



## Biological relevance of a mysterious hydroxyl group

**Title in Spanish:** *Relevancia biológica de un misterioso grupo hidroxilo*

M.<sup>a</sup> del Carmen Avendaño López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid.

**ABSTRACT:** Evolution is linked to gene loss, being of biological relevance the inactivation of *CMAH* gene which made humans genetically unable to produce the sialic acid *N*-glycolylneuraminic (Neu5Gc). This acid acts as a foreign antigen after incorporation into tissues from dietary components, interacting with human anti-Neu5Gc antibodies thus promoting inflammation and cancer progression. Xenotransplants, stem cells and drugs of biological origin may be contaminated by Neu5Gc. The binding chemistry of the monoclonal antibody 14F17, which is able to discriminate the tumor-specific antigen *N*-glycolyl GM3 from the closely related *N*-acetyl GM3 on the basis of the presence of a single additional hydroxyl group in the former, reveals some clues of this phenomenon that could be of interest in new cancer immunotherapy approaches.

**RESUMEN:** La evolución lleva consigo la pérdida de diversos genes ancestrales, siendo relevante la inactivación en los seres humanos del gen *GMAH* que nos hace genéticamente incapaces para producir el ácido siálico *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc). Este ácido se comporta como un antígeno extraño si se incorpora a los tejidos a partir de componentes alimentarios, pudiendo interactuar con anticuerpos humanos anti-Neu5Gc y promover inflamación y cáncer. Xenotrasplantes, células madre y medicamentos de origen biológico pueden estar contaminados con Neu5Gc. El conocimiento de las interacciones de enlace en el anticuerpo monoclonal 14F17, capaz de discriminar el antígeno tumoral *N*-glicolil GM3 de su análogo *N*-acetilado debido a la presencia de un grupo hidroxilo adicional, está dando algunas claves de este fenómeno, cuya aplicación podría ser de interés en la inmunoterapia del cáncer.

\*Corresponding Author: [avendano@farm.ucm.es](mailto:avendano@farm.ucm.es)

Received: July 5, 2016 Accepted: July 5, 2016

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 3 (2016), pp. 274-282

Language of Manuscript: Spanish

### 1. LA EVOLUCIÓN ESTÁ LIGADA A LA PÉRDIDA DE GENES O DE SU FUNCIÓN

La enorme cantidad de datos que están proporcionando los estudios genómicos comparados gracias a los avances tecnológicos y metodológicos, está demostrando que la ausencia de un gen o cualquier variación génica que suponga una pérdida de función en la evolución de una determinada especie es de gran relevancia en biología y biomedicina, siendo especialmente importante el conocimiento de los genes esenciales para la vida y de los que son responsables de las enfermedades humanas (1). Los Dres. Cañestro y Albalat concluyen en una reciente revisión, a través de ejemplos que abarcan desde las bacterias a los hongos y desde las plantas a los animales incluyendo a los seres humanos, que el motor de la evolución ha sido la pérdida de genes ancestrales (2), de forma que la evolución no ha supuesto una mayor complejidad en los humanos por ganancia de genes (3) sino que los animales, y también los hombres, han perdido genes que compartíamos. Un ejemplo representativo es *Oikopleura dioica* (Figura 1), un organismo marino de unos tres milímetros que posee boca, ano, cerebro y corazón y forma parte del plancton en los mares tropicales y templados. Este organismo empezó a perder el 30% de los genes que compartía con los seres humanos hace unos

500 millones de años, y hoy carece de los genes necesarios para la síntesis de ácido retinoico, fabricando sus órganos en su ausencia (mientras que prácticamente todos los animales utilizan una cascada de genes para sintetizarlo, ya que éste tiene un papel importantísimo en el crecimiento y diferenciación celular para formar los distintos órganos) (4).



Figura 1. *Oikopleura dioica*.

Dentro de los primates, las enormes diferencias entre los humanos y los chimpancés se suelen asociar a una mayor pérdida de genes en estos últimos (5). No obstante, hoy se sabe que un gran número de genes humanos parecen no ser indispensables al menos para la supervivencia de las células cancerosas, lo que se conoce como *gene knockout paradox*.

Hay pérdidas genéticas que son difíciles de racionalizar. Por ejemplo: ¿por qué a lo largo de 300 millones de años el cromosoma Y humano ha perdido alrededor del 97% de sus genes ancestrales a pesar de ser esencial para la viabilidad de los varones y la diferenciación fenotípica entre los sexos? (6). Sin embargo, la paradoja genética anteriormente mencionada se ha explicado en varios casos de evolución positiva en los que se han perdido genes o su función por ser ésta innecesaria o porque ha supuesto una ventaja ante la presencia de factores ambientales nuevos, como puede ser adquirir resistencia ante una enfermedad (7). Por ejemplo, la delección genética de una porción del gen *CCR5* situado en la posición 21 del cromosoma 3 humano va ligada a la resistencia a la infección por virus VIH-1M-tropicos, porque este gen codifica a la quimiocina receptora de tipo 5 (*CCR5* ó *CD195*). Ésta es una proteína de transmembrana que funciona como correceptor para la entrada de dichos virus al interior celular (8), aunque se cree que como el SIDA es una enfermedad muy moderna en los seres humanos, la selección del alelo no funcional de *CCR5* se produjo por la presión de otros virus.

