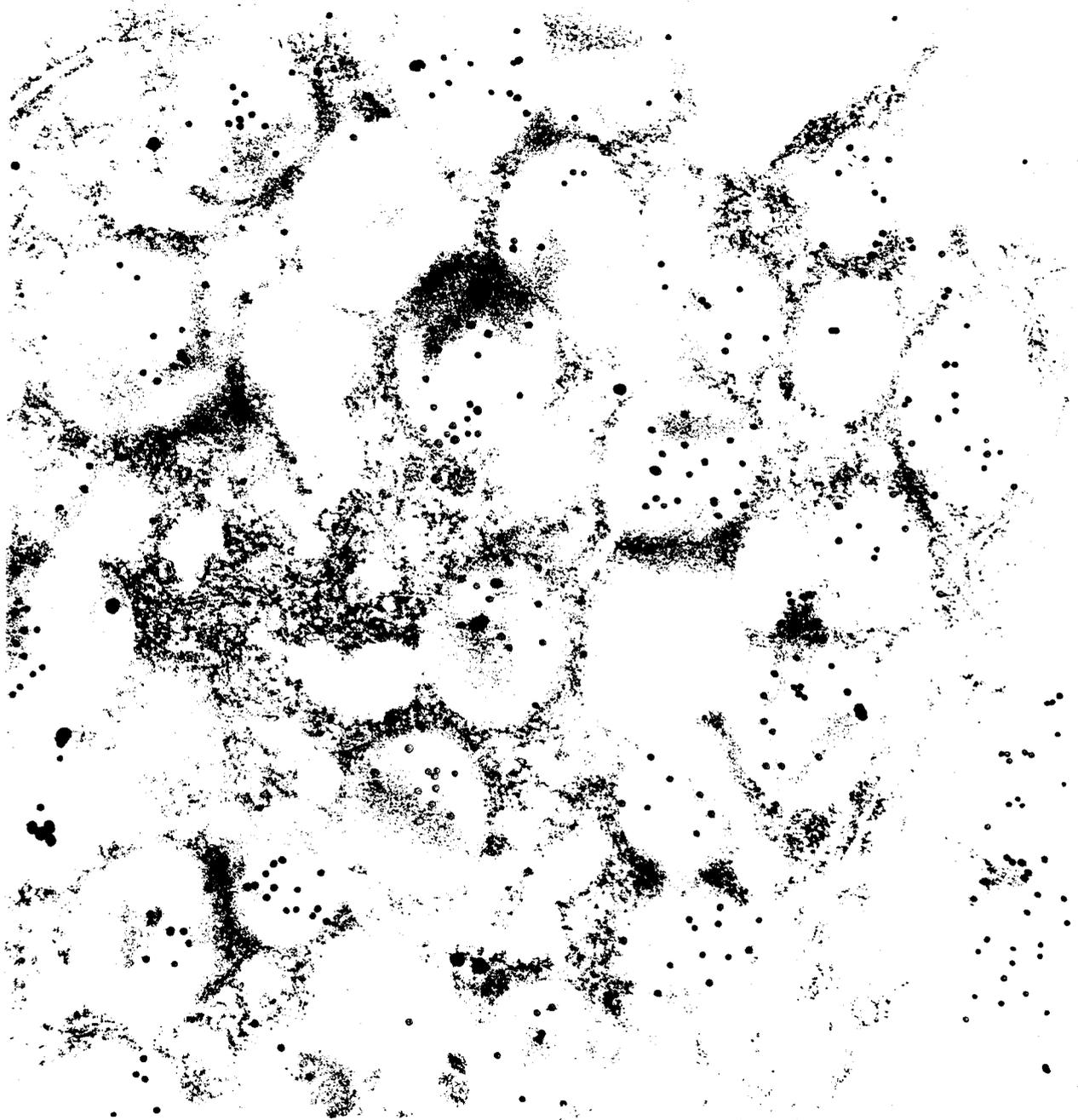
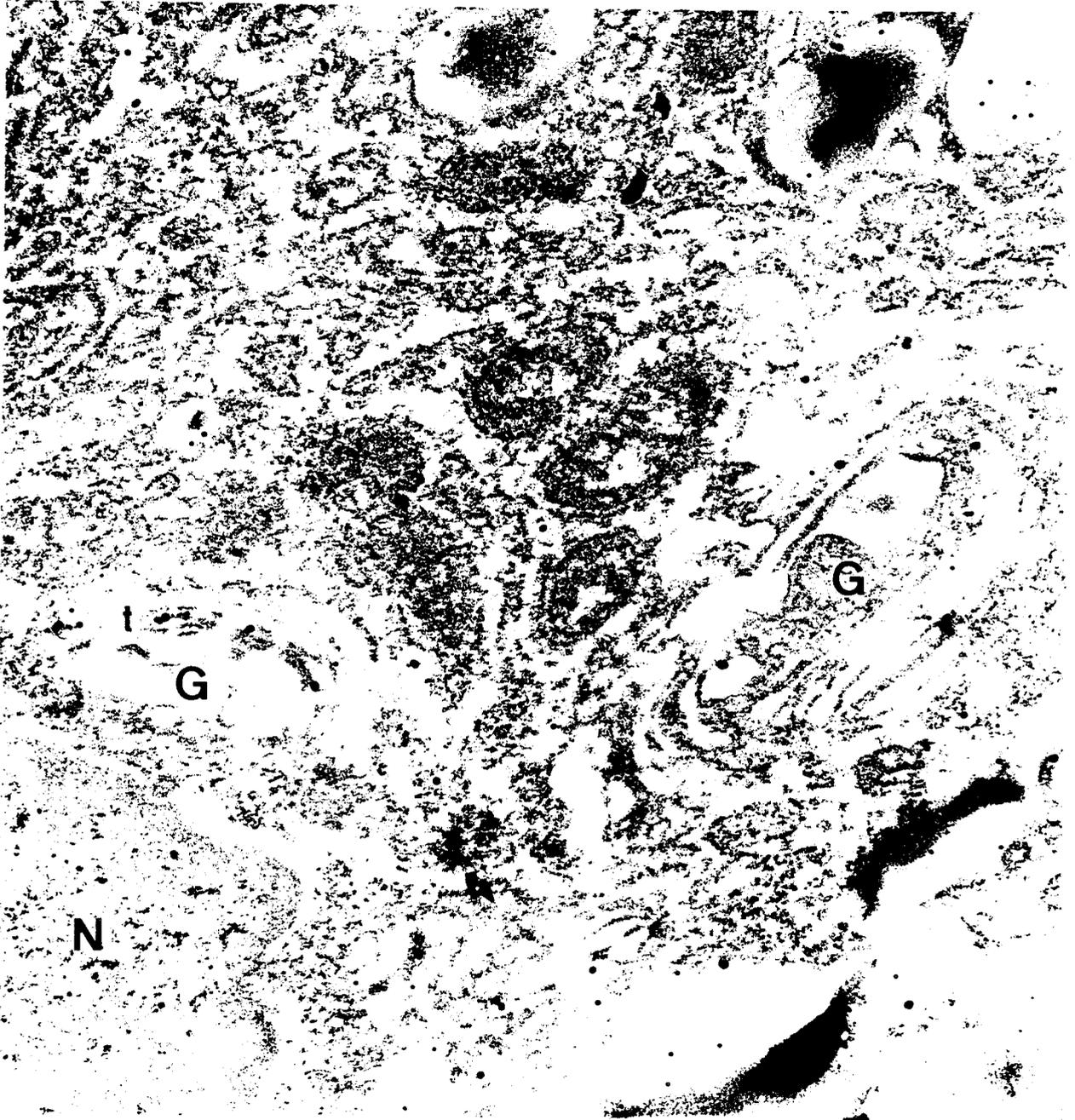


