UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

RELACION DE LA EXPRESION DE CITOCINAS, PROTEINAS DE ACTIVACION Y MARCADORES TUMORALES PRONOSTICOS EN CANCER DE MAMA

POR:
LETICIA LLANES FERNANDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

JUNIO 2006

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

RELACION DE LA EXPRESION DE CITOCINAS, PROTEINAS DE ACTIVACION Y MARCADORES TUMORALES PRONOSTICOS EN CANCER DE MAMA

POR:
LETICIA LLANES FERNANDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

JUNIO 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS, PROTEÍNAS DE ACTIVACIÓN Y MARCADORES TUMORALES PRONÓSTICOS EN CÁNCER DE MAMA

Por

LETICIA LLANES FERNÁNDEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

J u n i o, 2006

RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS, PROTEÍNAS DE ACTIVACIÓN Y MARCADORES TUMORALES PRONÓSTICOS EN CÁNCER DE MAMA

Comité de Tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Director de la tesis

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Secretario

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

Dr. Moises Armides Franco Molina
Vocal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Ciencia Biológicas y al Laboratorio de Inmunología y Virología por haberme apoyado para realizar el Doctorado en Ciencias en esta gran institución.

Agradezco al Ministerio de Salud Pública de Cuba y al Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología por haberme aceptado para desarrollar mis estudios de postgrado en la Facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Ante todo le agradezco a Jorge Eduardo, mi hijo, por ser la luz de mi vida, le doy las gracias por ser como es y hacer que viva orgullosa de él.

Agradezco especialmete a mis padres por su amor y apoyo incondicional, en mi vida personal y profesional. Agradezco que con su ejemplo hayan hecho que pueda llegar hasta aquí. Les estaré eternamente agradecida por querer tanto a mi hijo y cuidar de él con ese grado de responsabilidad tan grande conque solo ellos saben enfrentar cada cosa que hacen.

Le agradezco a mi abuelita Nena por habernos querido y cuidado tanto, por haber sido tan importante para nosotros.

A mi hermana, por querernos tanto y estar siempre presente.

A la Dra Cristina Rodriguez, mi más profundo agradecimiento, porque no solo me abrió las puertas del laboratoio, sino que me dio la confianza y el apoyo necesarios para la realización de este trabajo. Muchas gracias por haber confiado en mi.

Al Dr. Alcocer le agradezco su paciencia y su apoyo durante la realización de este trabajo, su ayuda científica fue muy importante durante todo el postgrado.

A los compañeros y maestros del laboratorio de Inmunología y Virología, que no voy a mencionar para no cometer olvidos involuntarios agradezco que de una forma u otra hayan hecho posible la realización de este trabajo.

También agradezco a los compañeros del departamento de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas.

A los compañeros del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología de Cuba agradezco la confianza que depositaron en mi para la realización de este proyecto.

A Martica, mil gracias por su valiosa ayuda en la realización de los análisis estadísticos; su paciencia y comprensión fueron muy importantes para mí.

A Irene, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio en el INOR, le agradezco su vital participación en la realización de uno de los objetivos de este trabajo. Doy las gracias también a Maiby y Xiomara que me ayudaron en el trabajo de inmunohistoquímica.

A la Dra. Sonia le agradezco su ayuda incondicional en todo el trabajo de patología, su apoyo ha sido muy importante para mi formación.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico de corazón

A mi Hijo
A mis Padres
A mi Hermana
A mi Abuelita Nena

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUCCIÓN	1
2 HIPÓTESIS	4
3 OBJETIVOS	5
3.1 Objetivo General	5
3.2 Objetivos Particulares	5
4 ANTECEDENTES	7
4.1 Epidemiología del cáncer de mama	7
4.1.1 Factores de riesgo para el cáncer de mama	11
4.1.2 Métodos de detección de cáncer de mama	13
4.2 El cáncer de mama	14
4.2.1 Tipos de Cáncer de Mama	17
4.2.1.1 Carcinoma in situ	17
4.2.1.2 Carcinoma Infiltrante (o invasivo)	17
4.2.2 Clasificación por Etapas Clínicas del Cáncer de Mama	19
4.3 Factores Pronósticos Clásicos en Cáncer de Mama	22
4.3.1 Metástasis Ganglionares	22
4.3.2 Tamaño Tumoral	23
4.3.3 Tipo Tumoral	23
4.3.4 Grado Nuclear	24
4.3.5 Grado Tumoral	25
4.3.6 Receptores Hormonales	25
4.3.7 Infiltración de Luces Linfáticas y Capilares	25
4.3.8 Tasa de Proliferación	26
4.4 Marcadores Tumorales en Cáncer de Mama	26
4.5 Respuesta Inmune Antitumoral Humana	33
4.5.1 Mecanismo de Activación de Células T en la Respuesta Inmune Antitumoral	33
4.5.2 Estructura y Función de la Molécula CD3	37
4.5.3 Expresión de CD3-ε y CD3-ζ en Diferentes Tipos de Cánceres Humanos	39

4.5.4 Función Normal de P56[lck] y P59[fyn] y Alteraciones de su Expresión en Cáncer 41
4.5.5 Las Citocinas en la Respuesta Inmune Antitumoral 43
4.5.5.1 Subpoblaciones Th1/Th2 y su Función Reguladora 45
4.5.5.2 Función de IL-10 en la Respuesta Inmune 48
4.6 Inmunología del Cáncer de Mama 51
4.6.1 Infiltración de Linfocitos 51
4.6.2 Ganglios Linfáticos Regionales de Pacientes con Cáncer de Mama 52
4.6.3 Antigenicidad del Tumor de Mama 53
4.7 Alteraciones de la Respuesta Inmune en Cáncer de Mama 56
4.8 Evasión de la Respuesta Inmune en Cáncer de Mama 57
4.9 Apoptosis 59
4.9.1 Regulación de la Apoptosis 60
4.9.2 Función de p53 61
4.9.3 Familia de Proteínas BcL-2 64
4.9.4 Regulación de la Apoptosis en Cáncer de Mama 65
4.9.4.1 Función de p53 en la Regulación de la Apoptosis en Cáncer de Mama 67
4.9.4.2 Familia de proteínas Bcl-2 en la Regulación de la Apoptosis en Cáncer de Mama 68

5 MATERIALES Y MÉTODOS 71

5.1 Pacientes y Obtención de Muestras 71
5.2 Extracción de RNA 72
5.3 Extracción de Proteínas 73
5.4 Método Bradford 73
5.5 Inmunohistoquímica 74
5.5.1 Receptor de Estrógenos 75
5.5.2 Her2/Neu 75
5.5.3 p53, BcL-2, Bax, Ki67 e IL-10 77
5.6 Western Blot 77
5.7 RT-PCR 78
5.8 Análisis Estadístico 80

6 RESULTADOS 82

6.1 Expresión de Factores Pronósticos Clásicos en Cáncer de Mama 82
6.2 Expresión de Marcadores Tumorales Pronósticos de Cáncer de Mama 85
6.2.1 Asociaciones entre los Diferentes Marcadores Tumorales 98
6.2.2 Relación entre Marcadores Tumorales y Factores Pronósticos Clásicos 100
6.3 Expresión de IL-10 en Muestras de Tumor Determinada por Inmunohistoquímica 104

6.3.1 Relación entre la Expresión de IL-10 y los Marcadores Tumorales y Factores Pronósticos..... 108
6.4 Expresión de Proteínas de Activación de Linfocitos T..... 111
6.4.1 Expresión de CD3-ζ y CD3-ε en Tumores y Ganglios Linfáticos..... 111
6.4.1.1 Expresión de Diferentes Formas Moleculares de CD3-ζ..... 115
6.4.1.2 Expresión del Patrón de Tirosinas Fosforiladas..... 118
6.4.2 Expresión de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en Tumores y Ganglios Linfáticos..... 120
6.4.3 Asociación entre la Expresión de las PTKs y los Polipeptidos de CD3..... 124
6.4.4 Asociación de las Proteínas de Activación con los Marcadores Tumorales y Factores Pronósticos..... 126
6.4.4.1 Asociación de CD3-ζ y CD3-ε con los Marcadores Tumorales y Factores Pronósticos..... 126
6.4.4.2 Asociación de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ con los Marcadores Tumorales y Factores Pronósticos..... 132
6.5 Expresión de Citocinas en el Microambiente Tumoral y en Ganglios Linfáticos Regionales No Metastásicos..... 136
6.5.1 Relación de la expresión de RNAm de citocinas entre los microambientes de tumor y de ganglios..... 140
6.6 Asociación de las Proteínas de Activación con la Expresión de Citocinas en el Microabiente Tumoral y en los Ganglios Linfáticos Regionales..... 143
6.6.1 Asociación de CD3-ζ y CD3-ε y la Expresión de RNAm de IL-10..... 143
6.6.2 Asociación de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ y la Expresión del RNAm de IL-10..... 145
6.6.3 Asociación de Proteínas de Activación e lL-10, Determinada por Inmunohistoquímica, en las Muestras de Tumor..... 147
6.7 Estimación de la Supervivencia y el Intervalo Libre de Enfermedad. Determinación del Carácter Pronóstico de Factores Potenciales..... 148

7. DISCUSIÓN..... 155
8. CONCLUSIONES..... 168
APÉNDICES..... 171
MODELO DE RECOLECCIÓN DE DATOS..... 171
LITERATURA CITADA..... 172
RESUMEN BIOGRÁFICO..... 189

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Etapas clínicas del cáncer de mama	20
2.	Indicadores pronósticos clásicos en el cáncer de mama	22
3.	Moléculas accesorias y sus ligandos implicados en la respuesta efectora de las células T	36
4.	Datos clínicos individuales de las pacientes	84
5.	Expresión de los marcadores tumorales	87
6.	Expresión de IL-10, determinada por inmunohistoquímica, en las muestras de tumor	106
7.	Relación entre IL-10 y los marcadores tumorales	109
8.	Expresión de los polipéptidos de CD3-ε y CD3-ζ	112
9.	Expresión de diferentes formas moleculares de CD3-ζ en el tumor y en ganglios linfáticos regionales no metastásicos	116
10.	Expresión de PTKs $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$	121
11.	Relación de la expresión de $p59^{fyn}$ y $p56^{lck}$ con la presencia de los polipeptidos CD3-ζ y CD3-ε en tumores y en ganglios	125
12.	Asociación de CD3-ζ y los marcadores tumorales	128
13.	Asociación de CD3-ε y los marcadores tumorales	129
14.	Expresión de CD3-ζ y CD3-ε en tumores y ganglios linfáticos no metastásicos con relación a la expresión de receptores hormonales	130
15.	Expresión de CD3-ζ y CD3-ε en tumores y ganglios linfáticos no metastásicos con relación a la expresión de Ki67	131
16.	Asociación de $p56^{lck}$ con los marcadores tumorales	133
17.	Asociación de $p59^{fyn}$ con los marcadores tumorales	134
18.	Expresión de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en tumores y ganglios linfáticos no metastásicos con relación a la expresión de receptores hormonales	135
19.	Expresión de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en tumores y ganglios no metastásicos con relación a la expresión de Ki67	136

20. Expresión de citocinas en los microambientes del tumor y de ganglios linfáticos regionales no metastásicos 137

21. Frecuencia de expresión de citocinas en el microambiente tumoral y de ganglios linfáticos 139

22. Relación de la expresión de citocinas entre los microambientes de tumor y de ganglios 141

23. Relación de CD3-ζ y CD3-ε con la expresión del RNAm de IL-10 en las muestras de tumor 143

24. Asociación de la expresión de CD3-ζ y CD3-ε con el RNAm de IL-10 en los ganglios linfáticos regionales 144

25. Relación de las formas de 21kD y 42kD de CD3-ζ con la expresión del RNAm de IL-10 en los ganglios linfáticos 145

26. Relación de $p59^{fyn}$ y $p56^{lck}$ con la expresión del RNAm de IL-10 en los tumores y en los ganglios 146

27. Relación de CD3-ζ, CD3-ε, $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ con IL-10 en el tejido tumoral 147

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Incidencia mundial del cáncer de mama	8
2.	Incidencia y mortalidad por cáncer de mama	9
3.	Incidencia de cáncer de mama en América Central y el Caribe Hispano	10
4.	Mortalidad por cáncer de mama en América Central y el Caribe Hispano	10
5.	Estructura de la glándula mamaria y lesiones más frecuentes en sus diferentes estructuras	15
6.	Funciones del receptor de estrógenos	28
7.	Áreas de intervención terapéutica potencial en cáncer de mama mediadas por Her-2 y otros miembros de la familia de factores de crecimiento a la que pertenece	30
8.	Vías de transducción de señales activadas por el TCR	35
9.	Estructura del complejoTCR/CD3	37
10.	Respuesta inmune antitumoral	48
11.	Influencia del microambiente sobre la respuesta inmune celular.	59
12.	Respuesta de p53 frente al strees celular	61
13.	Vías que conducen a la apoptosis cuando se produce un daño no reparable	63
14.	Expresión de RE en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama	88
15.	Expresión de RPg en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama	89
16.	Expresión de Bcl-2 en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama	91
17.	Expresión de Bax en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama	92
18.	Expresión de p53 en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama	94
19.	Expresión de Her-2 en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama	95
20.	Expresión de Ki67 en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama	97
21.	Relación entre la expresión de marcadores tumorales y el estado de los receptores hormonales	101
22.	Relación entre la expresión de marcadores tumorales y el grado nuclear del tumor en pacientes con cáncer de mama	102

23. Asociación entre la expresión de marcadores tumorales y Ki67. 103

24. Expresión de IL-10 en el tejido tumoral en pacientes con cáncer de mama..... 107

25. Relación de la expresión de IL-10 con factores pronósticos del tumor..... 110

26. Expresión de las proteínas de activación linfocitaria CD3-ζ y CD3-ε en el microambiente tumoral y en ganglios linfáticos no metastásicos de pacientes con cáncer de mama..... 114

27. Expresión de diferentes formas moleculares de la cadena ζ en muestras de tumor y ganglios linfáticos no metastásicos de pacientes con cáncer de mama..... 117

28. Expresión del patrón de tirosinas fosforiladas en muestras de tumores y ganglios linfáticos no metastásicos de pacientes con cáncer de mama..... 119

29. Expresión de PTKs $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en tumor y en ganglios linfáticos regionales no metastasicos de pacientes con cáncer de mama..... 122

30. Expresión de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en tumor y en ganglios linfáticos regionales no metastásicos de pacientes con cáncer de mama..... 123

31. Asociación entre la expresión de CD3-ζ y receptores hormonales en tumores de pacientes con cáncer de mama..... 131

32. Asociación de la expresión de $p59^{tyn}$ y los receptores hormonales en tumores de pacientes con cáncer de mama..... 135

33. Amplificación de los RNAm de citocinas en el microambiente tumoral y de ganglios linfáticos regionales no metastásicos de pacientes con cáncer de mama..... 138