En la evolución de los homínidos, la funcionalización del gen *MYH16* (*myosin heavy chain 16*) resultó innecesaria cuando el cambio de dieta redujo la necesidad de disponer de unos músculos poderosos en las mandíbulas, por lo que la pérdida de dicho gen en el linaje humano tras su separación de los chimpancés podría haber facilitado un aumento del tamaño del cerebro (9). Otro ejemplo de diferenciación de otros primates ocurrió poco antes de que los humanos emigraran de África y consistió

en la fijación de un alelo nulo de la enzima caspasa-12, lo que se asocia a una protección frente a las sepsis severas (10). Se han propuesto diversos mecanismos de resistencia a la malaria ligados a una variabilidad genética (11). Por ejemplo, la resistencia a la malaria causada por las especies *Plasmodium knowlesi* y *Plasmodium vivax* se ha asociado a una mutación del gen *DARC*, que impide la expresión en los eritrocitos del receptor del antígeno Duffy para las quimiocinas (*DARC*). Este antígeno es conocido también como glicoproteína FY ó como CD234. Otra selección positiva relaciona la mayor protección frente malaria producida por *P. falciparum* en áreas donde es endémica con la mayor frecuencia de individuos con glóbulos rojos del grupo sanguíneo O (12). Esta ventaja estaría ligada a la delección en éstos de la guanina-258, que origina una glicosiltransferasa incapaz de modificar el antígeno H (13).

## 2. PÉRDIDA DE LA FUNCIONALIZACIÓN DEL GEN *CMAH*

Los chimpancés, bonobos, gorilas y orangutanes no sufren enfermedades cardíacas, cánceres, artritis reumatoide o asma bronquial frecuentes en humanos. Tampoco enferman de malaria. Estas diferencias se asocian a su capacidad para producir el ácido *N*-glicolilneuramínico (*Neu5Gc*), mientras que los seres humanos producen su precursor *N*-acetilneuramínico (*Neu5Ac*) pero carecen de la hidroxilasa *CMAH* que introduce el átomo de oxígeno extra para transformarlo en *Neu5Gc*. Según se indica en la Figura 2, esta oxidación es irreversible y ocurre a nivel del ácido citidina monofosfato-*N*-acetilneuramínico (*CMP-Neu5Ac*) para originar ácido citidina monofosfato-*N*-glicolilneuramínico (*CMP-Neu5Gc*). La no funcionalización del gen *CMAH* que codifica esta enzima ocurrió hace aproximadamente 3,2 millones de años, tras la divergencia de los humanos y los grandes simios africanos (14).

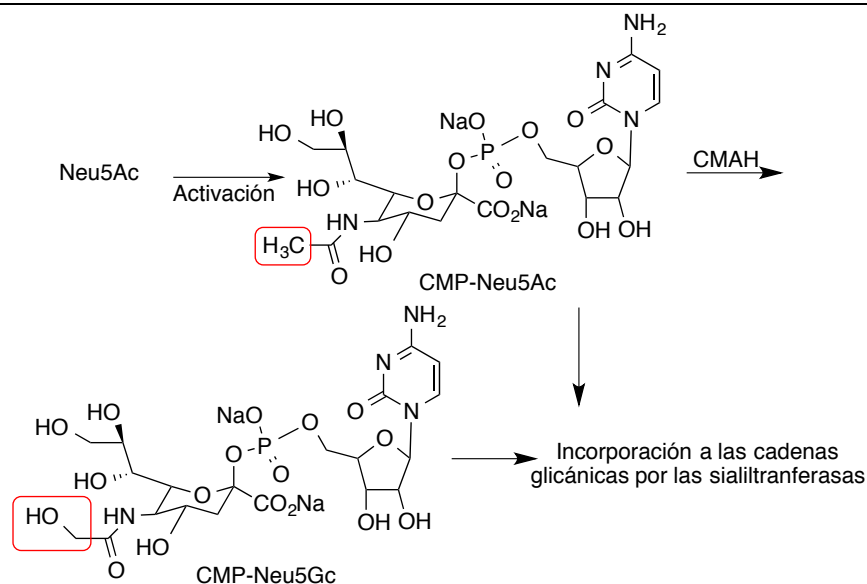


Figura 2. Reacción catalizada por la enzima *CMAH*

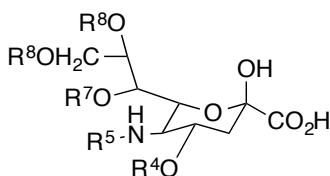
Debido a que los humanos son capaces de producir anticuerpos específicos contra Neu5Gc, la antigenicidad de las hembras podría haber eliminado los antígenos paternos extraños y fijar la pérdida de función en los alelos reduciendo la compatibilidad reproductora (15). Se cree que esta delección permitió que el cerebro humano siguiera creciendo tras el nacimiento (Figura 3) (16), aunque también podría haber estado motivada por una grave infección, ¿quizás de origen extraterrestre? (17), causada por microorganismos que se enlazan específicamente a Neu5Gc, cuya ausencia favorecería que la infección dejara de progresar (18). Una de estas infecciones podría haber sido la malaria originada por *P. falciparum*, ya que esta especie tiene como diana al ácido Neu5Gc presente en los glóbulos rojos. Este exitoso resultado podría haber sido posible hasta nuestros días si *P. falciparum* no hubiera evolucionado para superar este mecanismo de resistencia.



Figura 3. Reconstrucción de un *Homo erectus* hembra.

### 3. ÁCIDOS NEU5AC Y NEU5GC

Neu5Ac y Neu5Gc son derivados del ácido neuramínico (5-amino-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulosónico) y pertenecen al grupo de los ácidos siálicos. En ellos, el grupo amino del ácido neuramínico está sustituido por un grupo acetilo (ácido *N*-acetilneuramínico, Neu5Ac) o un grupo glicolilo (ácido *N*-glicolilneuramínico, Neu5Gc) (Figura 4).