FIGURA.12: Mucosa gástrica normal. Doble marcaje con PNA y SBA sobre el moco de vacuolas maduras. Observese el predominio de restos de Gal. (PNA-oro coloidal 15nm. SBA-oro coloidal 30nm.20.000x)



**FIGURA.13:** Mucosa gástrica normal. Doble marcaje con PNA y SBA. Se observa reacción fundamentalmente con SBA sobre la cara de maduración (t) del aparato de Golgi (G), y con PNA sobre las vacuolas mucosas. (PNA-oro coloidal 15nm. SBA-oro coloidal 30nm. 12.000x)

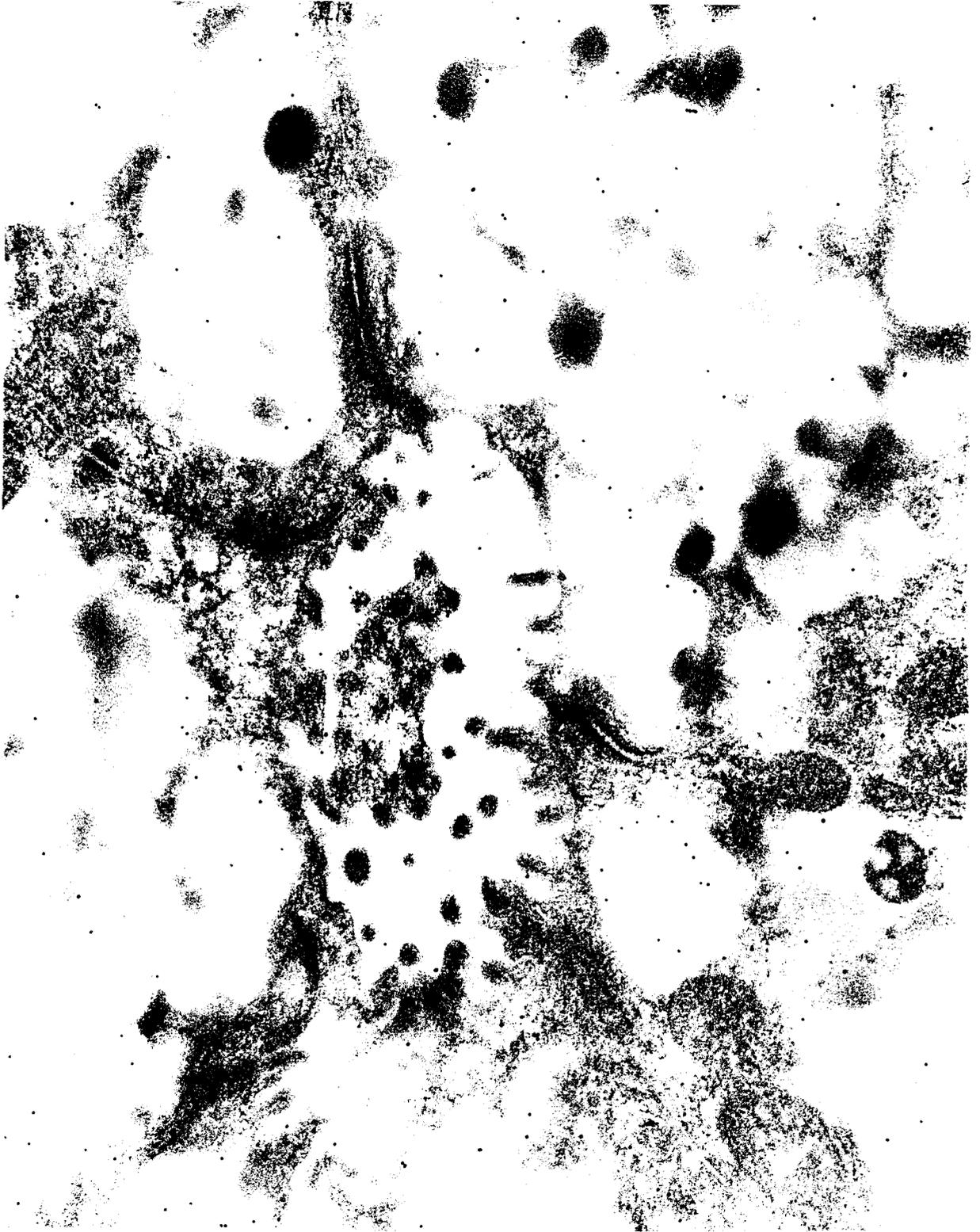


FIGURA.14: Mucosa gástrica metaplásica. Marcaje de restos de  $\alpha$ -fucosa sobre el moco de células califormes. (UEA-I. 12.000x)



FIGURA.15: Mucosa gástrica metaplásica. Inclusión en resina Spurr. Discreto marcaje de restos de NAcGal en el moco de una célula caliciforme. (SBA. 7.000x)