34. Supervivencia Global..... 149

35. ILE Global..... 150

36. ILE según la expresión de IL-10 en el tejido tumoral..... 151

37. ILE según la expresión de CD3-ε en los tejidos tumorales..... 151

38. ILE según la expresión de $p56^{lck}$ en el tejido tumoral..... 152

39. ILE según la expresión de $p59^{fyn}$ en el tejido tumoral..... 152

40. ILE según la expresión de p53 en los tejidos tumorales..... 153
41. ILE según la expresión de Ki67 en los tejidos tumorales..... 154
42. ILE según la expresión de RE en los tejidos tumorales..... 154
43. Activación de la producción de IL-10..... 159

MMLV-RT	Transcriptasa Reversa
MMTV	Virus del Tumor Mamario del Ratón
MNP	Mononucleares Periféricas (Células)
MUC-1	Mucina
NFAT	Factor Nuclear de Células T Activadas
NK	Células Asesinas Naturales
PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PHA	Fitohemaglutinina
PIP_2	Fosfatidil Inositol 4,5 bifosfato
PTKs	Proteínas Tirosinas Kinasas
Rb	Retinoblastoma
RE	Receptor de Estrógenos
RPg	Receptor de Progesterona
RNAm	RNA mensajero
SH2	Dominio src-homología 2
SSTF	Solución Salina Tamponada con Fosfatos
STAT3	Transductor de la Señal y Activador de la Transcripción 3
TA	Temperatura Ambiente
TAA	Antígeno Tumor Asociado
TAL	Linfocitos Asociados a Tumor
Tc	T citotóxicos (linfocitos)
TCR	Receptor de Células T
TGF-β	Factor de Necrosis Tumoral-β
Th	T cooperadores (linfocitos)
Th1	Respuesta T Cooperadora 1
Th2	Respuesta TCooperadora 2
TIL	Linfocitos Infiltrantes de Tumor
TMN	Clasificación en Estadios Clínicos en Cáncer de Mama
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer
UTDL	Unidad Terminal Ductulo-Lobular

RESUMEN

Los pacientes con cáncer pueden expresar respuestas inmunes celulares anormales que afectan su competencia inmunológica. Los parámetros inmunológicos puede ser un indicador de la función de las células T en pacientes con cáncer. Los marcadores tumorales se expresan o sobre-expresan debido a alteraciones moleculares de las células tumorales. Podemos relacionar los marcadores tumorales con elementos del sistema inmune para encontrar nuevas asociaciones que mejoren el pronóstico. Estudiamos la expresión de factores pronósticos y marcadores tumorales en pacientes con cancer de mama en estadios iniciales de la enfermedad. Determinamos la expresión inmunohistoquímica local de IL-10 y estudiamos la asociación de los diferentes marcadores tumorales y de pronóstico con factores supresores presentes en el tumor. Determinamos la expresión de citocinas y de proteínas de activación de células T en el microambiente del tumor y lo comparamos con su expresión en los ganglios linfáticos axilares no metastásicos de pacientes con cáncer de mama. La expresión de citocinas y proteínas de activación se determinó por RT-PCR y Western Blot respectivamente; en 30 pacientes femeninas. La expresión de IL-10 y los marcadores tumorales: RE, RPg, Her-2, Ki67, p53, Bcl-2 y Bax se determinó por inmunohistoquímica, en un total de 27 pacientes femeninas. La expresión inmunohistoquímica de IL-10 resultó en el 85% (23/27) de las pacientes. Encontramos una relación directa entre IL-10 y los marcadores Bcl-2 y Bax, con Bax, la asociación resultó estadisticamente significativa (p=0.001). La relación de IL-10 con p53 resultó ser inversa. CD3-ζ se expresó en 27/30 pacientes en los ganglios linfáticos regionales no metastásicos, mientras que 10/30 dejaron de expresarla en el tumor. CD3-ε se observó en 25/30 pacientes en los ganglios linfáticos y solamente 14/30 la expresaron en los tumores. Las tirosinas quinasas $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ se expresaron en 15/30 y 12/28 tumores, respectivamente; mientras 29/30 pacientes expresaron $p56^{lck}$ y 18/28 $p59^{fyn}$, en sus ganglios linfáticos. Las muestras de tumor y ganglios mostraron un patrón de fosforilación en tirosina. El RNAm de IL-10 se expresó en 16/30 muestras de tumor, solo 6/30 lo expresaron en los ganglios linfáticos; IL-2 se observó en 10/30 tumores y 8/30 pacientes la expresaron en sus ganglios; IFN-γ no se detectó en los tumores, mientras que 4/30 pacientes lo expresaron en sus ganglios regionales. Las diferencias de expresión de las variables entre ambos microambientes resultaron significativas en la mayoría de los casos. La presencia de IL-10 en los tumores puede reflejar un papel inhibitorio en la función de las células T y por tanto supresor de la respuesta inmune y su relación con los marcadores de apoptosis puede sugerir un incremento en la agresividad del tumor, aún en pacientes en estadios iniciales de la enfermedad. La pérdida de expresión de las proteínas de activación pudiera estar relacionada con una disminución de la activación de células T en el microambiente del tumor. El estudio de estos parámetros inmunológicos resulta importante para entender la respuesta inmune local, que sería vital en el control de la progresión del tumor, además, conociendo las alteraciones que se producen en esta respuesta se pudieran desarrollar estrategias inmunoterapeúticas dirigidas.

ABSTRACT

Breast cancer patients express abnormal cellular immune responses affecting their immunological competence. The analysis of immunological parameters may be useful as indicators of T-cell function. The tumor markers are expressed due to molecular alterations of the tumor cells, we can relate them to the immune system to find new associations to improve prognosis. To determine the IL-10 expression in tumor microenvironment and to associate it to certain tumor markers; twenty-seven breast cancer patients were monitored by immunohistochemistry. The results show that 23 breast cancer samples exhibit a strong expression of IL-10. The IL-10 expression is associated to certain tumor markers of a poor prognosis. A direct association between IL-10, Bcl-2 and Bax was detected. The relationship between IL-10 and Bax was statistically significant ($p=0.001$). An inverse association of IL-10 with p53 was observed. To determine the expression of lymphocyte activation proteins and cytokines in tumor and non-metastatic axillary lymph nodes, 30 breast cancer patients were monitored. CD3 polypeptides, PTKs and phosphorylated tyrosines were studied by Western Blot. Ten of thirty patients did not express CD3-ζ at the tumor site, while 27/30 expressed it in lymph nodes. The CD3-ε was observed in tumors of 16/30 patients and 25/30 expressed it in nodes. $p56^{lck}$ was observed in 15/30 tumor samples, while 29/30 patients expressed it in lymph nodes. The expression of $p59^{fyn}$ was observed in 12/28 patients at the tumor site and 18/28 expressed it in their axillary lymph nodes. Cytokines mRNA expression was determined by RT-PCR. IL-10 was expressed in the tumor samples of 16/30 patients and 6/30 expressed it in lymph nodes. IL-2 was observed in 10/30 patients in tumors and 8/30 expressed it in their lymph nodes. IFN-γ was not detected in tumors but 4/30 patients expressed it in nodes. The differences in expression of variables between both microenvironments were significant in most of the cases. Samples showed a tyrosine phosphorylation pattern. IL-10 reflects a suppressive tumor microenvironment; its relationship with the apoptosis markers can suggest an increase in the aggressiveness of the tumor even if it still is in an early stage. The highest IL-10 mRNA expression and the lack of expression of lymphocyte activations proteins suggest a downregulation on T cells function in the tumors. These results are useful in order to understand the local immune response that would be a key in the control of the tumor progression.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama representa un problema importante de salud a nivel mundial es la segunda causa de cáncer más frecuente en el mundo y la quinta causa de mortalidad, teniendo en cuenta los dos sexos. Es la localización de cáncer más prevalente; existen en el mundo alrededor de 4.4 millones de mujeres vivas, diagnosticadas de cáncer de mama en los últimos 5 años (Parkin and Fernández, 2006).

Se ha producido un notable progreso en el conocimento de los mecanismos biológicos y moleculares del cáncer de mama, en los últimos años. Los mecanismos inmunológicos resultan de extraordinaria importancia en el diseño de nuevas estrategias para el diagnóstico, evaluación pronóstica y terapeútica, en esta neoplasia.

El crecimiento progresivo del tumor se asocia con una inmunosupresión local y/o sistémica. Entre los posibles mecanismos que contribuyen a la disminución de la respuesta inmune se encuentra la producción de factores supresores en el microambiente tumoral y la presencia de células T supresoras, específicas de tumor, entre otros. No obstante, los mecanismos que median la inmunosupresión en los pacientes con cáncer no son completamente conocidos (Strong, 1999).

En diferentes neoplasias se han descrito alteraciones en el receptor de células T (TCR) y en la vía de transducción de señales en estas células, relacionado con la disminución o ausencia de las cadenas de CD3 (ζ y ε) y alteración en la expresión y

funciones de varias tirosinas quinasas de la vía. Estas alteraciones en los pacientes con cáncer conducen a disfunción inmune antitumoral (Reichert *et al.*, 2002).

Varios autores han reportado la presencia de IL-10 en el sitio del tumor en una variedad de cánceres humanos (Alas *et al.*, 2001; Urosevic and Dummer, 2003). IL-10 es una citocina supresora de la función inmune celular, por lo tanto pudiera permitir el crecimiento progresivo del tumor previniendo la generación de una respuesta inmune celular específica contra el tumor.

Entre los distintos marcadores tumorales pronósticos en cáncer de mama, se encuentran oncogenes (Her-2) y genes supresores (p53) de tumor, entre otras moléculas; cuyas alteraciones se asocian con neoplasias más agresivas (Esteva and Hortobagyi, 2004; Yamashita *et al.*, 2004). Caracterizar el tumor de mama de acuerdo a sus marcadores tumorales y compararlo con parámetros inmunológicos nos ayuda a caracterizar la relación del tumor con el sistema inmune del huésped a nivel local.

En este trabajo se estudió la expresión de marcadores tumorales y factores pronósticos que permitieron establecer las características del tumor de cada paciente. El estado del tumor se comparó con el comportamiento inmunológico local mediante el estudio de proteínas de activación linfocitarias y la expresión de la interleucina IL-10 por ser una citocina altamente supresora de la respuesta inmune. También se comparó el comportamiento de estos parámetros en los ganglios linfáticos regionales no metastásicos de cada paciente. Se continuó con el analisis del estado inmunológico de las pacientes mediante el estudio de la expresión de citocinas en el microambiente del tumor y en los ganglios linfáticos regionales no metastásicos. Finalmente, se determinó el carácter pronóstico potencial de los factores de tipo inmunológicos analizados.

El estudio de estos parámetros resulta importante para comprender el proceso de inmunosupresión local y definir blancos que puedan ser modificados en el microambiente del tumor con el objetivo de incrementar la efectividad de las terapias biológicas en pacientes con cáncer de mama. También resulta importante conocer nuevas asociaciones entre marcadores del tumor y alteraciones de la respuesta inmune con el objetivo de explicar la agresividad tumoral en pacientes con cáncer de mama.

2. HIPÓTESIS

Las alteraciones en la expresión de IL-10 y proteínas de activación linfocitaria están asociadas con marcadores tumorales e indicadores pronósticos y de agresividad tumoral en estadios iniciales del cáncer de mama.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Describir el comportamiento de parámetros inmunológicos que intervienen en la función de los linfocitos T y asociarlos con la expresión de marcadores tumorales y factores pronósticos del tumor en cáncer de mama.

3.2 Objetivos Particulares

1. Determinar la expresión de factores pronósticos en pacientes con cáncer de mama
2. Determinar la expresión de marcadores tumorales pronóstico en pacientes con cáncer de mama
3. Determinar la expresión inmunohistoquímica de IL-10 en tumores de pacientes con cáncer de mama
4. Determinar la expresión de proteínas relacionadas con la activación de las células T (CD3-ζ, CD3-ε, $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$) en el microambiente tumoral y en ganglios linfáticos regionales no metastásicos de pacientes con cáncer de mama, por Western Blot

5. Determinar la expresión de citocinas (IL-10, IL-2 e IFN-γ), por RT-PCR, en el microambiente tumoral y en ganglios linfáticos regionales de pacientes con cáncer de mama.

6. Describir posibles asociaciones de interés entre los factores inmunológicos, marcadores tumorales y factores pronósticos estudiados.

7. Estimar la supervivencia y el intervalo libre de enfermedad y determinar el carácter pronóstico de factores potenciales.

4. ANTECEDENTES

4.1 Epidemiología del cáncer de mama

Según los datos más recientes de incidencia y mortalidad disponibles, se estima que en el año 2002, se diagnosticaron aproximadamente 10.9 millones de casos nuevos de cáncer; fallecieron por esta enfermedad 6.7 millones de personas y se encontraban enfermas, viviendo con cáncer, alrededor de 24.6 millones (Parkin *et al*, 2005).

El cáncer de mama es la segunda causa de cáncer más frecuente, en el mundo, si unimos ambos sexos, es solo precedida por el cáncer del pulmón. Se estima que se hayan diagnosticado 1.15 millones de casos nuevos de cáncer de mama en el año 2002, el 23% de todos los nuevos casos de cáncer en las mujeres, a escala mundial. Es a su vez la quinta causa de mortalidad por cáncer en ambos sexos, lo que representa 411 000 mujeres fallecidas al año, el 14% de todas las muertes por cáncer en el mundo, en ese sexo (Parkin and Fernández, 2006).

Por otro lado, la combinación de su elevada incidencia y su relativo "buen pronóstico" hacen del cáncer de mama la localización de cáncer más prevalente en el mundo. El cáncer de mama y el resto de los cánceres ginecológicos representan más del 50% de los casos de cáncer prevalentes tanto en países desarrollados como en desarrollo (Pisani *et al.*, 2002). Según los estimados, existen en el mundo aproximadamente 4.4 millones de mujeres vivas, diagnosticadas de cáncer de mama en los últimos 5 años;

hecho importante si se compara con sólo 1,4 millones de sobrevivientes (hombres y mujeres), de cáncer del pulmón (Parkin and Fernández, 2006).

Más de la mitad de los casos de cáncer de mama, ocurren en países industrializados, sin embargo, podemos observar que algunos países de América Latina, se encuentran entre los grupos de riesgo más altos. En general, las tres subregiones de América Latina (Centroamérica, Sudamérica y el Caribe) se encuentran en una posición intermedia con respecto a la incidencia y mortalidad por cáncer de mama si las comparamos con la unión de países más desarrollados y los menos desarrollados. La distribución geográfica del cáncer de mama en el mundo y la comparación por subregiones, se pueden observar en las figuras 1 y 2 realizadas mediante el sistema GLOBOCAN (2002).