$R^4 = R^7 = R^8 = H$

$R^5 = CH_3CO$ , Ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac)

$R^5 = HOCH_2CO$ , Ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc)

Figura 4. Estructura de los ácidos siálicos Neu5Ac y Neu5Gc

Desde que la estructura del ácido *N*-acetilneuramínico

se estableció en 1972 por métodos químicos y enzimáticos (19) se han identificado y caracterizado otros muchos derivados en los que los grupos hidroxilo están sustituidos por acetilo, lactilo, fosfato, sulfato o metilo, o se encuentran formando estructuras de tipo lactona. Todos son cetoácidos con un esqueleto glucídico de nueve carbonos que proviene de la adición de fosfoenolpiruvato (PEP) a un esqueleto glicídico de seis carbonos y se encuentran en estado libre en su forma hemiacetálica  $\beta$ -piranósica o en su forma  $\alpha$ -piranósica incorporados a glicoproteínas, glicolípidos o proteoglicanos. Las células de mamífero poseen en su superficie una variedad de estos glicoconjugados en los que los ácidos siálicos ocupan generalmente una posición terminal. Por ello, están implicados en los procesos de reconocimiento celular (20): interacciones ligando-receptor, célula-célula y célula-patógeno (21). En particular, los sialoglicoesfingolípidos (gangliósidos) (22) son componentes de la membrana en las células eucarióticas que modulan la transducción de señales a su interior.

Los ácidos siálicos y sus enzimas anabólicas (sialiltransferasas) (23) o catabólicas (sialidasas, *N*-acetilneuraminosil glicohidrolasas o neuraminidasas) (24) se encuentran también en algunos microorganismos, entre ellos ciertas bacterias y protozoos patógenos, que los han adquirido por transferencia génica a partir de sus hospedadores y los utilizan para establecer relaciones simbióticas o parasitarias. Su existencia puede contribuir a la supervivencia de éstos en el huésped, escapando de sus mecanismos de defensa y contribuyendo a su difusión por ataque a polímeros glicánicos en las superficie de sus células (25). Las estructuras proteicas o lipídicas de los virus pueden estar también sialiladas (26), lo que puede ser trascendental para su difusión (27).

Como ya hemos comentado, la ausencia de Neu5Gc nos hace inmunes a diversos patógenos. Entre ellos también se encuentra la bacteria *Escherichia coli* K12, que produce diarreas graves en cerdos, terneros y corderos recién nacidos, pero no lo hace en neonatos humanos. Esta diferencia se debe a que la mucosa intestinal de éstos carece de dos gangliósidos que contienen Neu5Gc a los que se enlaza específicamente dicho microorganismo: *N*-glicolil-GM3 y *N*-glicolilsialo-paraglobósido (Figura 5) (28).