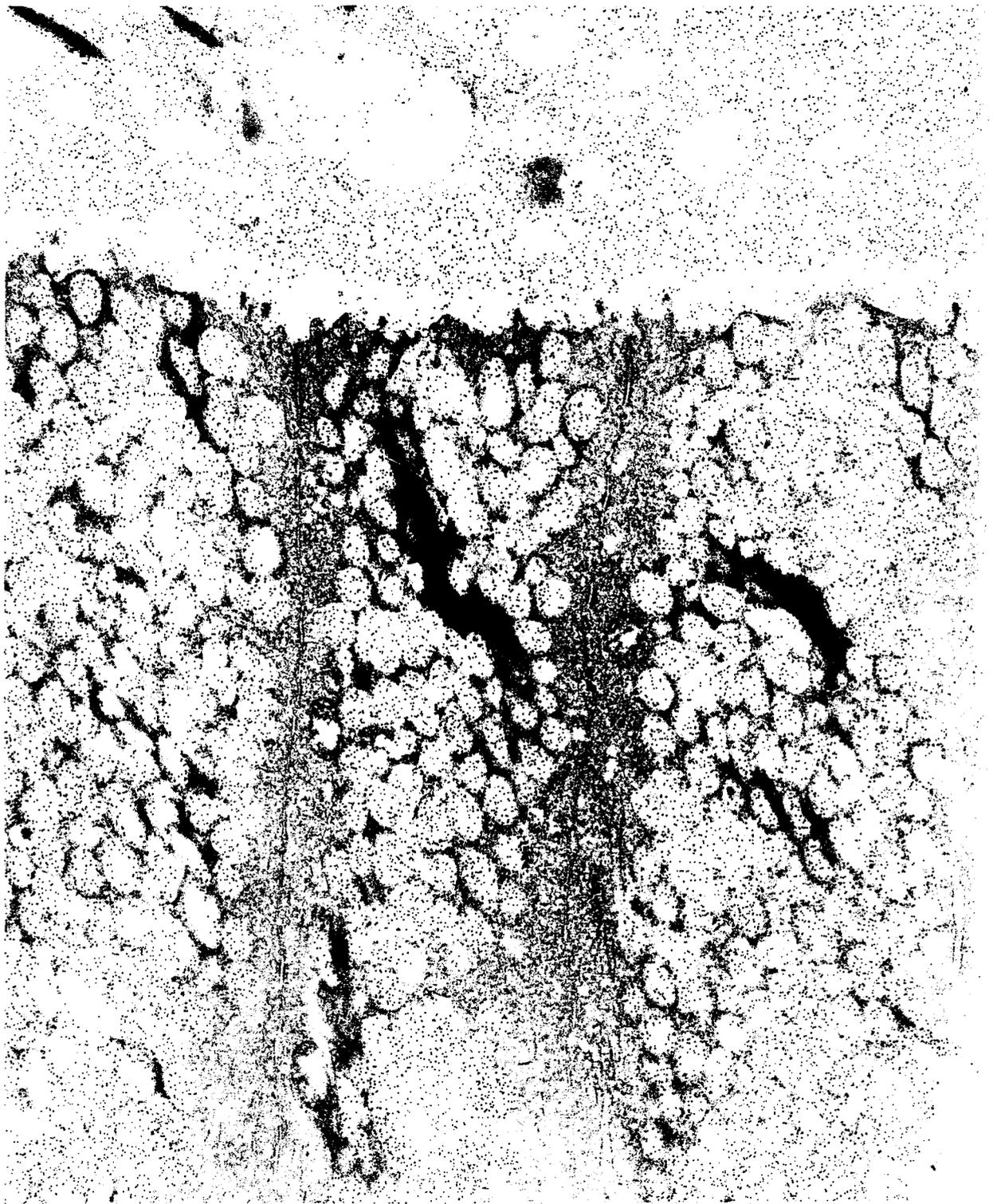


FIGURA.16: Mucosa gástrica metaplásica. Marcaje con PNA tanto del moco intracelular como luminal. (PNA. 4.400x)

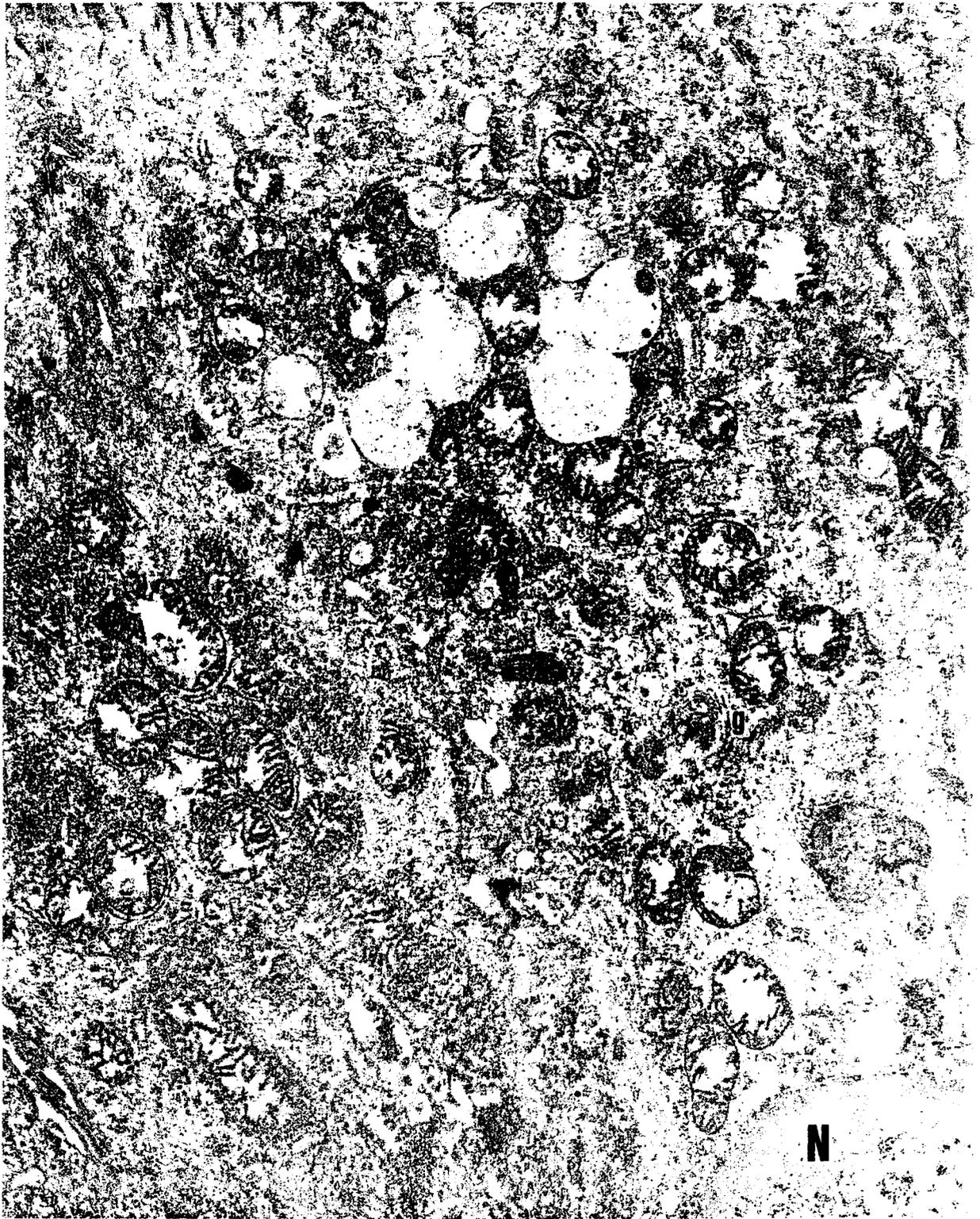


FIGURA.17: Mucosa gástrica metaplásica. Marcaje sobre el moco apical y zona del aparato de Golgi (g) de restos de NAcGlc. (WGA. 4.400x)