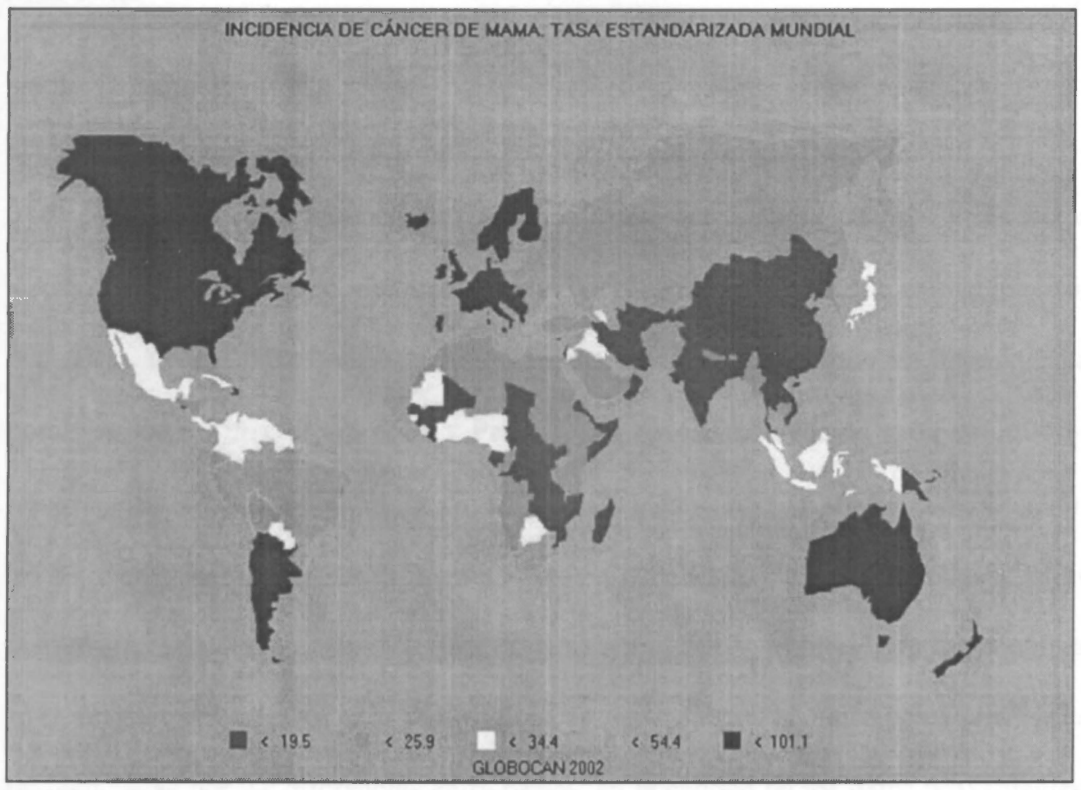

Figura 1: Incidencia mundial del cáncer de mama.

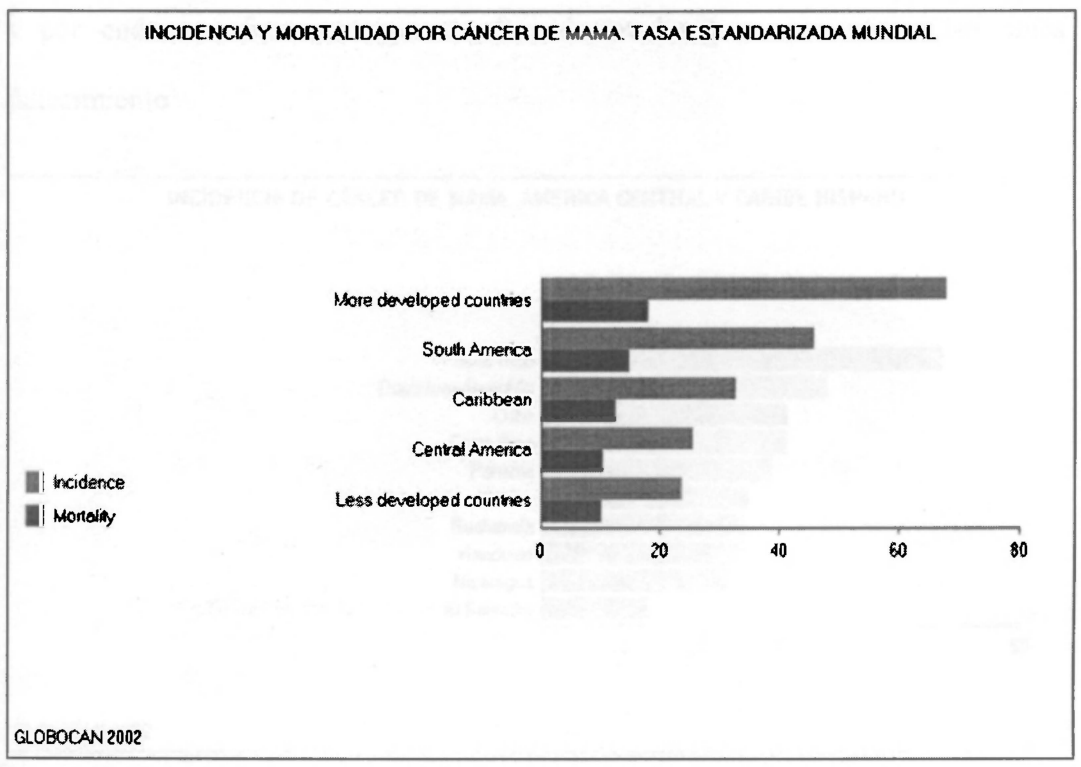

Figura 2: Incidencia y mortalidad por cáncer de mama.

Si comparamos la incidencia de cáncer de mama entre los países del Caribe Hispano y América Central (Fig. 3), observamos que Puerto Rico es el país que exhibe los riesgos más altos de enfermar por cáncer de mama, le continúa República Dominicana y posteriormente Cuba, Costa Rica y Panama, hay pocas diferencias entre este último y México, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Con relación a la mortalidad, (Fig. 4), el mayor riesgo lo tienen Cuba, Puerto Rico y Costa Rica. Por otro lado, le continúan Guatemala, Honduras, Panamá, República Dominicana y México con tasas similares entre ellos. Cabe resaltar que las diferencias en cuanto a la mortalidad pueden estar iinfluenciadas por las diferencias entre países, en la calidad de los datos provenientes de los certificados de defunción. En algunos países, a los fallecidos no se les consigna el cáncer como causa de muerte, por ser personas que no acudieron a los servicios de salud

y por ende, no fueron diagnosticadas ni tratadas por esa enfermedad antes del fallecimiento

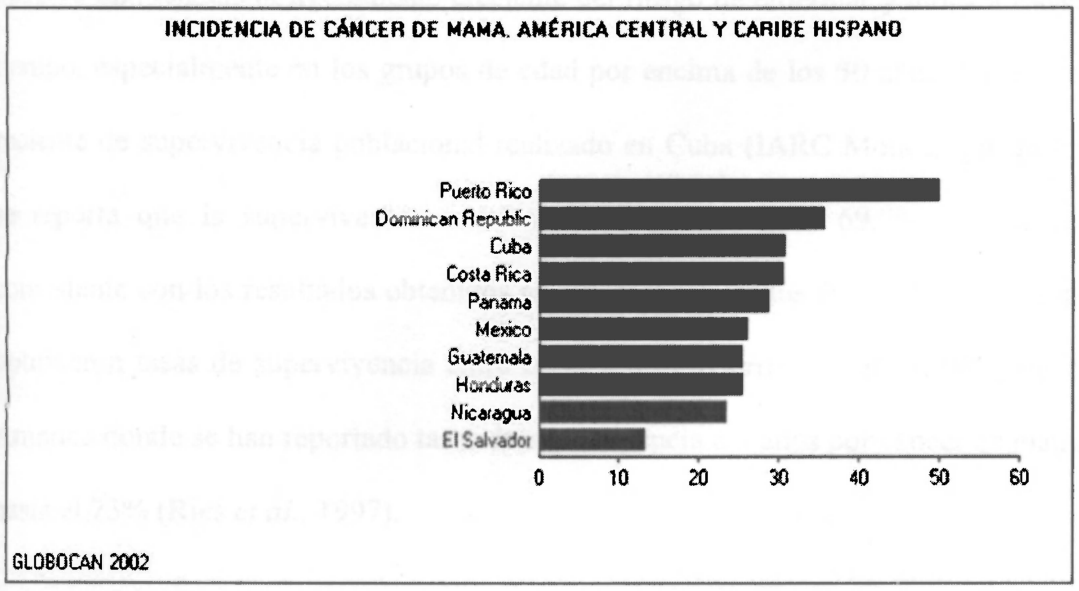

Figura 3: Incidencia de cáncer de mama en América Central y el Caribe Hispano

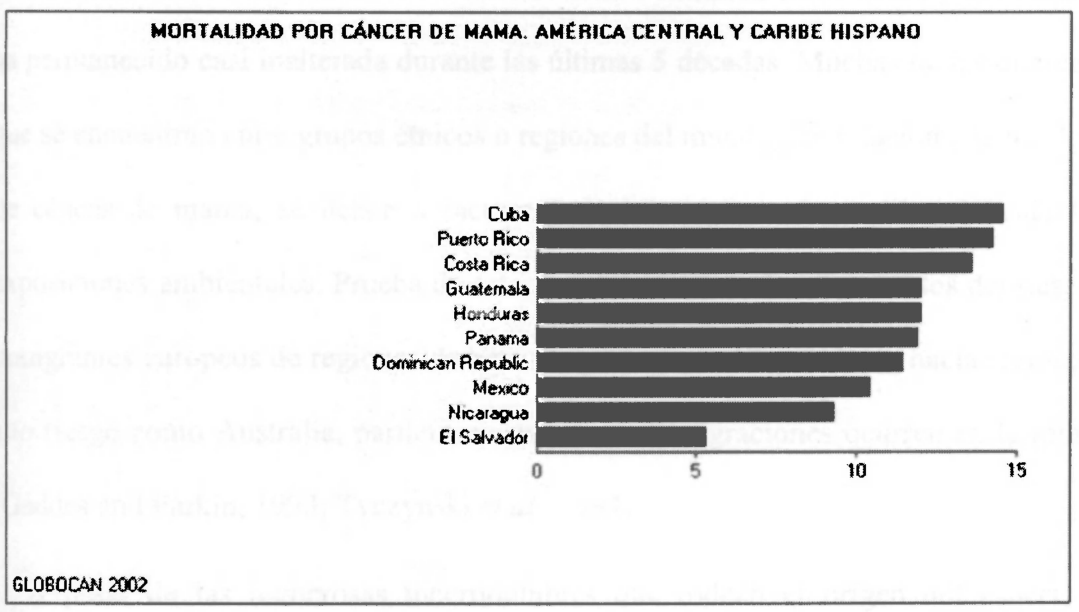

Figura 4: Mortalidad por cáncer de mama en América Central y el Caribe Hispano

En Cuba, el cáncer de mama es la localización de cáncer más frecuente (17,1% del total de casos nuevos), y la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres (15,4% del total de muertes por cáncer) (Anuario Estadístico MINSAP 2006, In Press). Se observa una tendencia ligeramente creciente del riesgo de enfermar y morir a través del tiempo, especialmente en los grupos de edad por encima de los 50 años. En un estudio reciente de supervivencia poblacional realizado en Cuba (IARC Monograph, In Press), se reporta que la supervivencia relativa a cinco años es de 69,7%, lo que resulta consistente con los resultados obtenidos en estudios realizados en Europa, en los que se obtuvieron tasas de supervivencia entre el 53 y 63% (Berrino *et al.,* 1995) y en Norte América donde se han reportado tasas de supervivencia a 5 años por cáncer de mama, de hasta el 73% (Ries *et al.,* 1997).

4.1.1 Factores de riesgo para el cáncer de mama

En el mundo, la incidencia del cáncer de mama continúa en aumento y la mortalidad ha permanecido casi inalterada durante las últimas 5 décadas. Muchas de las diferencias que se encuentran entre grupos étnicos o regiones del mundo con relación a la incidencia de cáncer de mama, se deben a factores relacionados con los estilos de vida y las exposiciones ambientales. Prueba de esto, son los estudios de incrementos del riesgo en inmigrantes europeos de regiones de bajo riesgo como Itaha y Polonia hacia regiones de alto riesgo como Australia, particularmente si estas migraciones ocurren en la infancia (Geddes and Parkin, 1993; Tyczynski *et al.,* 1994).

A pesar de las numerosas incertidumbres que rodean el orígen del cáncer, hay evidencias sustanciales que el riesgo de cáncer de mama se relaciona con factores de

tipo hormonal y reproductivo. Los factores de riesgo son aquellos elementos que pueden aumentar la probabilidad de que una persona desarrolle la enfermedad y en particular el cáncer de mama está asociado con niveles socioeconómicos altos, lo que prácticamente se explica por la distribución diferente de tales factores (la mayoría de tipo reproductivo), entre las diferentes clases sociales (Ghadirian, 1998). En el cáncer de mama el factor más importante es la edad ya que el riesgo de padecer esta enfermedad, aumenta sustancialmente después de los 50 años. Se menciona el incremento del riesgo con la menarquia temprana, la menopausia tardía, la edad tardía del primer parto y la baja paridad. Se mencionan otros factores como la historia familiar y los factores genéticos, así como otros factores relacionados con los estilos de vida como son, el hábito de fumar, el uso de contraceptivos orales, la ausencia de lactancia materna, la obesidad y la dieta (Parkin *et al.,* 2001, Parkin and Fernández, 2006).

El cáncer de mama se presenta como un problema de salud pública serio, y se espera que la identificación de factores genéticos y medioambientales que contribuyen al desarrollo de cáncer de mama reforzará los esfuerzos para la prevención (Martin *et al.,* 2000). Se han identificado dos genes para la susceptibilidad de este cáncer (BRCA1 y BRCA2), y se piensa que mutaciones de ellos pueden ser responsables hasta del 10% de todos los casos de cáncer de mama (Parkin and Fernández, 2006).

Las evidencias de estudios epidemiológicos que han analizado la lactancia materna como factor que puede disminuir el riesgo de cáncer de mama, han sido débiles (Lipworth *et al.,* 2000). Los resultados indican que no existe ninguna asociación o un efecto protector bastante débil entre la lactancia materna y el cáncer de mama. El fracaso para descubrir una asociación en algunas poblaciones occidentales puede ser debido al

predominio bajo de la lactancia materna prolongada. Al parecer el efecto protector a largo plazo es más fuerte entre, o confinado a, mujeres premenopáusicas.

Algunos autores han estudiado el papel de los niveles de prolactina en el riesgo del cáncer mamario y los resultados sugieren que los niveles de prolactina plasmática más altos se asocian a un riesgo aumentado de cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas (Hankinson *et al.,* 1999).