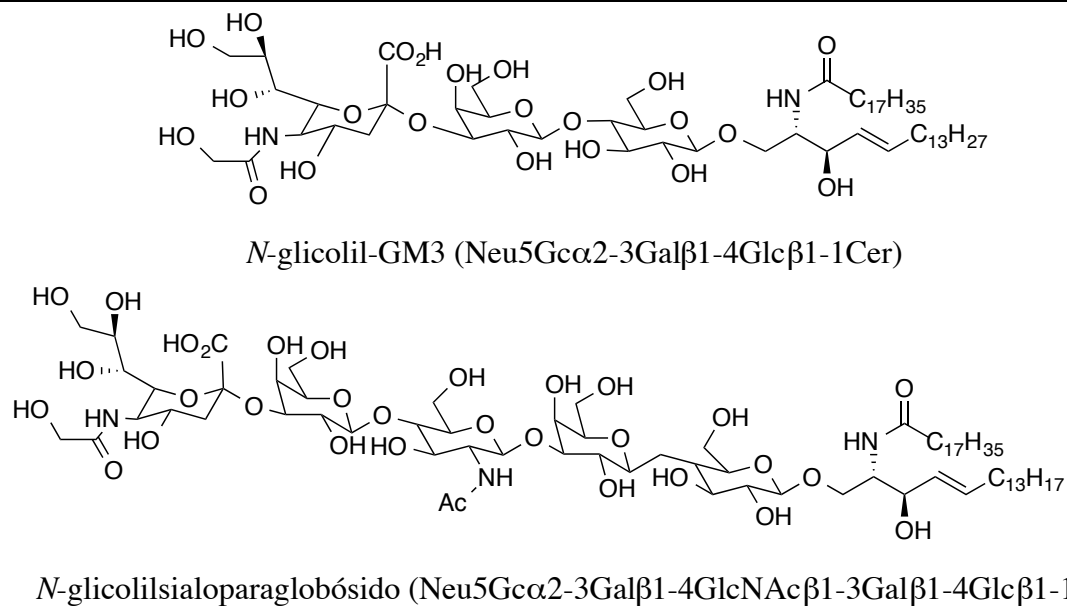


Figura 5. Estructuras de (Neu5Gc)GM3 y (Neu5Gc)sialoparaglobósido

#### 4. INCORPORACIÓN DE NEU5GC A TEJIDOS HUMANOS. SU RELEVANCIA

Aunque el gen *CMAH* no es funcional en humanos, el ácido Neu5Gc se ha detectado en tejidos fetales y también existe en tejidos cancerosos, habiéndose propuesto como un marcador tumoral (29). Los humanos pueden incorporar ácido Neu5Gc procedente de la dieta, especialmente de las carnes rojas y de los productos lácteos (30), cuyo abuso podría generar una reacción antígeno-anticuerpo que induce inflamación crónica (31). A pesar de que la carne es uno de los alimentos que aporta más nutrientes (proteínas de alta calidad, hierro, zinc y vitaminas B6 y B12), el consumo de carnes rojas (vaca, cerdo y cordero) o procesadas se ha relacionado epidemiológicamente con la obesidad, la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares y los cánceres de múltiples órganos. Por ello, el Fondo Mundial para la Investigación sobre el Cáncer (*World Cancer Research Fund*) y el Instituto Americano de Investigación del Cáncer (*American Institute for Cancer Research*) estudian desde hace varios años la influencia de la dieta en su prevención. Aunque estos estudios observacionales se han considerado con reservas por varios autores (32), el comunicado emitido en octubre de 2015 por la OMS previniendo sobre la peligrosidad de la ingesta de carne roja y/o procesada originó la consiguiente alarma en la población (33). El efecto cancerígeno que puede producir el consumo inadecuado de las carnes rojas ha tratado de explicarse por diversos mecanismos, entre otros la generación al cocinarlas de compuestos mutagénicos como aminas aromáticas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, *N*-nitrosaminas y otros *N*-nitrosoderivados, o la generación de radicales libres producidos por el hierro del grupo hemo, pero ninguno de ellos se ha demostrado hasta el momento fehacientemente. Recientemente se ha impuesto la hipótesis de que la inflamación está causada por la xenosialititis (34).

Los orígenes de esta hipótesis se remontan a casi 100 años, cuando se describieron los anticuerpos denominados Hanganutziu-Deicher (H-D), que aglutinan eritrocitos en diversos enfermos independientemente de que éstos hayan estado expuestos o no a sueros animales (35). Posteriormente se demostró que la mayoría de estos anticuerpos reconocían a gangliósidos que contenían Neu5Gc (36). La hipótesis de la xenosialititis admite que, tras la ingesta de los alimentos que contienen ácido Neu5Gc, éste puede absorberse en su forma enlazada, metabolizarse e incorporarse a los tejidos humanos por pinocitosis. Tras su liberación a los lisosomas, puede exportarse como ácido libre al citoplasma, y con la participación del retículo endotelial y el aparato de Golgi (37), su incorporación a lipooligosacáridos humanos seguida de exocitosis puede generar anticuerpos anti-Neu5Gc. La interacción antígeno-anticuerpo puede producir inflamación, y ésta la progresión tumoral (38). Al parecer, las condiciones hipóxicas de los tumores sólidos pueden estimular la expresión del transportador lisosomal necesario para la exportación de Neu5Gc, y los factores de crecimiento pueden incrementar la pinocitosis y la incorporación de Neu5Gc a los tejidos.

Así pues, este ácido es para los humanos un compuesto inmunogénico y posiblemente un inductor de tumores que, funcionando como un antígeno heterófilo (externo), induce anticuerpos heterófilos que pueden ser muy diversos al dirigirse a diferentes epítopos de la macromolécula que contiene Neu5Gc (generalmente inmunoglobulinas M, IgM) (39). Se ha demostrado en ratones con una deficiencia de Neu5Gc semejante a la humana, que los anticuerpos anti-Neu5Gc aparecen durante la infancia y se corresponden con una dieta en la que está presente el ácido Neu5Gc, si bien esta circunstancia no puede por sí sola inducirlos ya que es necesaria la cooperación del los virus *Haemophilus influenzae* no tipificables (NTHi). Estos virus son responsables de infecciones producidas en la

infancia como otitis, sinusitis, conjuntivitis, neumonía y ocasionalmente de infecciones invasivas, y en ellos existen trazas exógenas de Neu5Gc que se han incorporado a sus lipooligosacáridos de superficie (40).

Aunque el proceso por el que se evita la acumulación continua de Neu5Gc no se conoce con detalle, se ha demostrado que los niveles de Neu5Gc exógeno se regulan. En las células humanas cultivadas en un medio suplementado con este ácido siálico, los niveles de ácido incorporados disminuyen con el tiempo utilizando el metabolismo de las *N*-acetilhexosaminas. Neu5Gc se

convierte primero por la acción de la piruvatoliasa en *N*-glicolilmanosamina (ManNGc), que se epimeriza a continuación (posiblemente por la catálisis de la enzima GlcNAc-2'-epimerasa) a *N*-glicolilglucosamina (GlcNGc). Ésta se fosforila en la posición 6 por la acción de la enzima GlcNAc cinasa para dar *N*-glicolilglucosamina 6-fosfato (GlcNGc-6-P), y este último metabolito se desglicosila de forma irreversible por la enzima GlcNAc-6-P desacetilasa para dar glucosamina-6-fosfato (GlcNH<sub>2</sub>-6-P) y glicolato, una molécula capaz de entrar en el ciclo del ácido cítrico transformándose en glioxilato (Figura 6) (41).