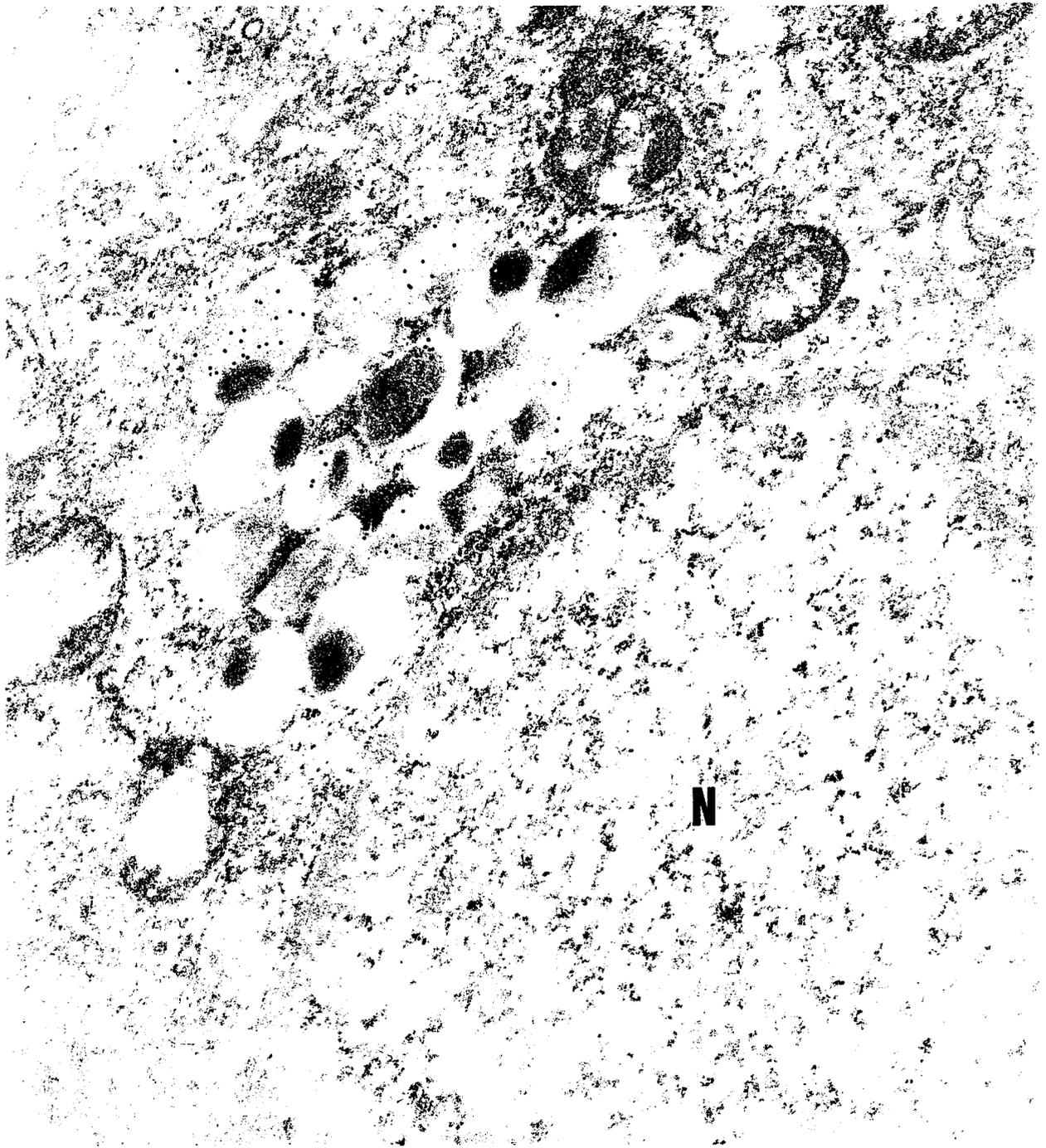


FIGURA.18: Carcinoma tipo "célula intestinal". Marcaje del moco supranuclear con PNA. (PNA. 12.000x)