Con relación a la dieta, se han reportado resultados incoherentes. En una cohorte grande, de 88 691 mujeres seguidas a largo plazo se evaluó si la ingestión alta de productos lácteos, calcio, o vitamina D estaba asociada con el riesgo reducido de cáncer de mama; los resultados no arrojaron asociación estadísticamente significativamente con el riesgo de cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas. En mujeres premenopáusicas sin embargo, el consumo de producto lácteos, sobre todo de leche baja en grasa, se presentó inversamente asociado al riesgo de cáncer de mama (Shin and Michelle, 2002).

4.1.2 Métodos de detección de cáncer de mama

La mamografía, el examen clínico y el auto examen de las mamas, son los tres métodos de detección que han sido puestos a prueba en el pesquisaje activo de mujeres sanas, con el fin de detectar el cáncer de mama en etapas tempranas de la enfermedad. Hay reportes de éxitos en cuanto a reducción de la mortalidad por cáncer de mama, después de varios años de ejecución de algunos programas en países desarrollados de Europa y Canadá, fundamentalmente. No obstante el gran número de estudios epidemiológicos realizados, existen aún muchas incertidumbres y divergencias de criterios en cuanto a la edad óptima de iniciar estos programas, la efectividad de cada

uno de estos métodos y los intervalos entre las pruebas. Esto hace que la generalización de estos métodos, como medida de salud pública, sobre todo en países con limitaciones económicas, es una tarea difícil aún (Dickersin *et al.,* 1999, Miller *et al.,* 2000, Baines, 2000).

4.2 El cáncer de mama

La mama es una glándula sudorípara apocrina modificada. En la mujer, las mamas se desarrollan de las crestas bilaterales de leche que se extienden entre las extremidades superiores e inferiores; la mayoría de las crestas involucionan, quedando sólo las mamas definitivas (Rosai, 1989).

La unidad morfofuncional de la mama es una simple glándula compuesta por dos partes principales: la unidad terminal dúctulo-lobular (UTDL) formada por el lóbulo y los conductos terminales, que representa la porción secretoria de la glándula y el sistema ductal grande. La UTDL drena a través del conducto subsegmentario al segmentario, el cual se continúa con el conducto lactífero, antes de la apertura en el pezón se forma una dilatación, denominada seno lactífero, que constituye un reservorio para leche (Fig. 5) (Lester and Cotrain, 2000). El sistema epitelial ductal-lobular de la mama está formado por una doble capa de epitelio compuesta por células epiteliales rodeadas por células mioepiteliales (Woodward *et al.*, 2005). La mama madura es una glándula tubulo-alveolar compleja compuesta por 15 a 25 lóbulos dispuestos en forma radial, el lóbulo está dividido en lobulillos contenidos dentro de un estroma de tejido conectivo laxo, muy bien delimitado del tejido fibro-adiposo que conforma el volumen de la mama.

Como sistema de contención, actúa el músculo pectoral que se encuentra entre las costillas y la mama. La piel recubre y protege toda la estructura mamaria.

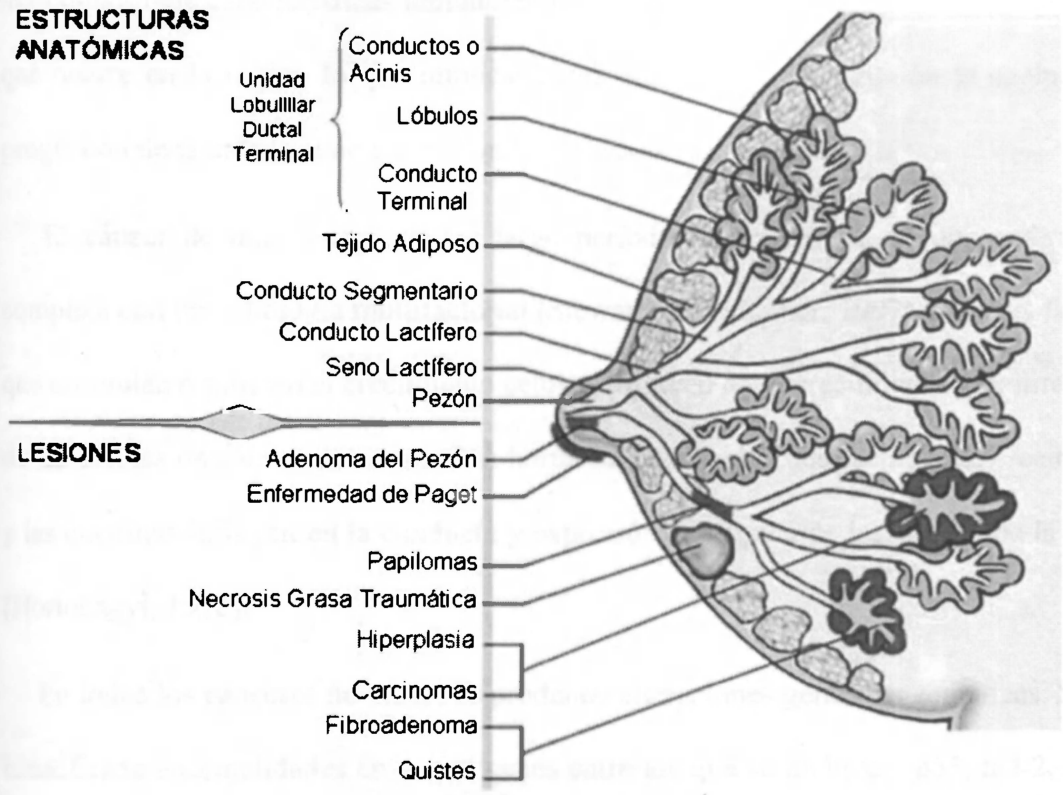

Figura 5: Estructura de la glándula mamaria y lesiones más frecuentes en sus diferentes estructuras. *Adaptado de Lester and Cotrain, 2000.*

El cáncer de mama consiste en un crecimiento anormal y desordenado de las células del tejido mamario. Dentro de los tumores malignos de mama, existen varios tipos en función del lugar de la mama donde se produzca el crecimiento anormal de las células y se pueden clasificar según su crecimiento. Los tumores pueden ser localizados o extenderse, a través de los vasos sanguíneos o linfáticos y dar lugar a metástasis. De

todos los casos de cáncer de mama, sólo el 7% de ellos presentan metástasis de inicio (Harris *et al.*, 1993).

El cáncer de mama también afecta a los hombres pero el porcentaje es mucho menor, el 1% comparado con la población femenina que lo padece. El cáncer de mama masculino tiene características inmunofenotípicas que lo diferencia del cáncer de mama que ocurre en la mujer, lo que implicaría una patogénesis diferente en la evolución y progresión de la enfermedad en los hombres (Muir *et al.*, 2003).

El cáncer de mama presenta un largo período de desarrollo, es una enfermedad compleja con una etiología multifactorial (Stewart and Heppner, 1997). Muchos factores que estimulan o inhiben el crecimiento celular, influyen en el crecimiento y proliferación de las células de cáncer de mama. Las hormonas esteroides, los factores de crecimiento y las citocinas influyen en la conducta y expresión fenotípica de las células de la mama (Hortobagyi, 1998).

En todos los cánceres de mama se producen alteraciones genéticas somáticas. Se han identificado anormalidades en varios genes entre los que se incluyen: p53, bcl-2, c-myc y c-myb (Gómez-Navarro *et al.*, 1999) y en algunos cánceres se sobreexpresan genes o productos de genes como es el caso de: Her-2 y ciclina D (Almasri and Hamad, 2004). Sin embargo, el número y tipos de mutaciones necesarias para el desarrollo de cáncer de mama esporádico no se conoce (Hortobagyi, 1998).

Las mutaciones en línea germinal en los genes BRCA 1 y BRCA 2 se asocian con un riesgo de desarrollar cáncer de mama del 46-87% para BRCA 1 y 26-84% para BRCA2. No obstante, solo aproximadamente el 10% del total de los cánceres de mama son

causados por mutaciones en línea germinal en los genes de susceptibilidad (Rogozin´ska-Szczepka *et al.*, 2004).

4.2.1 Tipos de Cáncer de Mama

4.2.1.1 Carcinoma in situ

El carcinoma ductal in situ se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios. Se caracteriza por una proliferación de las células epiteliales malignas de los conductos mamarios que carecen de capacidad para atravesar la membrana basal y por lo tanto son incapaces de producir metastasis a distancia (Lester and Cotrain, 2000). La cifra de curación en las mujeres que presentan este tipo de tumor es elevada (Gasparinini *et al.*, 1993; Harris *et al.,* 1993; Hayes *et al.,* 1996). Este tipo de cáncer ha sido clasificado en subtipos diferentes de acuerdo a la arquitectura del tejido.

El carcinoma lobular in situ se origina en las glándulas mamarias (o lóbulos) y se caracteriza por una proliferación de las células epiteliales malignas de los lóbulos mamarios. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas. Este tipo de tumor es bilateral en un porciento elevado de los casos (50 y 70%) (Elston and Ellis, 1991; Harris *et al.,* 1993; Fitzgibbons *et al.*, 2000).

4.2.1.2 Carcinoma Infiltrante (o invasivo)

El carcinoma ductal infiltrante se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama y luego puede extenderse a otras partes del cuerpo. Es él más frecuente de los carcinomas de mama, se da en el 80% de los casos

de cáncer de mama invasivos (Abba *et al.*, 2004). Este tipo de tumor comúnmente metastiza a los ganglios linfáticos axilares (Gasparinini *et al.*, 1993; Harris *et al.,* 1993; Hayes *et al.,* 1996).

El carcinoma lobular infiltrante comienza en las glándulas mamarias pero se puede extender a otros tejidos de la mama y del cuerpo. Se caracteriza por la presencia de células tumorales pequeñas que infiltran el tejido mamario y adiposo (de la mama), las cuales habitualmente crecen alrededor de los lobulillos normales. Este tipo de tumor es frecuentemente multicéntrico y bilateral (Elston *et al.*, 1991; Harris *et al.,* 1993; Fitsgibbons *et al.*, 2000). Entre el 8% y el 14% de los tumores de mama son de este tipo (Arpino *et al.*, 2004).

El carcinoma medular se caracteriza por lesiones circunscritas con bajo grado de propiedades infiltrantes y un intenso infiltrado de linfocitos y células plasmáticas. Constituye entre el 5 y 7% de todos los carcinomas mamarios (Gaffey *et al.*, 1995; Haden, 1995).

El carcinoma tubular es un carcinoma bien diferenciado el cual se caracteriza por la formación de túbulos que carecen de capas de células mioepiteliales y las células tumorales están en contacto directo con el estroma. Estos tumores pueden ser multifocales y bilaterales y son de muy buen pronóstico (Harris *et al.,* 1993).

El carcinoma mucinoso es un tumor de crecimiento lento; es una variante poco frecuente de carcinoma ductal, el cual comprende cerca del 3% de todos los carcinomas de la mama. Suela afectar a mujeres de edad avanzada. Este tumor se caracteriza por una alta expresión de mucinas. En el estudio histológico se observan grandes lagos de

musinas dentro de los cuales se encuentran pequeños islotes de células neoplásicas aisladas (Gaffey *et al.*, 1995).

El carcinoma papilar infiltrante es poco frecuente, representa menos del 1% de los carcinomas infiltrantes. La arquitectura papilar se observa con mayor frecuencia en los carcinomas ductal in situ. La presentación clínica es semejante a la de los carcinomas ductales convencionales pero tiene un mejor pronóstico (Lester and Cotrain, 2000).

El carcinoma inflamatorio del seno es un cáncer poco común, tan sólo se presenta en un 1% del total de tumores de la mama. Es agresivo y de crecimiento rápido. Hace enrojecer la piel del seno y aumentar su temperatura. La apariencia de la piel se vuelve gruesa y ahuecada, como la de una naranja y pueden aparecer arrugas y protuberancias en ella. Estos síntomas son debidos al bloqueo que producen las células cancerosas sobre los vasos linfáticos (Harris *et al.,* 1993).

4.2.2 Clasificación por Etapas Clínicas del Cáncer de Mama

El estadio del cáncer de mama es esencial en la evaluación del tumor, determinación del tipo de tratamiento, estimación del pronóstico y permitir una comparación entre los diferentes programas de tratamiento (Harris *et al.* 1993; Woodward *et al.*, 2003).

El cáncer de mama se clasifica sobre la base de la extensión anatómica de la lesión en cuatro estadios; cada estadio identifica un grupo de tumores que tienen aproximadamente un pronóstico similar. El estadio del carcinoma es un importante factor pronóstico de la supervivencia y su valoración es crucial en el tratamiento de las pacientes (Tabla 1).

Tabla 1

Etapas clínicas del cáncer de mama

Etapas Clínicas	Características
Etapa I	El tumor es menor de 2cm y no hay metástasis.
Etapa II Se divide en estadio IIA y IIB	- El cáncer no mide más de 2 cm pero los ganglios linfáticos de la axila están afectados. - El cáncer mide entre 2 y 5 cm y puede haberse extendido o no. - El cáncer mide más de 5 cm pero los ganglios linfáticos axilares no están afectados.
Etapa III Se divide en estadio IIIA y IIIB	Etapa III A - El tumor mide menos de 5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares, y éstos están unidos entre sí o a otras estructuras. - El tumor mide más de 5 cm y los ganglios linfáticos axilares también están afectados. Etapa III B - El cáncer se ha extendido a otros tejidos cerca de la mama (piel, pared torácica, incluyendo costillas y músculos del tórax). - El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos dentro de la pared torácica cerca del esternón.
Etapa IV	El cáncer se ha diseminado a otras estructuras del cuerpo. Los órganos en los que suelen aparecer metástasis con mayor frecuencia son los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro. También puede ser que el tumor haya afectado localmente a la piel y a los ganglios linfáticos dentro del cuello, cercanos a la clavícula.

El sistema de estadiamiento del cáncer de mama basado en una evaluación meticulosa del tumor primario (T), los ganglios linfáticos regionales (N), y las metástasis a distancia (M) fue primeramente propuesta en 1958 por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) (UICC Committee on Clinical Stage Classification and Applied Statistics, 1958). Las diferentes combinaciones de las subcategorías de T, N, y M definen cuatro estadios que son designados como I, II, III, y IV en orden ascendente de gravedad, y es conocido como sistema TNM de clasificación para el estadiamiento de los casos, que ha sufrido diversas revisiones desde su implantación.

La letra **T**, seguida por un número que va del 0 al IV, indica el tamaño del tumor y la propagación a la piel o a la pared del tórax debajo de la mama. A un número más alto le corresponde un tumor más grande y/o una mayor propagación a los tejidos cercanos.

La letra **N**, seguida por un número que va del 0 al 3, indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos a la mama y, si es así, si estos ganglios están adheridos a otras estructuras.