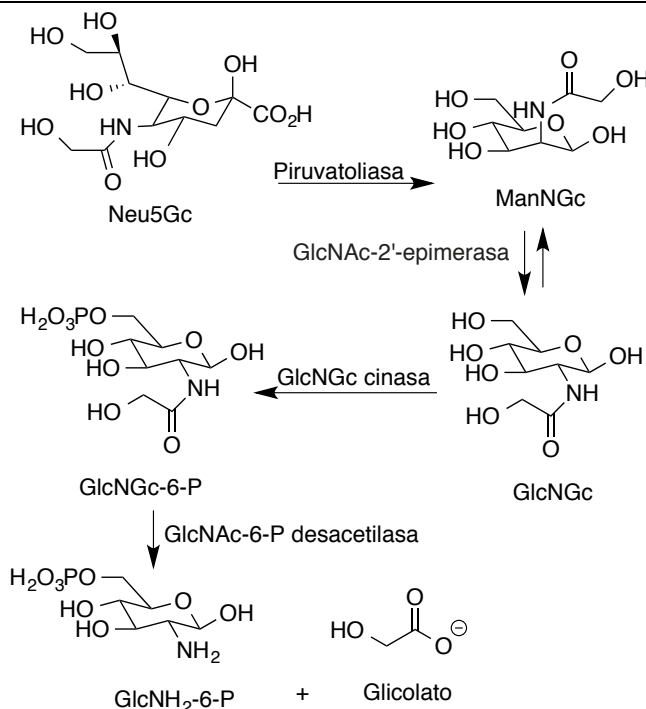


Figura 6. Eliminación de Neu5Gc en células humanas cultivadas en un medio suplementado con este ácido.

Aunque es razonable que los distintos sustituyentes en los gros OH y NH hagan variar su susceptibilidad a diferentes enzimas, todavía resulta misterioso cómo la sustitución de un grupo acetilo por un grupo glicolilo se traduce en una distribución específica según las especies y los tejidos y en unas funciones biológicas muy diferentes. ¿Es el hidroxilo adicional del ácido Neu5Gc responsable de su toxicidad?. Los ácidos siálicos tienen en común el estar cargados negativamente a pH fisiológico y, si se consideran ambas moléculas aisladas, este grupo podría alterar el pK<sub>a</sub> (42). También es razonable que el ácido Neu5Gc sea algo más hidrófilo que Neu5Ac, pero estas diferencias influirían muy poco en las propiedades biofísicas. Sin embargo, si se reemplazan los millones de moléculas de ácido Neu5Ac que se encuentran en la superficie de los eritrocitos y de las neuronas humanas por moléculas de ácido Neu5Gc, la carga eléctrica superficial (43) y/o la hidrofobicidad y lipofobicidad relativas de estas células puede verse muy afectada. La glicosilación aberrante de la superficie celular es una característica bien conocida de las células cancerosas, por lo que un aumento en la sialación y la acumulación de Neu5Gc pueden ser

características del desarrollo de malignidades (44).

## 5. NUEVAS APROXIMACIONES AL TRATAMIENTO DEL CÁNCER BASADAS EN LA PRESENCIA DE NEU5GC

Varias familias de carbohidratos son antígenos tumorales que se expresan en las células malignas a niveles más altos que en las normales, por lo que se denominan *tumor-associated carbohydrate antigens* (TACAs). Estos carbohidratos pueden ser glicolípidos, que contienen un azúcar enlazado covalentemente a un lípido que se ancla en la bicapa lipídica de la membrana celular como la ceramida, o glicoproteínas en las que el azúcar está enlazado a un grupo hidroxilo de residuos de serina o treonina de una proteína. Entre los glicolípidos se incluyen gangliósidos (45) como GM1 y globósidos como Globo-H, y entre las glicoproteínas Tn, TF y STn. Actualmente se están ensayando en humanos varias vacunas terapéuticas sintéticas que contienen estos antígenos. Una de ellas, la vacuna Globo-H-KLH se encuentra en ensayos de fase II/III para el cáncer de mama metastásico (46).

Por otra parte, aunque los conocimientos que



relacionan Neu5Gc con el cáncer se encuentran todavía en la infancia (47), éstos se están incorporando a su prevención y tratamiento. La generación de anticuerpos antigangliósido ha sido difícil debido a que, en general, los carbohidratos son poco inmunogénicos y es frecuente que los anticuerpos IgM que se aíslan tengan baja afinidad y especificidad (48). Afortunadamente, se ha demostrado que la vacunación con diversas glicoproteínas como Neu5Gc-Tn que contienen Neu5Gc como azúcar terminal, asociadas a la mucina MUC1, induce una respuesta inmune en tumores epiteliales (49, 50).

Puesto que los niveles del gangliósido (Neu5Gc)GM3 están aumentados en el cáncer de mama humano y el melanoma (51), su administración podría inducir la generación de anticuerpos. En efecto, un ensayo clínico de fase I ha indicado que la vacunación con proteoliposomas que contienen (Neu5Gc)GM3 induce la producción de anticuerpos en cáncer de mama avanzado (52).

En cuanto al desarrollo y utilización de anticuerpos humanos, son pocos los que se conocen actualmente con capacidad para reconocer selectivamente epítomos glicánicos que contengan ácido Neu5Gc. La gran mayoría de anticuerpos antigangliósidos son inmunoglobulinas M (IgMs), mientras que los anticuerpos anti-Neu5Gc suelen ser inmunoglobulinas G (IgG) (54). La inmunización de ratones con el gangliósido (Neu5Gc)GM3 conjugado con lipoproteínas de baja densidad permitió el aislamiento del anticuerpo específico 14F7, que es capaz de discriminarlo de (Neu5Ac)GM3 (53). Este anticuerpo es excepcional en muchos aspectos y ha despertado gran interés. El anticuerpo 14F7 pertenece a la subclase IgG1 y es específico de tumores sólidos, produciendo la desintegración de la membrana celular (55). Tras humanizarse, 14F7 se está empezando a estudiar clínicamente como una vacuna terapéutica para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas con el nombre de racotumumab (Vaxira®) (56).