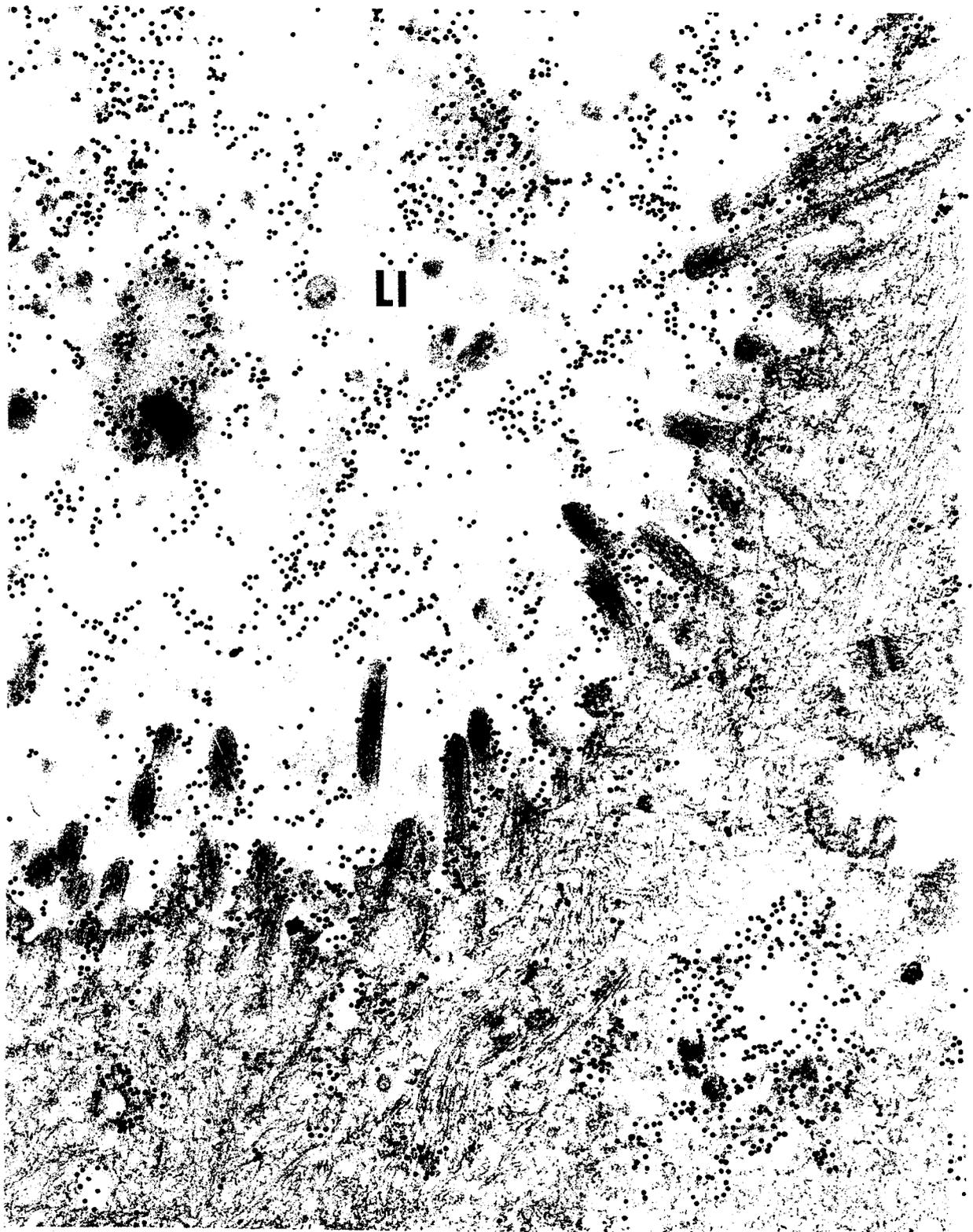


FIGURA.19: Carcinoma tipo "célula intestinal". Luz intracelular (LI) con intensa reacción para PNA. (PNA. 20000x)