La letra **M**, seguida por 0 ó 1, expresa si el cáncer se ha extendido a otros órganos distantes o a ganglios linfáticos no próximos a la mama.

Ambos sistemas de estadiamiento se relacionan entre sí.

Desde 1998 se inició oficialmente la revisión del sistema de estadiamiento TNM vigente. El Comité Americano de Unión Contra el Cáncer (AJCC, siglas en inglés) publicó recientemente los nuevos criterios para el estadiamiento en cáncer de mama, los cuales quedaron implementados en enero del 2003 (Singletary and Connolly, 2006).

4.3 Factores Pronósticos Clásicos en Cáncer de Mama

Las características del tumor de mama hacen que sea necesario disponer de marcadores pronósticos que establezcan un índice de agresividad tumoral y sean capaces de predecir la evolución clínica de la enfermedad. El tamaño tumoral, el tipo y grado histológicos y el estado de los ganglios linfáticos son algunos de los más importantes indicadores pronóstico del tumor de mama (King *et al.,* 2004; Almasry and Hamad, 2005). Algunos ejemplos de indicadores pronósticos clásicos en el cáncer de mama se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2

Indicadores pronósticos clásicos en el cáncer de mama

Factores Pronósticos	**Buen pronóstico**	**Mal pronóstico**
Tamaño	< 1 cm	> 5 cm
Extensión Local	Ausente	Presente
Grado Nuclear	Bajo	Alto
Receptores Hormonales de: Estrógeno (RE) Progesterona (RPg)	RE+, RPg+	RE-, RPg-
Ganglios Axilares	Tumor -	Tumor +

4.3.1 Metástasis Ganglionares

El número de ganglios axilares positivos es de extraordinaria importancia como factor pronóstico (Esteva and Hortobagyi, 1998). La supervivencia, recidiva, velocidad de la recidiva y fracaso del tratamiento, se correlacionan con el número de ganglios

axilares positivos; en este sentido se ha observado una relación inversa entre la supervivencia global y el número de metástasis (Carter *et al.*, 1989). El tamaño de las metástasis y la presencia de infiltración en la capsula del ganglios son también indicadores de mal pronóstico. La presencia de micrometástasis en los glanglios axilares está asociada con una disminución de la supervivenvcia libre de enfermedad y con el riesgo de metástasis a distancia en comparación con las pacientes sin metástasis ganglionares axilares (Clare *et al.*, 1997).

4.3.2 Tamaño Tumoral

El tamaño macroscópico (diámetro máxímo) de las neoplasias primarias infiltrantes se considera uno de los factores pronósticos más importantes; junto con la afectación ganglionar constituyen dos de los tres criterios utilizados para el estadiamiento. Las pacientes en las que el tumor es de 2 cm o menos de diámetro máximo tienen un pronóstico y una supervivencia significativamente mejor comparada con las pacientes de tumores más grandes. Hay una relación directa entre tamaño tumoral y la probabilidad de metástasis ganglionares axilares; los tumores pequeños están asociados con una disminución de la probabilidad de metastásis en los ganglios linfáticos axilares (Singletary and Connolly, 2006).

4.3.3 Tipo Tumoral

Los carcinomas de mama pueden ser divididos en carcinomas de pronóstico favorable o desfavorable. Ciertos tipos de carcinoma de mama: medular, tubular, mucinoso (coloide), lobulillar y papilar, pueden estar asociados con una baja frecuencia

o incluso ausencia de metástasis ganglionares axilares y con un relativo buen pronóstico. La supervivencia de mujeres que padecen estos tipos de carcinomas infiltrantes es superior a la de pacientes con carcinoma ductal infiltrante convencional (Simpson and Page, 1992). Los carcinomas pobremente diferenciados, como el carcinoma inflamatorio y los carcinosarcomas son generalmente considerados como neoplasias agresivas.

4.3.4 Grado Nuclear

Varios sistemas de gradación habían sido propuestos desde 1925. Black et al. propusieron en 1955 un sistema que ponía énfasis en el grado nuclear; este sistema era un buen indicador de pronóstico y mostró una alta correlación con la supervivencia (Black *et al.*, 1955). Fisher et al. modificaron el método de gradación nuclear de Black (Fisher *et al.*, 1975), el cual es ampliamente utilizado actualmente y en combinación con el sistema de gradación tumoral de Bloom and Richardson enfatizan en la importancia del grado nuclear.

Los criterios que usa el sistema de Fisher para establecer el grado nuclear están relacionados con el tamaño y uniformidad nuclear, patrón de la cromatina, presencia de nucleolo y mitosis. Basado en la evaluación subjetiva de estas caracteristicas, los tumores se clasifican como grado I (bien diferenciado), grado II (moderadamente diferenciado) y grado III (poco diferenciado) (Cajulis *et al.*, 1994).

4.3.5 Grado Tumoral

El grado tumoral es otro indicador pronóstico importante, ya entre las décadas de 1920 y 1930, se había demostrado una clara asociación entre el grado tumoral y la supervivencia (Patey and Scarff, 1928; Haagensen, 1933). El sistema de gradación ha sufrido varias modificaciones desde que Bloom en 1950 propuso un método. El sistema que se utiliza con mayor frecuencia es el sistema modificado de Bloom y Richardson (Bloom and Richardson, 1957) que combina el grado tumoral, la formación de túbulos y el índice mitótico.

4.3.6 Receptores Hormonales

La determinación de los receptores hormonales RE y RPg se considera uno de los parámetros más importantes para tomar decisiones terapéuticas y son considerados indicadores pronósticos independientes. Los RPg presentan implicaciones pronosticas similares a los RE en el carcinoma de mama y cuando se determinan conjuntamente proporcionan un mejor valor predictivo. Los carcinomas con niveles elevados de receptores hormonales muestran un pronóstico mejor que los que carecen de receptores (Clark, 1996; Almasry and Hamad, 2005).

4.3.7 Infiltración de Luces Linfáticas y Capilares

Las células tumorales se pueden observar en el interior de espacios vasculares alrededor del propio tumor, lo cual se relaciona con la presencia de metástasis

ganglionares y constituye un factor de mal pronóstico en las pacientes que carecen de metástasis en ganglios linfáticos (Nime *et al.*, 1997).

4.3.8 Tasa de Proliferación

Los tumores con una tasa de proliferación elevada presentan un mal pronóstico. La proliferación se puede cuantificar por diferentes métodos; las células en fase S pueden ser identificadas utilizando citometría de flujo y marcaje con Timidina. La citometría de flujo tambien puede suministrar el índice de DNA comparando el contenido de DNA de las células tumorales con el de las células normales (Gasparini *et al.*, 1993).

Por otra parte, la proliferación tumoral también puede ser estudiada mediante la detección inmunohistoquímica de proteínas celulares que son producidas durante el ciclo celular tales como ciclinas y Ki67 (Yamashita *et al.*, 2004).

4.4 Marcadores Tumorales en Cáncer de Mama

Debido a la alta incidencia del carcinoma de mama y a las limitaciones de los parámetros clásicos de pronóstico, ha sido importante establecer factores pronósticos adicionales que permitan separar a los pacientes en grupos de acuerdo al riesgo de recurrencia y al tipo de terapia, entre otros parámetros. Por lo tanto el empleo de los marcadores tumorales ha sido de gran utilidad para caracterizar los tumores de mama.

Los marcadores tumorales se expresan o sobre-expresan debido a las alteraciones de las células tumorales, sus principales aplicaciones consisten en el diagnóstico,

monitoreo, clasificación, estadiamiento, localización, pronóstico y seguimiento y pueden estar relacionados con elementos del sistema inmune.

En cáncer de mama se expresan una serie de marcadores que han reportado un importante valor pronóstico, el más ampliamente estudiado ha sido el Receptor de Estrógeno (RE) cuya positividad se relaciona con un mejor pronóstico y respuesta a la terapia estrogénica. Los cánceres de mama humanos pueden también expresar receptores de Andrógenos, Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de crecimiento similar a la Insulina y Somatostatina (Volpi *et al.* 2000). Algunos factores de crecimiento han sido utilizados como blancos terapéuticos. (Donegan, 1992; Hadden, 1995)

Los estrógenos afectan la función, crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria, median su función uniéndose a sus receptores: RE-α y RE-β. El RE-α fue el primero identificado y por lo tanto el más estudiado, más recientemente se ha demostrado también la presencia de RE-β en cáncer de mama pero su función permanece sin dilucidar. RE-α funciona como un factor de transcripción activado por ligando, interactúa uniéndose a elementos de respuesta a estrógenos en la región del promotor de genes específicos (Fig. 6A). Las señales extracelulares también pueden estimular la transcripción mediada por RE-α en ausencia de estrógenos (Gross and Douglas, 2002). También puede funcionar como una proteína coactivadora estabilizando la unión al DNA de otros factores de transcripción o reclutando coactivadores a estos complejos de transcripción (Fig. 6B). Resultados recientes sugieren que RE puede activar vías de señalización intracelulares fuera del núcleo, ya sea en el citoplasma o en la membranma plasmática formando complejos con varias moléculas involucradas en las vías de señalización (Fig. 6C) (Schiff and Osborne, 2005).

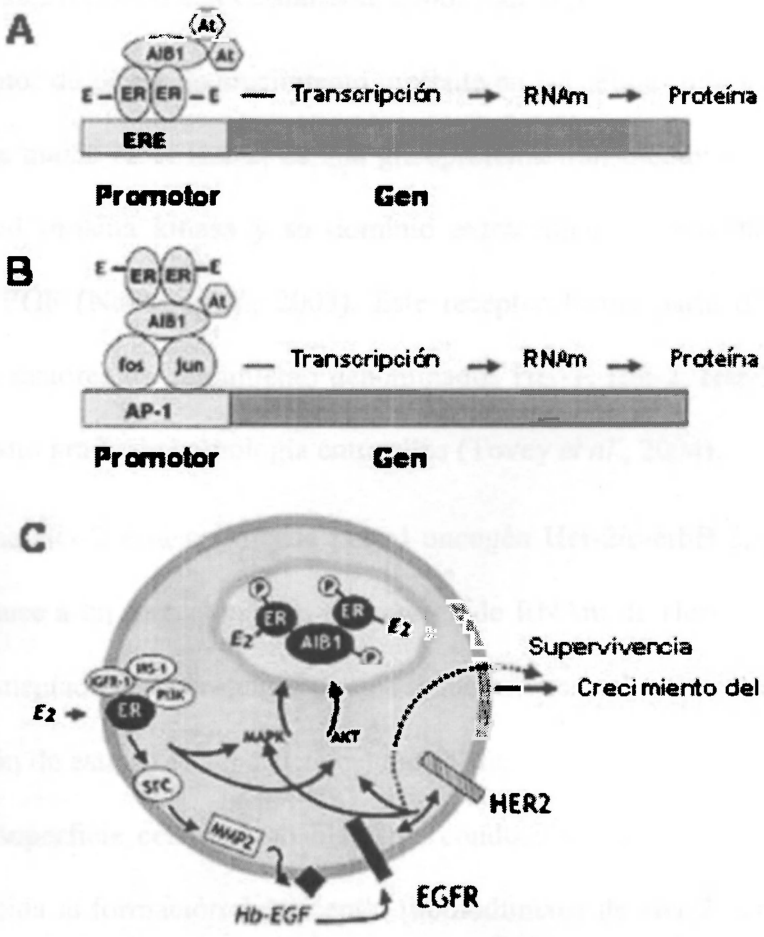

Figura 6: Funciones del receptor de estrógenos. *Adaptado de Schiff y Osborne, 2005.*
ER: receptor de estrógenos, siglas en inglés.

Los cánceres de mama se clasifican en RE-α positivo o negativo, los pacientes positivos a RE tienen una mayor supervivencia, la expresión de RE-α es muy utilizada como un factor predictivo de respuesta a la terapia endocrina. Un por ciento elevado de los pacientes con tumores positivos a RE-α (tumores que muestran un crecimiento dependiente de estrógenos) responden a la terapia con antiestrógenos, como el tamoxifen, el cual tiene una estructura semejante al estrógeno y por lo tanto interrumpe la función del receptor, porque la unión de este al RE-α, reprime la activación

transcripcional de genes blancos del receptor relacionados con el crecimiento de las células tumorales (Nilsson and Gustafsson, 2000; Van Dijk *et al.*, 2000).

Otro receptor de factor de crecimiento presente en las células tumorales de pacientes con cáncer de mama es el Her-2, es una glicoproteína transmembranal de 185 kD que tiene actividad tirosina kinasa y su dominio extracelular muestra homología con el receptor del EGF (Nahta *et al.*, 2003). Este receptor forma parte de una familia de receptores de factores de crecimiento denominados Her-1, Her-2, Her-3 y Her-4, todos muestran un alto grado de homología entre ellos (Tovey *et al.*, 2004).

La proteína Her-2 está codificada por el oncogén Her-2/c-erbB-2, la amplificación del gen conduce a un incremento en los niveles de RNAm de Her-2 y por tanto a una síntesis incrementada de la proteína con una secuencia normal y consecuentemente a una sobreexpresión de esta en la superficie celular (Nahta *et al.*, 2003). La sobreexpresión de Her-2 en la superficie celular probablemente conduce a una activación constitutiva, al verse favorecida la formación del receptor (homodímeros de Her-2) sin la necesidad de la unión del ligando, dando como resultado un crecimiento celular no regulado y favoreciendo la transformación oncogénica.

El oncogén Her-2/c-erbB-2 se encuentra amplificado y sobreexpresado en un rango de 20-30% de los carcinomas de mama (Almasri and Hamad , 2004). La sobreexpresión de Her-2 en cáncer de mama se ha asociado con un pronóstico desfavorable, con mayor agresividad del tumor y un acortamiento en el intervalo libre de enfermedad y en la supervivencia. El dominio extracelular de esta proteína puede ser liberado a la circulación y se ha detectado por ELISA en el 45% de los pacientes con cáncer de mama que presentan metastasis (Esteva *et al.*, 2005). La sobreexpresión de Her-2 también se ha

asociado con un fenotipo negativo a RE (Ellis, 2004). Varios estudios indican que los carcinomas de mama con expresión incrementada de Her-2 tienen una conducta clínica diferente. Los pacientes positivos a Her-2 muestran resistencia a la terapia hormonal. Varios estudios han reportado que los tumores sobreexpresando Her-2 fueron resistentes al tamoxifen independientemente de la expresión del RE y de otras variables de mejor pronostico (Livingston and Esteva, 2001). Esta proteína receptor también se ha utilizado, con éxito, como blanco para la terapia anticancer en pacientes con cáncer de mama (Fig. 7) (Nahta *et al.*, 2003).