Los aminoácidos de la cadena de la región variable que contribuyen a la exquisita especificidad del anticuerpo 14F7 se han identificado a través de un extenso estudio de mutagénesis (57) pero, debido fundamentalmente al gran tamaño y flexibilidad de los gangliósidos y a pesar de la utilización de numerosos abordajes (58), todavía no se conocen las interacciones precisas de los complejos entre estos ligandos y 14F7.

y los gangliósidos. Un estudio de la estructura cristalina del fragmento Fab (*Fragment antigen-binding*) de este anticuerpo y de su modelo *docking* con *N*-glycolyl GM3 ha demostrado que Fab 14F7 contiene un lazo muy largo que divide al lugar de unión al antígeno en dos subsitios (59). Uno de éstos, formado exclusivamente por aminoácidos de la cadena pesada, es el que se enlaza. El grupo hidroximetilo que desicrimina *N*-glicolil GM3 *versus* *N*-acetil GM3 se sitúa en una cavidad hidrófila, formando enlaces de hidrógeno con el grupo carboxilo de Asp H52, el grupo NH indólico de Trp H33 y el grupo hidroxilo de Tyr H50. Este nicho no es favorable para la unión con el grupo metilo hidrófobo y, de hecho, la

mutación de Asp H52 por residuos hidrófobos de tamaño similar como valina o isoleucina imposibilita su enlace con *N*-glicolil GM3.

## 6. CONTAMINACIÓN DE XENOTRASPLANTES, CÉLULAS MADRE Y MEDICAMENTOS DE ORIGEN BIOLÓGICO CON NEU5GC

La presencia de trazas de Neu5Gc puede ser un gran problema clínico. La inmunoterapia con anticuerpos monoclonales frente a epítomos tumorales se ha integrado en los tratamientos del cáncer (trastuzumab contra HER2, cetuximab contra el receptor EGF, o rituximab contra CD20 son algunos ejemplos) (60). En la producción industrial de estas glicoproteínas deberían evitarse medios que contengan células que expresen Neu5Gc, a fin de aumentar su vida media y reducir su inmunogenicidad. Se ha demostrado que en la producción de cetuximab la incorporación de Neu5Gc aumenta la formación de complejos inmunes y promueve una mayor eliminación (61).

Por otra parte, el cultivo de células madre embrionarias humanas para su uso en terapias de reemplazamiento de células y tejidos, no debe hacerse en sueros animales, ya que éstos son fuente de Neu5Gc que se incorpora metabólicamente a dichas células. Cuando éstas se exponen a sueros humanos con anticuerpos específicos anti Neu5Gc se produce su muerte *in vivo*, por ello es necesaria la eliminación completa del Neu5Gc si se utiliza suero humano y el uso de células madre embrionarias que nunca se hayan expuesto a productos animales (62).

## 7. REFERENCIAS

1. Ritchie MD, Holzinger ER, Li R, Pendergrass SA, Kim D. Methods of integrating data to uncover genotype-phenotype interactions. *Nat Rev Genet* 2015; 16: 85-97.
2. Albalat R, Cañestro C. Evolution by gene loss. *Nature Rev Genetics* 2016; doi:10.1038/nrg.2016.39.
3. Szathmary E, Jordan F, Pal C. Molecular biology and evolution. Can genes explain biological complexity? *Science* 2001; 292: 1315-16.
4. Okuno M, Kojima S, Matsushima-Nishiwaki R, Tsurumi H, Muto Y, *et al.* Retinoids in cancer chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 285-98.
5. Demuth JP, De Bie T, Stajich JE, Cristianini N, Hahn MW. The evolution of mammalian gene families. *PLoS ONE* 2006; 1: e85.
6. a) Graves JAM. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* 2006; 124: 901-14. b) Bachtrog D. Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nature Rev Genet* 2013; 14: 113-24. c) Bellott DW, Hughes JF, Skaletsky H, Brown LG *et al.* Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature* 2014; 508: 494-99.
7. Papp B, Notebaart RA, Pal C. Systems-biology