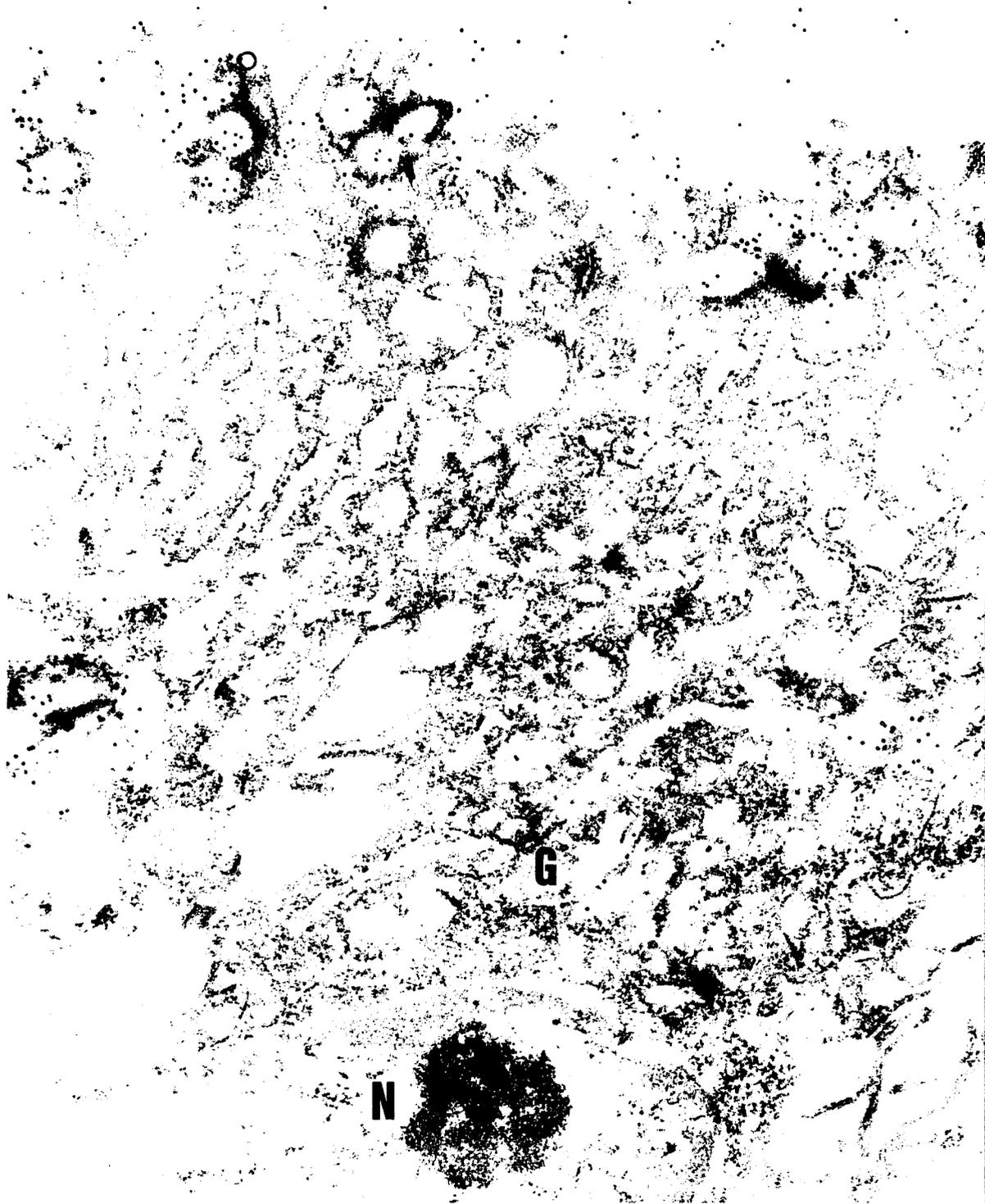


FIGURA.20: Carcinoma tipo "célula intestinal". Marcaje de restos de NAcGal a nivel de la zona del aparato de Golgi (G), vacuolas mucosa apicales y moco extracelular. (SBA. 12.000x)