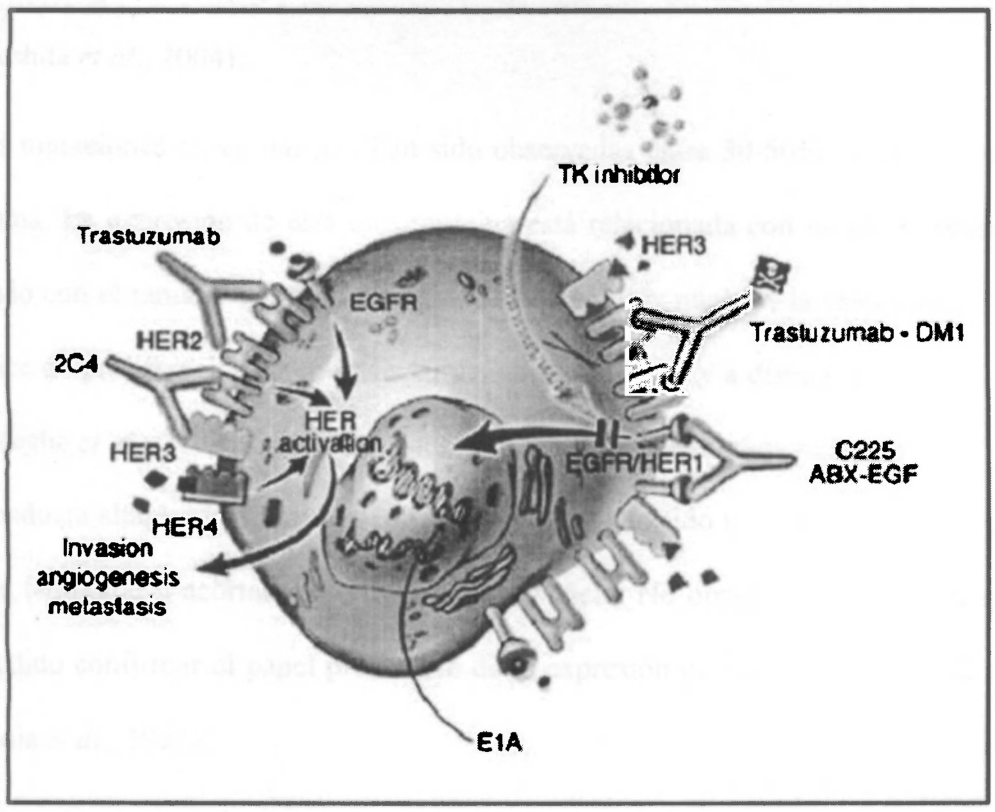

Figura 7: Áreas de intervención terapéutica potencial en cáncer de mama mediadas por Her-2 y otros miembros de la familia de factores de crecimiento a la que pertenece. *Adaptado de Nahta et al., 2003.*

Un importante marcador lo constituye la proteína p53, codificada por el gen supresor de tumor p53. Su sobreexpresión resulta de la mutación e inactivación del gen p53 y estabilización de la proteína resultante (Megha *et al.,* 2002). Este aumento en la estabilidad de la p53 mutada propicia su efectiva localización por técnicas inmunohistoquímicas. p53 está involucrada en la regulación de la proliferación celular, inducción de apoptosis y estabilidad cromosómica; la interrupción de estas funciones se asocia con la transformación neoplásica. Su sobreexpresión está relacionada con la progresión del cáncer de mama. Una alta frecuencia de expresión de p53 en tumores de mama invasivos y no invasivos y en enfermedad benigna de la mama sugieren que p53 juega un importante papel en la tumorigénesis de mama en estadios tempranos (Yamashita *et al.*, 2004).

Las mutaciones en el gen p53 han sido observadas entre 30-50% de los carcinomas de mama. La expresión de esta oncoproteína está relacionada con un pobre pronóstico asociado con el tamaño del tumor, el grado histológico y nuclear, la velocidad mitótica, el índice de proliferación, metástasis en ganglios linfáticos y a distancia y la pérdida de RE (Megha *et al.,* 2002). Se ha reportado que tumores con alteraciones en p53 presentan una conducta altamente agresiva y estas alteraciones han sido un marcador pronóstico de recaída temprana y acortamiento de la supervivencia. No obstante, hay autores que no han podido confirmar el papel pronóstico de la expresión de p53 en el cáncer de mama (Coppola *et al.*, 1999).

Como es conocido, la expresión del gen de Bcl-2 está asociado con la prevención de la muerte de la célula por apoptosis, prolongando la vida de células transformadas. Bcl-2 tiene una importante función en el desarrollo y progresión del cáncer mamario y parece

estar muy relacionada con la expresión de otros marcadores. Se ha reportado una correlación directa entre la expresión de Bcl-2 y la presencia de RE en el carcinoma de mama (Sjostrom *et al.*, 2002). Otros autores han reportado fuerte expresión de Bcl-2 en tumores negativos a p53 (Coppola *et al.*, 1999; Osin and Lakhani, 1999). También ha sido demostrado en líneas celulares humanas de carcinoma de mama que p53 disminuye la expresión de Bcl-2 (Coppola *et al.*, 1999).

La proteína Bcl-2 no se ha correlacionado con el tipo de tumor de mama. Lipponen (1995) había observado una correlación significativa entre la expresión de Bcl-2 y los ganglios linfáticos axilares (Lipponen *et al.,* 1995). Jiong (2000) observó que la alta inmunoreactividad de Bcl-2 correlacionó positivamente y de forma significativa con un alto grado del tumor, la presencia de metastasis en los ganglios linfáticos axilares, reducido intervalo libre de enfermedad y una reducida supervivencia. En contraste con estos resultados, observó una correlación inversa entre la expresión de Bax y el grado del tumor y los ganglios linfáticos involucrados, además de una correlación entre la baja o ausente inmunorreactividad a Bax con un mal pronóstico (Jiong *et al.,* 2000). Algunos autores han reportado una correlación positiva entre la expresión de Bcl-2 y Bax y se sugiere que el análisis simultáneo de ambos marcadores es más informativo que el de cada uno por separado (Yang *et al.*, 2000; Martínez-Arribas *et al.*, 2003). En cambio, en otros estudios se ha observado una correlación positiva entre la expresión de Bcl-2 y muchas características pronosticas favorables en cáncer de mama. Hellemans (1995) observó un mayor intervalo libre de enfermedad y una mayor supervivencia en pacientes con tumores positivos a Bcl-2; así como una mejor respuesta a la terapia hormonal (Hellemans *et al.*, 1995).

Existen también otros oncogenes como el c-myc y el Int-2 que se expresan en cáncer de mama y se asocian con el grado de malignidad. (Disis *et al.*, 1994).

Ki67 es un antígeno nuclear humano de naturaleza proteíca no histónica presente en todas las células con actividad proliferativa. Este antígeno es útil como marcador de proliferación y presenta un valor pronóstico comprobado (Yamashita *et al.*, 2004). Una positividad igual o superior al 20% se considera indicativa de alta actividad proliferativa y mal pronóstico. Se ha establecido una relación inversamente proporcional de este marcador con la presencia de receptores hormonales y directamente proporcional con el tamaño tumoral, ganglios afectados, con el índice de DNA y la sobreexpresión de Her-2 y p53 (Amirghofran *et al.*, 2004, Yamashita *et al.*, 2004).

4.5 Respuesta Inmune Antitumoral Humana

4.5.1 Mecanismo de Activación de Células T en la Respuesta Inmune Antitumoral

La respuesta del sistema inmune contra el cáncer se evidencia por la activación sistémica, local e intratumoral de linfocitos (Wong *et al.*, 1998). Sin embargo, los linfocitos asociados al tumor pueden estar suprimidos por factores derivados del propio tumor del paciente y por la interacción del tumor con el sistema inmune del huésped (Hadden, 1995).

El inicio de la respuesta inmune requiere de la activación de las células T. El reconocimiento por el complejo TCR/CD3 del péptido antigénico procesado y presentado adecuadamente en el contexto de las moléculas MHC desencadenan una secuencia de eventos bioquímicos que comprende la fosforilación y desfosforilación de

varias proteínas (Osorio *et al.*, 1995). La cascada de eventos bioquímicos que se desencadenan en el interior del linfocito, conduce finalmente a la activación de factores de transcripción en el núcleo, causando la expresión de nuevos genes, incluyendo los genes de IL-2 y otras citocinas, lo que conduce a la proliferación linfocitaria y a la posterior diferenciación en linfocitos efectores (Janeway and Travers, 1996; Hermiston *et al.*, 2002). La transducción de señales en las células T se puede producir por diferentes vías, dos de ellas se inician por la activación de la fosfolipasa C (PLC)-γ, que hidroliza al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) para generar diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato (IP_3); segundos mensajeros en las vías de activación de la proteína quinasa C (PKC), Ras (vía DAG) y la movilización de calcio de fuentes intracelulares (vía IP_3). Estos mensajeros intervienen en la activación de otra tirosina quinasa denominada Itk. La ZAP-70 interviene al inicio de estas vías fosfolilando un grupo de sustratos intracelulares asociados a la señalización a través del TCR. Estas vías estimulan la activación de los factores de transcripción: NFκB, el factor nuclear de células T activadas (NFAT) y el factor de trancripción AP-1, los cuales se han encontrado asociados a la activación a través del TCR (Fig. 8) (Huang and Wange, 2004).

La señal liberada por la interacción del TCR con el antígeno tumor asociado, no es suficiente para que se produzca la proliferación y expansión clonal de células T específicas; se necesita de una segunda señal de activación mediada por las moléculas accesorias cuando interactúan con sus ligandos ubicados en las células presentadoras (Osorio *et al.*, 1995; Strong, 1999; Huang and Wange, 2004). Varias de estas moléculas

son miembros de la familia de moléculas de adhesión (Germain, 2001; Lee *et al.*, 2003). En la tabla 3 se muestran algunos de estos receptores con sus ligandos específicos.

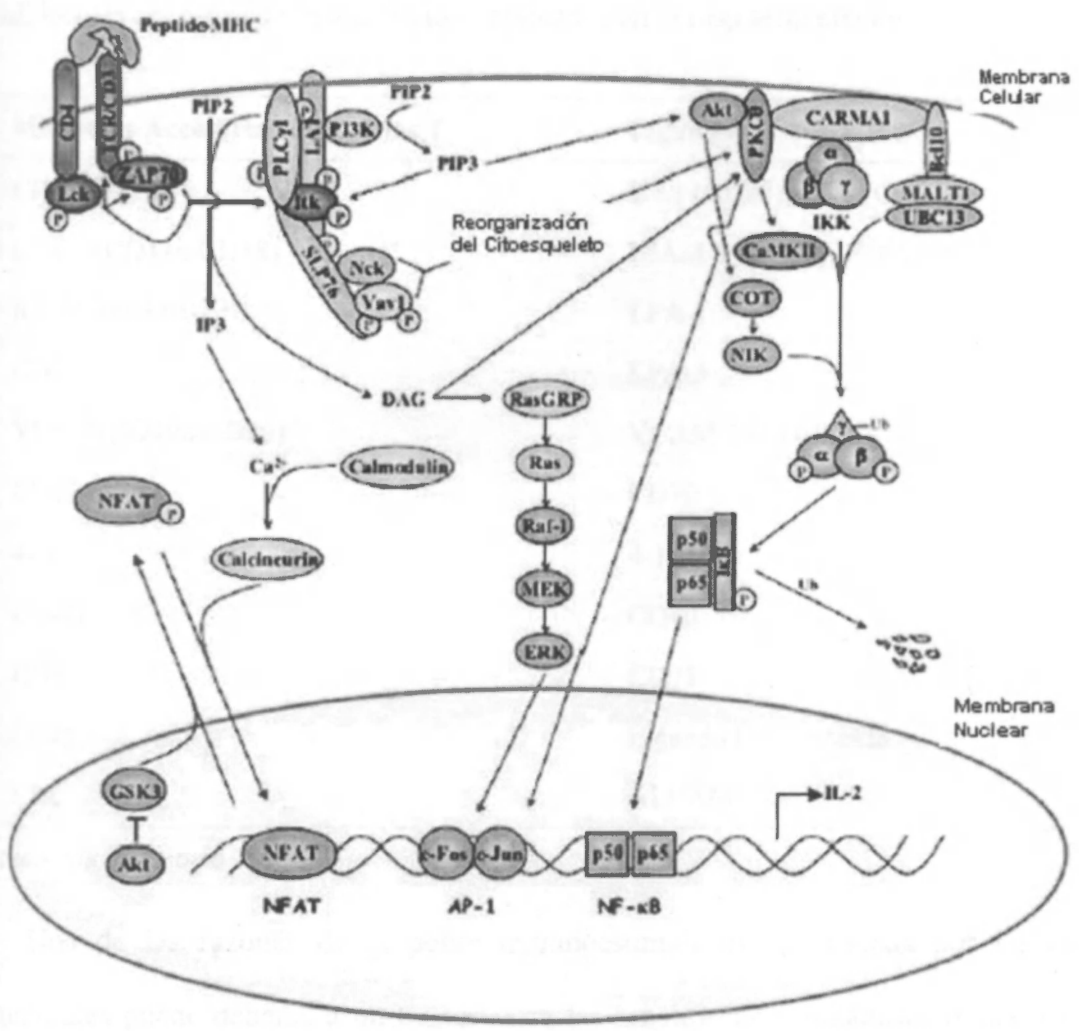

Figura 8: Vías de transducción de señales activadas por el TCR. *Adaptado de Huang and Wange, 2004.*

Los correceptores CD4 y CD8 se unen a las moléculas MHC clase II y clase I respectivamente y contribuyen a la formación del complejo entre el TCR y el complejo peptido-MHC de esta manera incrementan la sensibilidad de la interacción, además

participan en la regulación de la fosforilación de tirosinas en las células T por su asociación con $p56^{lck}$ (Osorio *et al.*, 1998; Germain, 2001).

Tabla 3

Moléculas accesorias y sus ligandos implicados en la respuesta efectora de las células T

Moléculas Accesorias de Células T	**Ligandos**
CD28, CTLA-4	B7.1 (CD80); B7.2 (CD86)
LFA-1 (CD11a/CD18)	ICAM-1 (CD54); ICAM-2 (CD102)
ICAM-3 (CD50)	LFA-1
CD2	LFA-3
VLA-4 (CD49d/CD29)	VCAM-1 (CD106)
CD27	CD70
4-1BB	4-1BBL
CD40L	CD40
CD5	CD72
CD45	Ligando Desconocido
CD6	ALCAM

Adaptada de Osorio 1998

Una de las razones de la pobre inmunoestimulación provocada por las células tumorales puede deberse a un trastorno en las señales coestimulatorias (Guckel *et al.*, 1995).

Por otra parte, diversas evidencias experimentales actuales sustentan la hipótesis de que el compromiso de la función de linfocitos T en pacientes con cáncer, puede explicarse por anormalidades en la transducción de las señales durante los eventos de activación. Alteraciones en los niveles de proteínas de la vía de señalización del TCR

como es el caso de: $p56^{lck}$, $p59^{fyn}$ y las cadenas ζ y ε del complejo TCR/CD3, se ha evidenciado que causan deficiencias en la activación de las células T en pacientes con cáncer sugiriendo una afectación de la respuesta inmune (Nakagomi *et al.* 1993; Nieland *et al.*, 1998; Gratama *et al.*, 1999; Reichert *et al.*, 1998, 2002; Salvadori *et al.*, 2000).