- approaches for predicting genomic evolution. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 591-602.
8. Novembre J, Galvani AP, Slatkin M. The geographic spread of the CCR5  $\Delta$ 32 HIV-resistance allele. *PLoS Biol* 2005; 3: e339.
  9. Stedman HH, Kozyak BW, Nelson A, Thesier DM, *et al.* Myosin gene mutation correlates with anatomical changes in the human lineage. *Nature* 2004; 428: 415-18.
  10. Wang X, Grus WE, Zhang J. Gene losses during human origins. *PLoS Biol* 2006; 4: e52.
  11. López C, Saravia C, Gómez A, Hoebcke J, Patarroyo MA. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. *Gene* 2010; 467: 1-12.
  12. Hedrick PW. Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity* 2011; 107: 283-304.
  13. Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990; 345: 229-33.
  14. Schauer R, Malykh YN, Krisch B, Gollub M, Shaw L. Biosynthesis and biology of *N*-glycolilneuraminic acid. En: Inoue Y, Lee YC, Troy FA II Eds. *Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosilation*. Osaka. Japón: Gakushin Publishing Co. 1999: pp. 17-27.
  15. Ghaderi D, Springer SA, Ma F, Cohen M, *et al.* Sexual selection by female immunity against paternal antigens can fix loss of function alleles. *Proc Natl Acad Science* 2011; 108: 17743-8.
  16. Chou HH, Hayakawa T, Díaz S, Krings M, Indriati E, *et al.* Inactivation of CMP-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11736-41.
  17. a) Hoyle F, Wickramasinghe Ch. *Evolution from Space. A Theory of Cosmic Creationism*. Touchstone 1984; ISBN 0-671-49263-2. b) Altwegg K, Balsiger H, Bar-Nun A, Bertheliet J-J. Prebiotic chemicals-amino acid and phosphorus- in the coma of comet 67P/Churyumov-Gerasimenko. *Sci Adv* 2016; 2: e1600285.
  18. a) Hayakawa T, Aki I, Varki A, Satta Y, Takahata N. Fixation of the human-specific CMP-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase pseudogene and implications of haplotype diversity for human evolution. *Genetics* 2006; 172: 1139-46. b) Varki A. Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconjugate Journal* 2009; 26: 231-45.
  19. Tuppy H, Gottschalk A. Isolation and purification of sialic acids. In: Gottschalk A, Ed. *Glycoproteins, Their Composition, Structure and Function*. Amsterdam: Elsevier 1972; pp. 403-49.
  20. Kitajima K, Sato Ch. The Roles of Carbohydrate Binding in Cell Adhesion and Inflammation. In: Wang B, Boons G-J Eds. *Carbohydrate Recognition. Biological problems, methods and applications*. New York: John Wiley & Sons 2011; pp. 33-63.
  21. Angata T, Varki A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related  $\alpha$ -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. *Chem Rev* 2002; 102: 439-70.
  22. Cornish-Bowden A, Barrett AJ, Cammack R, Chester MA, *et al.* Nomenclature of glycolipids. *Carbohydr Res* 1998; 312: 167-75.
  23. Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. The human sialyltransferase family. *Biochimie* 2001; 83: 727-37.
  24. Coefield AP, Veh RW, Wember M, Megasilk JC, Achauer R. The release of *N*-acetyl- and *N*-glycolylneuraminic acid from soluble complex carbohydrates and erythrocytes by bacterial, viral and mammalian sialidases. *Biochem J* 1981; 197: 293-99.
  25. Reglero A, Bravo IG, Fernández-Martínez V. Ácidos siálicos: distribución, metabolismo y función biológica. *An R Acad Nac Farm* 2007; 73: 833-71.
  26. a) Lenard J, Comans RW. The membrane structure of lipid-containing viruses. *Biochim Biophys Acta* 2007; 344: 51-94. b) Shiraishi H, Kohoma T, Shipaishi R, Ishida N. Carbohydrate composition of hepatitis B surface antigen. *J Gen Virol* 1977; 36: 207-210.
  27. Gubareva L, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *The Lancet* 2000; 355: 827-35.
  28. Kyogashima M, Ginsburg V, Krivan HC. *Escherichia coli* K99 binds to *N*-glycolylsialoparagloboside and *N*-glycolyl-GM3 found in piglet small intestine". *Archiv Biochem Biophys* 1989; 270: 391-97.
  29. a) Irie A, Koyama S, Kozutsumi Y, Kawasaki T, Suzuki A. The molecular basis for the absence of *N*-glycolylneuraminic acid in humans. *J Biol Chem* 1998; 273: 15866-71. b) Varki A. Loss of *N*-Glycolylneuraminic Acid in Humans: Mechanisms, Consequences, and Implications for Hominid Evolution. *Yearbook of Physical Anthropology* 2001; 44: 54-69.
  30. Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, *et al.* Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *PNAS* 2003; 100: 12045-50.
  31. Samraj AN, Pearce OMT, Läubli H, Crittenden AN, *et al.* A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression, *PNAS* 2015; 11: 542-47.
  32. a) Klurfeld DM. Research gaps in evaluating the relationship of meat and health. *Meat Sci.* 2015; 109: 86-95. b) Celada P, Sánchez-Múniz FJ. Are meat and meat product consumptions harmful? Their relationship with the risk of colorectal cancer and other degenerative diseases". *An R Acad Farm* 2016; 82: 68-90.
  33. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, El Ghissassi, *et al.* Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncol* 2015; 16: 1599-1600.
  34. Lopez-García E, Schulze MB, Fung TT, Meigs JB, *et al.* Major dietary patterns are related to plasma

- concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1029–35
35. Hanganutziu M. Hémagglutinines hétérogénéiques après injection de sérum de cheval. *CR Séances Soc Biol* 1924; 91:1457-59.
36. Merrick JM, Zadarlik K, Milgrom F. Characterization of the Hanganutziu-Deicher (serum-sickness) antigen as gangliosides containing *N*-glycolylneuraminic acid. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1978; 57: 477-80.
37. Varki A. Uniquely human evolution of sialic acid genetics and biology. *Proc Nat Acad Sci* 2010; 107: 8939-46.
38. Samraj AN, Läubli H, Varki N, Varki A. Involvement of a non-human sialic acid in human cancer. *Front Oncol* 2014; 4: 33.
39. Padler-Karavani V, Yu H, Cao H, Chokhawala H, *et al.* Diversity in Specificity, Abundance and Composition of Anti-Neu5Gc Antibodies in Normal Humans: Potential Implications for Disease". *Glycobiology* 2008; 18: 818-30.
40. Taylor RE, Gregg CJ, Padler-Karavani V, Ghaderi D, *et al.* Novel mechanism for the generation of human xeno-auto-antibodies against the nonhuman sialic acid *N*-glycolylneuraminic acid. *J Exp Med* 2010; 207: 1637-46.
41. Bergfeld AK, Pearce OMT, Diaz SL, Pham T, Varki A. Metabolism of Vertebrate Amino Sugars with *N*-Glycolyl Groups. Elucidating the intracellular fate of the non-human sialic acid *N*-glycolylneuraminic acid. *J Biol Chem* 2012; 287: 28865-81.
42. Scheinthal BM, Bettelheim FA. Multiple forms of sialic acids. *Carbohydr Res* 1988; 6, 257-65.
43. Eylar EH, Madoff MA, Brody OV, Oncley JL. The contribution of sialic acid to the surface charge of erythrocyte. *J Biol Chem* 1962; 237: 1992-2000.
44. Varki A, Kannagi R, Toole BP. Glycosylation changes in cancer. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, *et al.* Eds. *Essentials of Glycobiology*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009: pp. 617-32.
45. Birklé S, Zeng G, Gao L, Yu RK, Aubry J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* 2003; 285: 455-63.
46. (a) Buskas T, Thompson P, Boons J-G. Immunotherapy for cancer: synthetic carbohydrate-based vaccines. *Chem Commun* 2009; 5335-49. (b) Zhu J, Warren JD, Danishefsky SJ. Synthetic carbohydrate-based anticancer vaccines: the Memorial Sloan-Kettering experience. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8:1399-1413; (c) Yin Z, Huang X. Recent Development in Carbohydrate Based Anticancer Vaccines. *J Carbohydr Chem* 2012; 31:143-86; (d) Fernández-Tejada A, Danishefsky SJ. *Carbohydr Chem* 2014; 40: 506-32.
47. Malykh YN, Schauer R, Shaw L. *N*-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie* 2001; 83: 623-34.
48. Mukerjee S, Nasoff M, Glassy M. Characterization of human IgG1 monoclonal antibody against gangliosides expressed on tumor cells. *Hybridoma* 1998; 17: 133-42.
49. Huang ZH, Shi L, Ma JW, Sun ZY, *et al.* A totally synthetic, self-assembling, adjuvant-free MUC1 glycopeptide vaccine for cancer therapy. *J Am Chem Soc* 2012; 134: 8730-33.
50. Kaur S, Kumar S, Momi N, Sasson AR, Batra SK. Mucins in pancreatic cancer and its microenvironment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 607-20.
51. a) Marquina G, Waki H, Fernández LE, Kon K, *et al.* Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 5165-71. b) van Crujisen H, Gallegos Ruiz M, van der Valk P, de Gruijl TD, Giaccone G. Tissue micro array analysis of ganglioside *N*-glycolyl GM3 expression and signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 activation in relation to dendritic cell infiltration and microvessel density in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 180.
52. Carr A, Rodríguez E, Arango MC, Camacho R, Osorio M, Gabri M, *et al.* Immunotherapy of advanced breast cancer with a heterophilic ganglioside (NeuGcGM3) cancer vaccine. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1015-2110.
53. a) Carr A, Mullet A, Mazorra Z, Vázquez AM, *et al.* A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for *N*-Glycolyl GM3 Ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* 2000; 19: 241-47. b) Carr A, Mesa C, Arango MC, Vázquez AM, *et al.* In Vivo and In Vitro Anti-Tumor Effect of 14F7 Monoclonal Antibody. *Hybridoma and Hybridomics*, 2002; 21: 463-68.
54. Lu Q, Padler-Karavani V, Yu H, Chen X, Wu SL, *et al.* LC-MS analysis of polyclonal human anti-Neu5Gc Xeno-autoantibodies IgG subclass and partial sequence using multi-step IVIG affinity purification and multi-enzymatic digestion. *Anal Chem* 2012; 84: 2761-68.
55. Roque-Navarro L, Chakrabandhu K, de Leon J, Rodríguez S, *et al.* Anti-ganglioside antibody-induced tumor cell death by loss of membrane integrity. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2033-41.
56. a) Fernández-Marrero Y, Hernández T, Roque-Navarro L, Talavera A, *et al.* Switching on cytotoxicity by a single mutation at the heavy chain variable region of an anti-ganglioside antibody. *Mol. Immunol.* 2011; 48: 1059-67. b) Fernández-Marrero Y, Roque-Navarro L, Hernández T, Dorvignit D, *et al.* A cytotoxic humanized anti-ganglioside antibody produced in a murine cell line defective of *N*-glycolylated-glycoconjugates. *Immunobiology* 2011; 216: 1239-47.
57. Rojas G, Pupo A, Gómez S, Krengel U, Moreno E. Engineering the Binding Site of an Antibody against *N*-Glycolyl GM3: From Functional Mapping to Novel



- Anti-ganglioside Specificities. ACS Chem Biol 2013; 8: 376-86.
58. Agostino M, Yuriev E, Ramsland PA. Antibody Recognition of Cancer-Related Gangliosides and Their Mimics Investigated Using in silico Site Mapping. PLoS ONE 2012; 7: e35457.
  59. Krenzel U, Olsson L-L, Martínez C, Talavera A, *et al.* Structure and Molecular Interactions of a Unique Antitumor Antibody Specific for N-Glycolyl GM3. J Biol Chem 2004; 279: 5597-5603.
  60. Avendaño C, Menéndez JC. Biological Therapy of Cancer. In: Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. Amsterdam (Netherlands), Elsevier 2015: pp . 577-79.
  61. Taylor RE, Padler-Karavani V, Diaz S, Varki A. Implications of the presence of *N*-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. Nat Biotechnol 2010; 28: 863-67.
  62. Martín MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. Nature Med 2005; 11: 228-32.