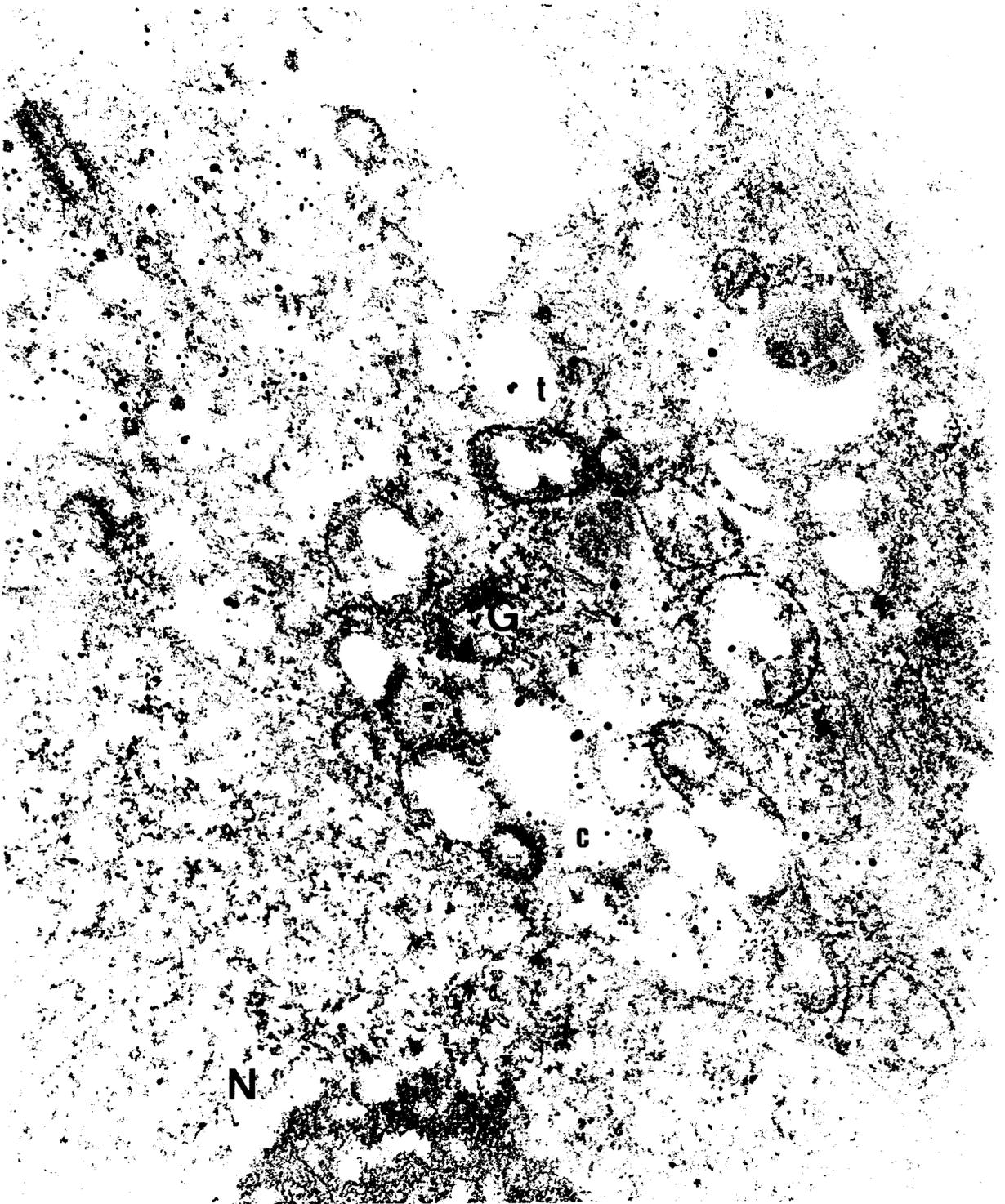


FIGURA.21: Carcinoma tipo "célula intestinal". Doble marcaje con PNA y WGA a nivel de la zona del aparato de Golgi (G) sin distribución topográfica definida. (PNA-oro coloidal 15nm. WGA-oro coloidal 30nm. 20.000x)