4.5.2 Estructura y Función de la Molécula CD3

CD3 es una molécula accesoria que está no covalentemente asociada al receptor de células T (TCR); es un complejo proteico formado por las cadenas: CD3-δ, CD3-ε, CD3-γ y un dímero que contiene la cadena ζ (Teixeiro *et al.,* 2002) (Fig. 9). CD3 interviene en la transduccción de señales que conduce a la activación de las células T cuando se produce el reconocimiento del antígeno por el TCR; debido a que las regiones citoplasmáticas de las moléculas de CD3 contienen motivos de activación basados en el inmunoreceptor de tirosinas (ITAM) que son fosforilados después del reconocimiento del antígeno por el TCR (La Gruta *et al.*, 2004).

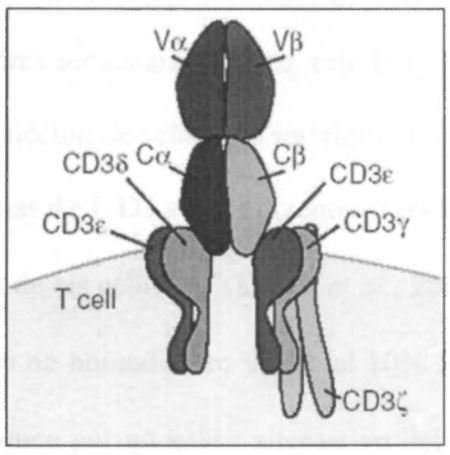

Figura 9: Estructura del complejoTCR/CD3

Se han propuesto varias estructuras para el complejo TCR/CD3, entre ellas un complejo octamérico monovalente (TCRαβ/CD3γεδεζζ) y un complejo decamérico bivalente ($(TCR\alpha\beta)_2$/CD3γεδεζζ) (Jacobs, 1997). El dímero αβ dicta la especificidad de unión al ligando y los dímeros de CD3 (γε, δε y ζζ) son esenciales para la eficiente expresión del receptor y para la señal de transducción (Huang and Wange, 2004). En ausencia de cualquiera de los componentes de CD3 el complejo TCR no se ensambla y todas sus proteínas son degradadas en el interior de la célula (Arase, 2001).

Las cadenas γ, δ y ε son homólogas entre sí, presentan un dominio extracelular semejante al de las inmunoglobulinas, por lo que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, la región transmembrana de las tres cadenas está formada por un segmento pequeño con residuos de aminoácidos cargados negativamente, los cuales se asocian a las cargas positivas del dominio transmembrana de las cadenas del TCR, la región citoplasmática de estas cadenas es muy pequeña y contiene los dominios ITAM que son importantes para la función de señalización (Abbas *et al.*, 2000).

La cadena ζ presenta una región extracelular muy corta de solo 9 aminoácidos una región transmembrana similar al resto de las cadenas de CD3 y la región citoplasmática es la más larga y contiene tres secuencias motivo, esto hace que sea una de las cadenas más importante en la transducción de señales al interior celular (Arase, 2001). La región citoplasmática de las cadenas de CD3 son suficientes para la transducción de señales necesaria para la activación de las células T (Kuhns *et al.*, 2006). El 90% de la cadena ζ en ratones, se expresa como un homodímero y solo el 10% forma un heterodímero con la cadena η, la cual se produce por un splice alternativo del gen de ζ (Krishnan *et al.*,

2003). La cadena ζ es la encargada de unir el reconocimiento del antígeno por el TCR a los eventos bioquímicos que conducen a la activación funcional de las células T.

4.5.3 Expresión de CD3-ε y CD3-ζ en Diferentes Tipos de Cánceres Humanos

Se han demostrado anormalidades funcionales en sus linfocitos obtenidos de células MNP y de ganglios linfáticos en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas, entre las que se encuentran: defecto en la movilización del calcio, disminución en la actividad tirosina kinasa y disminución en la expresión de las cadenas asociadas al TCR, ε y ζ (Reichert *et al.,* 1998). Estas y otras deficiencias también se han observado en los linfocitos asociados a tumor y en los linfocitos infiltrantes en pacientes con carcinoma renal (Finke *et al.*, 1993), colorectal (Nakagomi *et al.*, 1993; Matsuda *et al.*, 1995), gástrico (Ishigami *et al.*, 2002), cervical (De Gruijil *et al.*, 1999), cáncer de cabeza y cuello (Muller *et al.*, 2002) y carcinoma hepatocelular (Maki *et al.*, 2003). La expresión de la cadena CD3-ζ también se ha encontrado disminuida en biopsias de ganglio centinela de pacientes con cáncer de mama (Schüle *et al.*, 2004). Otros autores no han encontrado afectación en los niveles de las cadenas ζ (Nieland *et al.*, 1998) y ε (De Grujil *et al.*, 1999), pero si una afectación de la respuesta de células T en pacientes con cáncer.

Como las alteraciones en las cadenas CD3-ζ y CD3-ε provoca deficiencia en las señales del TCR al interior celular esto conduce a deficiencias en la activación de las células T y sugiere una explicación a los defectos de la respuesta inmune en los pacientes con cáncer. (Nakagomi *et al.*, 1993; Reichert *et al.,* 2002)

En pacientes con cáncer de cabeza y cuello se ha observado una correlación entre la pérdida de expresión de la cadena ζ y la agresividad clínica del tumor. Tumores de alto grado han mostrado una pérdida mayor de esta proteína. Esta deficiencia también se ha correlacionado con una recurrencia más frecuente, de la enfermedad (Muller *et al.*, 2002). En pacientes con carcinoma gástrico también se ha observado una correlación entre la disminución de la cadena ζ y la progresión de la enfermedad (Ishigami *et al.*, 2002). La pérdida de la expresión de CD3-ζ también se ha documentado en tumores de etapas clínicas iniciales o tempranas (Muller *et al.*, 2002).

Otros estudios indican que la reducción en la expresión de polipéptidos de CD3 también se produce en infección por HIV y algunas enfermedades autoinmunes (Trimble and Lieberman, 1998). La reducción o ausencia de ζ en Lupus Eritematoso Sistémico se ha visto como un factor importante en la patogénesis de la enfermedad (Tsuzaka *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha pensado que la Inmunodeficiencia Combinada Severa es causada por deficiencia de las cadenas ε y δ (De Saint Basile *et al.*, 2004). Estas anormalidades pueden reflejar una disrregulación de la función inmune en estados de deficiencia inmunológica.

La disminución en la expresión de la cadena ζ es biológicamente importante, se ha observado que puede ser normalizada en pacientes sometidos a bioterapia con IL-2. La cadena-ζ pudiera servir como un biomarcador no solo para definir la función inmune de los pacientes sino también como un factor pronóstico y de respuesta a inmunoterapia en pacientes con cáncer (Kuss *et al.*, 1999, 2002; Taylor *et al.*, 2004).

Varios autores han demostrado una disminución en los niveles de expresión de la proteína CD3-ε en linfocitos T de sangre periférica, infiltrantes de tumor y de ganglios

linfáticos; en pacientes con cáncer cervical avanzado y carcinomas colorectal y renal. Los niveles de esta proteína también pueden ser normalizados cultivando los linfocitos T con lL-2, anti-CD3, anti-CD2 y PHA. (Matsuda *et al.*, 1995; Kono *et al.*, 1996).

4.5.4 Función Normal de $P56^{lck}$ y $P59^{fyn}$ y Alteraciones de su Expresión en Cáncer

Las familias de proteínas tirosinas quinasas tienen una función esencial en los mecanismos de transducción de señales de varios procesos celulares (Chakraborty *et al.*, 2006). En el caso del mecanismo de activación de los linfocitos T, la respuesta bioquímica inicial después que se produce el reconocimiento del antígeno (péptido asociado a la molécula de MHC) por el TCR y la segunda señal mediada por las moléculas accesorias; conducen a una rápida fosforilación de los residuos de tirosina en una variedad de sustratos, llevada a cabo por las proteínas tirosinas kinasas. Se han descrito dos familias de proteínas tirosina kinasas (PTK) involucradas en estos eventos: la familia *srs*-PTKs específica de linfocitos, a la que pertenecen las PTKs $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ y la familia *syk*-PTKs, específica de células T, a la cual pertenece la PTK ZAP-70 (Osorio *et al.*, 1995; Hermiston *et al.*, 2002; Krishnan *et al.*, 2003). En los linfocitos T en reposo, la molécula $p56^{lck}$ está predominantemente localizada en la membrana celular en interacción con los correceptores CD4 y CD8. La coagregación del complejo TCR/CD3 con los correceptores CD4 y CD8, permite el acercamiento de $p56^{lck}$ a una vecindad de las cadenas de CD3 y de esta manera fosforila a la cadena CD3-ζ (Nervi *et al.*, 2000). $p59^{fyn}$ está constitutivamente asociada con la cadena ζ de la molécula CD3. La secuencia de eventos que ocurre es: la activación de la familia de las kinasas *src* y la

fosforilación de las secuencias motivo de activación ITAM, en la cadena ζ y en otras cadenas de CD3, seguido por el reclutamiento de ZAP-70 a las secuencias ITAM de las cadenas CD3-ζ y CD3-ε, a través del dominio SH2 (*src*-homología 2) de la ZAP-70. La fosforilación en tirosina de la ZAP-70 y su activación, desencadena los eventos siguientes de esta vía de señalización que finalmente conduce a la activación de los linfocitos T (Osorio, 1998; Texeiro *et al.*, 2002). Este proceso de transducción de señales del linfocito finaliza en el núcleo con la activación de genes que se requieren para la expresión de receptores de citocinas, la producción de citocinas y los procesos de proliferación y diferenciación de linfocitos (Huang and Wange, 2004).

Alteraciones de $p56^{lck}$ han sido observadas en situaciones patologicas tales como: lepra (Zea *et al.*, 1998), artritis reumatoidea (Matzuda *et al.*, 1998), lupus eritematoso (Matache *et al.*, 1999) y diabetes tipo I (Nervi *et al.*, 2000).

Varios autores han reportado una pérdida de la capacidad de la transducción de señales por las células T en huéspedes que tienen tumor (Salvadori *et al.*, 2000). Se ha descrito que las células T de ratones que presentan tumor, tienen defecto en varias moléculas importantes de la vía de transducción de señales del TCR. Niveles disminuidos de las moléculas $p56^{lck}$, $p59^{fyn}$ y CD3-ζ en las células T de bazo se han descrito en modelos de tumor murino que son responsables de un patrón alterado de fosforilación en tirosina lo cual refleja un defecto en la función de las células T (Radoja and Frey, 2000; Salvadori *et al.*, 2000). Tales defectos en la maquinaria de transducción de señales puedieran ser considerados la base bioquímica de la supresión de la respuesta inmune y se postula que están causalmente asociados con el escape del tumor de la destrucción inmune.

Alteraciones en la expresión y funciones de varias tirosinas quinasas se han observado en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Reichert *et al.*, 1998), carcinoma oral (Reichert *et al.*, 2002) y cáncer renal (Gratama *et al.*, 1999). La reducción de estas proteínas en cáncer puede ser reversible in vitro por estimulación mitogénica y se ha correlacionado con el éxito clínico (Gratama *et al.*, 1999). Péptidos de la proteína $p56^{lck}$ han sido investiagdos en el desarrollo de inmunoterapia específica en pacientes con cáncer que presentan metástasis a distancia (Harashima *et al.*, 2001)

4.5.5 Las Citocinas en la Respuesta Inmune Antitumoral

Las citocinas constituyen una amplia familia de glicoproteínas producidas por una variedad de células, participan en muchos procesos fisiologicos incluyendo la regulación de la respuesta inmune. Su producción *in vivo* es transiente y local para controlar la magnitud y duración de la respuesta inmune (Rojas *et al.*, 1999; Grandics, 2006). Las citocinas producidas por los linfocitos, se denominan linfocinas, estas cumplen una función fundamental en los mecanismos de activación, proliferación y diferenciación de las células que intervienen en la respuesta inmune y son mediadores decisivos para la cooperación celular durante la amplificación de la respuesta (Thize, 1994; Foster *et al.*, 2004).

Se han clasificado en diferentes grupos como: citocinas pro-inflamatorias, IL-1β, TNF-α e IFN-α; citocinas tipo 1, IL-12, IFN-γ, IL-2 y TNF-β; citocinas tipo 2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y citocinas tipo 3 como el TGF-β (Marcelli *et al.*, 2001). Esta nomenclatura abarca células T $CD4^+$ y $CD8^+$ y células no T, como fuente de las

diferentes citocinas y enfatiza las respuestas funcionales que las citocinas modulan en lugar de su célula de origen (Lucey *et al.*, 1996).

Las citocinas pueden tener un efecto estimulatorio o inhibitorio sobre el crecimeinto tumoral. La expresión de citocias y factores de crecimiento, por los linfocitos infiltrantes de tumor, puede conferir ventaja al tumor para crecer y suprimir la actividad citotóxica de estos linfocitos. Sin embargo, algunas promueven la capacidad antitumoral del sistema inmune. El análisis de estos factores solubles en el microambiente del tumor puede ayudarnos en la comprensión de la conducta del tumor y pudieran resultar útiles como factores pronósticos, además de su uso potencial en la inmunoterapia contra el cáncer (Marrogi *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 2006).

Muchos investigadores han atribuido la expresión del patrón de citocinas solamente a los linfocitos infiltrantes de tumor (Huang *et al.*, 1995). No obstante, la elevada expresión de citocinas es un fenómeno común en líneas de células tumorales derivadas de muchos tipos de cáncer como es el caso de melanomas, leucemias y carcinomas gástrico y de ovarios (Huang *et al.*, 1999).

La producción de citocinas también se ha documentado en pacientes con cáncer de mama (Rao *et al.*, 2006). Las células MNP de pacientes con cáncer de mama presentan una deficiencia en la producción de IL-12 mientras que generan grandes cantidades de IL-10 (Merendino *et al.*, 1999). Una significativa respuesta tipo 2 (IL-10 e IL-4) ha sido observada en los linfocitos de sangre periferica de pacientes con cáncer de mama (Rosen *et al.*, 1998). Análisis inmunohistoquímicos han demostrado la presencia de IL-1α e IL-1β en células tumorales de pacientes con carcinoma ductal y cáncer invasivo (Kurtzman *et al.*, 1999; Patschenko *et al.*, 2003). La expresión significativa de las citocinas: IL-8,

TNF-α, IL-10, TGF-β y transcriptos de IL-2 también ha sido observada en pacientes que padecen esta neoplasia (Green *et al.*, 1997; Marrogi *et al.*, 1997).