FIGURA.22: Carcinoma tipo difuso. Célula en "anillo de sello" con intensa reacción para WGA sobre el moco intracitoplasmático. (WGA. 3.000x)

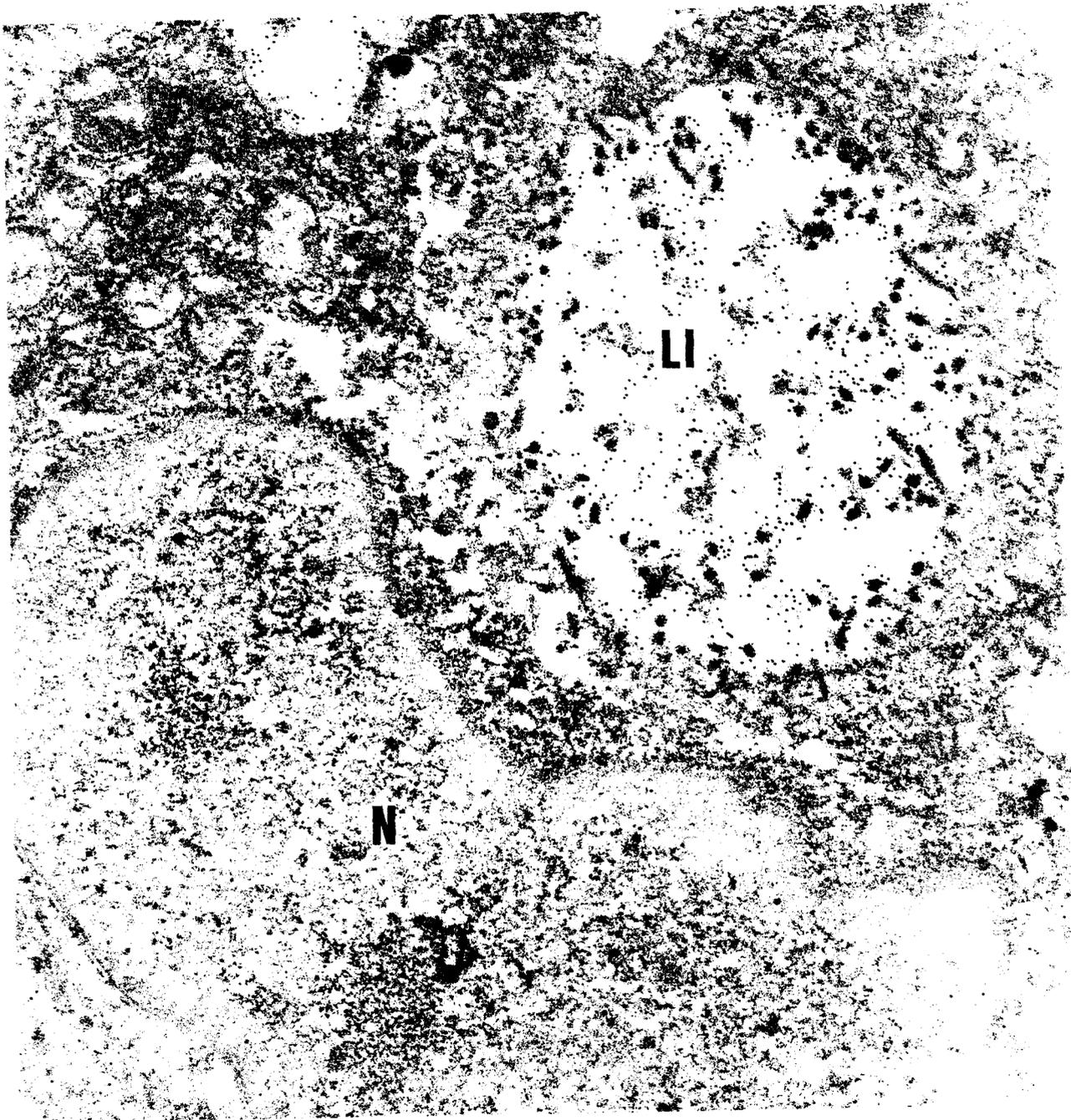


FIGURA.23: Carcinoma de tipo difuso. Luz intracelular (LI) con secreción mucosa abundante en restos de NAcGlc. (WGA. 7.000x)

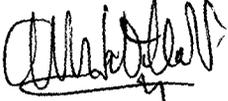
# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por sus señores miembros  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Juan José Luis Martín  
titulado Localización estructural de restos arqueológicos  
a lo largo de un sector de la muralla de Sevilla,  
en el barrio de San Andrés.  
acordó otorgarle la calificación de apto por unanimidad  
(con laude).

Sevilla, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 19\_\_

El Vocal,



El Presidente,

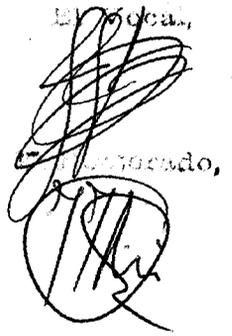


El Vocal,



El Secretario,

El Vocal,



El Secretario,