La secresión de citocinas en pacientes con cáncer también está relacionada con la resistencia a drogas. Ciertas citocinas, particularmente IL-6, IL-10 y TNF-α, provocan resistencia a los efectos citotoxicos de las drogas quimioterapeúticas. Estas citocinas inducen un efecto antiapoptótico en una variedad de tumores incluyendo el carcinoma de próstata y renal. La regulación de los factores apoptóticos y antiapoptóticos, por las citocinas, está bien documentada no siendo así los mecanismos por los cuales estas inducen la resistencia a drogas (Alas *et al.*, 2001).

4.5.5.1 Subpoblaciones Th1/Th2 y su Función Reguladora

Los linfocitos T cooperadores (Th) pueden ser clasificados en dependencia del patrón de citocinas que producen, definiéndose 2 subpoblaciones fundamentales: células Th1 que producen IL-2 e IF-N γ y células Th2 que producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (Gandics, 2006). Estas poblaciones celulares pueden diferenciarse a partir de las células Th0 (no estimuladas con el antígeno), a través de vías controladas de diferenciación que involucran citocinas y moléculas co-estimuladoras (Lucey *et al.*, 1996; Mosmann and Sad, 1996). Los eventos iniciales de activación a través del TCR de ambas subpoblaciones parecen ser diferentes en las células T humanas (Hannier *et al.*, 2002).

Las células Th1 median eventos celulares como son: hipersensibilidad retardada tipo IV, con reclutamiento de células inmuno-competentes; activación de macrófagos y células NK, con una potenciación de la actividad citotóxica de estas últimas y de los linfocitos T citotóxicos (CTL); además de estimular la proliferación de linfocitos T y

favorecer la producción de IgG2a; entre otras funciones, que sin duda serían importantes para una respuesta anti-tumoral efectiva. Por otra parte, las células Th2 intervienen en la respuesta humoral y tienen importantes efectos supresores sobre las células Th1 y sobre la respuesta inmune (Mosmann and Coffman, 1989; Mosmann and Sad, 1996).

En general, se conoce que las citocinas Th2 favorecen el desarrollo de una respuesta Th2 e inhiben la producción de citocinas Th1, mientras que las citocinas Th1 favorecen la diferenciación a células Th1 e inhiben el desarrollo de células Th2 (Hainaut *et al.*, 1990). Mediante este mecanismo también es posible el control de la síntesis de otras citocinas; por ejemplo, las células Th2, por acción de IL-10, pueden bloquear la proliferación y activación de las células Th1, al actuar sobre los macrófagos y bloquear la síntesis de TGF-β e IL-12, que son potentes inductores de células Th1 (Sher *et al.*, 1992; Manetti *et al.*, 1993).

Este mecanismo regulatorio y el predominio de una subpoblación sobre otra deriva la respuesta a mecanismos inmunes celulares o humorales, en dependencia de los patrones de citocinas que predominen (Grandics, 2006). Esta polarización de la respuesta juega una función importante en diferentes patologías humanas; entre las que figuran enfenmedades infecciosas, autoinmunes, SIDA y diferentes neoplasias (Modlin and Nutman, 1993).

Los mecanismos celulares específicos son decisivos en la respuesta efectora antitumoral humana. Estudios de la respuesta inmune celular en pacientes con cáncer indican una disminución en la producción de citocinas Th1 en sangre periférica y en el microambiente del tumor y la presencia de un patrón de citocinas Th2 en el sitio del tumor que sugiere una inmunosupresión local (Huang *et al.*, 1995; Lucey *et al.*, 1996).

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

Cáncer de mama (Venetsanakos *et al.*, 1997), carcinoma basal (Kim *et al.*, 1995), melanoma (Chen *et al.*, 1994), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Asselin-Paturel *et al.*, 1998), carcinoma renal (Nakagomi *et al.*,1995) y cáncer de colon (Contasta *et al.*, 2003), son ejemplos de neoplasias donde se ha reportado un predominio de citocinas Th2 con efectos supresores sobre la respuesta inmune.

Pardoll y Topalian (1998) propusieron un modelo para ilustrar como las células T $CD4^+$ son un componente crucial de la respuesta antitumoral. La presentación del antígeno tumoral a estas células T, por las células presentadoras, puede conducir hacia una respuesta inmune no productiva, tipo Th2. La activación de las células presentadoras (células dendríticas) activa a las células $CD8^+$, para que ejerzan su efecto citotóxico directo sobre las células tumorales (Fig. 10) (Pardoll and Topalian, 1998; Matusuda *et al.*, 2006).

Es de suma importancia estudiar si el cambio de citocinas Th1 a Th2 puede dar lugar al desarrollo de la neoplasia por una inhibición de los mecanismos de vigilancia inmunológica, o si este cambio de citocinas se debe a un efecto secundario inducido por las propias células tumorales.

Existen evidencias que indican que es factible la modificación del patrón de citocinas pre-existente. Janeway y Travers (1996) observaron que el patrón de citocinas podía cambiarse por estimulación con IL-2 e IL-12, potenciándose la producción de IFN-γ e inhibiéndose la producción de IL-10 (Janeway and Travers, 1996). Previamente se había encontrado que IL-12 era capaz de restaurar la producción de IFN-γ en linfocitos de sangre periférica de paciente seropositivos a HIV en donde la producción de IFN-γ es reducida o ausente (Clerici *et al.*, 1993). Es importante buscar alternativas que puedan

modificar los perfiles de estos mediadores en el microambiente del tumor y a nivel sistémico, en pacientes con cáncer de mama.

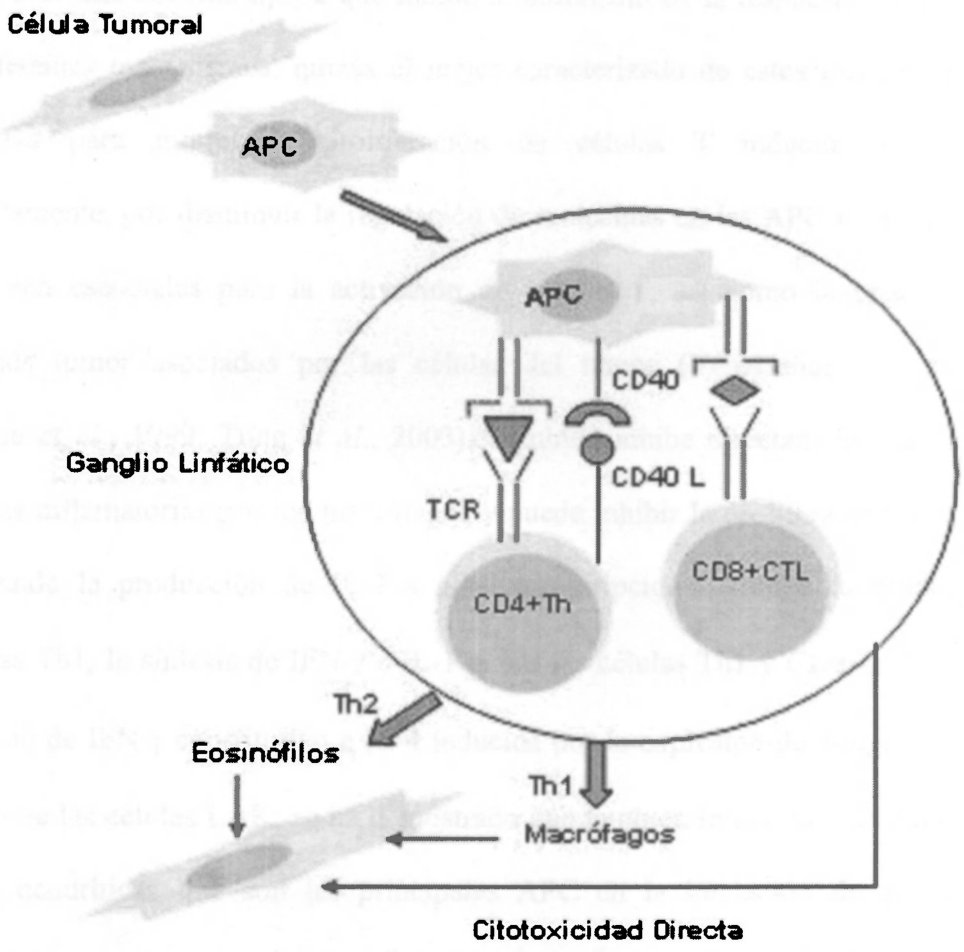

Figura 10: Respuesta inmune antitumoral (*Adaptado de Pardoll and Topalian 1998*).

4.5.5.2 Función de IL-10 en la Respuesta Inmune

Varios autores han reportado la presencia de IL-10 en el microambiente tumoral, de ganglios linfáticos y en células MNP en una variedad de cánceres humanos incluyendo linfoma no-Hotking (Alas *et al.*, 2001), cáncer de mama y páncreas (Liyanage *et al.*,

2002), melanoma (Chen *et al.*, 1994), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Huang *et al.*, 1995) y carcinoma renal (Nakagomi *et al.*,1995). También se han observado niveles elevados de IL-10 en el suero de pacientes con cáncer de mama (Kozlowski *et al.*, 2003), colon (Galizia *et al.*, 2002) y ovario (Mustea *et al.*, 2006).

IL-10 es una citocina tipo 2 que inhibe el desarrollo de la respuesta inmune celular por diferentes mecanismos, quizás el mejor caracterizado de estos mecanismos es su capacidad para inhibir la proliferación de células T inducida por antígeno indirectamente, por disminuir la regulación de moléculas en las APC profesionales, las cuales son esenciales para la activación de células T, así como la presentación de antígenos tumor asociados por las células del tumor (Venetsanakos *et al.*, 1997; Gastman *et al.*, 1999; Tung *et al.*, 2003). También inhibe directamente la síntesis de citocinas inflamatorias por los macrófagos y puede inhibir la proliferación de células T bloqueando la producción de IL-2 a nivel transcripcional; inhibe la producción de citocinas Th1, la síntesis de IFN-γ e IL-1 α por las células Th1 y $CD8^+$ y disminuye la expresión de IFN-γ constitutivo e IL-4 inducida por la expresión de antígeno; inhibe la función de las células LAK; se ha demostrado que también inhibe la maduración de las células dendríticas que son las principales APC en la iniciación de una respuesta inmune; además tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de H_2O_2 y de NO_2^- por los macrófagos (Castro *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 2001). Beker (1993) demostró la asociación de IL-10 con la inducción de anergia clonal de un clon de células T CD4+ por células autólogas de melanoma MHC clase II (Beker *et al.*, 1993).

Teniendo en cuenta los resultados que apoyan la capacidad de IL-10 para suprimir la respuesta inmune celular se ha propuesto que esta citocina permite el crecimiento

progresivo del tumor previniendo la generación de una respuesta inmune celular específica contra el tumor.

La producción de IL-10 en el sitio del tumor puede ser utilizada por el tumor para impedir su destrucción por el sistema inmune. La capacidad de IL-10 para inhibir la generación de respuesta inmune en el sitio del tumor tiene implicaciones con respecto a la inmunoterapia local del cáncer (Gastman *et al.*, 1999). Esto tiene importancia para diseñar estrategias dirigidas a generar inmunidad tumor-específica mediada por células y sugiere que la neutralización de IL-10 pueda ser clave para la efectividad de tales terapias.

IL-10 también ha sido reportada como un factor antiapoptótico, su efecto en la supervivencia de las células se ha asociado con una expresión incrementada de Bcl-2 (Alas *et al.*, 2001). IL-10 es capaz de prevenir la apoptosis inducida por activación de células T humanas (Hashimoto *et al.*, 2001). Se ha observado que el tratamiento de macrófagos murinos con anti-IL-10 disminuye la viabilidad celular y la expresión de Bcl-2, mientras incrementa la activación de la caspasa 1, la expresión de p53 y el número de células productoras de TNF-α. Estos resultados demostraron que IL-10 es capaz de rescatar a las células de la apoptosis disminuyendo la cascada de proteasas (Rojas *et al.*, 1999). IL-10 además, promueve la expresión de RNAm de Bax en células hepaticas activadas en cultivo (Wang *et al.*, 2004).

Existe poca información acerca de la relación entre las señales mediadas por IL-10 y los reguladores de Bcl-2. Alas y Bonavida demostraron que la sobreexpresión de Bcl-2 podía ser atribuida a la activación del transductor de la señal y activador de la

transcripción 3 (STAT3) por un mecanismo autocrino/paracrino de IL-10 en células tumorales de linfoma relacionadas a SIDA (Alas and Bonavida, 2001).

Se ha postulado que algunos promotores de citocinas pueden ser reprimidos por p53. Esto pudiera explicar la elevada producción de IL-10 observada en linfocitos de ratones deficientes de p53 con encefalomielitis autoinmune experimental (Ohkuso-Tsukada *et al.*, 1999).

4.6 Inmunología del Cáncer de Mama

4.6.1 Infiltración de Linfocitos

En los tumores sólidos como el cáncer de mama se encuentra con frecuencia un infiltrado mononuclear que consiste predominantemente de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ con aproximadamente igual frecuencia de ambas subpoblaciones lo que indica la activación de los dos tipos de respuesta. Además se han encontrado algunos linfocitos B, células NK y macrófagos (Hadden, 1999). La expresión de HLA-DR, CD25 y CD71 (receptor de transferrina) en la mayoría de los TIL obtenidos en cáncer de mama también sugiere que las células T han sido activadas *in vivo*. Sin embargo, hay evidencias que indican que el crecimiento del tumor no se detiene. Linfocitos infiltrantes han mostrado pobre citotoxicidad contra células tumorales autólogas o alogénicas y pobre respuesta proliferativa frente a mitógenos y estimulación alogénica (Venetsanakos *et al.*, 1997). No obstante, estos bajos niveles de citotoxicidad pueden ser aumentados por estimulación con IL-2.

154724

La expresión selectiva de citocinas por los TIL se ha reportado en diferentes tipos de cáncer. La producción de citocinas en el microambiente del tumor es crucial en el desarrollo de una respuesta inmune frente a las células tumorales y la presencia de citocinas supresoras puede impedir esta respuesta efectora y conferir ventaja al tumor para crecer (Venetsanakos *et al.*, 1997).

La infiltración de linfocitos en los tumores de mama se ha correlacionado positivamente con el estado de los ganglios linfáticos axilares y con el diámetro del tumor. Por otra parte en algunos estudios de supervivencia la infiltración predice una supervivencia libre de recurrencia para los tumores de mama de rápida proliferación. (Hadden, 1995)

4.6.2 Ganglios Linfáticos Regionales de Pacientes con Cáncer de Mama

El drenaje linfático de la mama incluye los grupos ganglionares axilares, mamario interno y supraclaviculares. Estos a su vez son los sitios que más comúnmente se involucran en el cáncer de mama, siendo los ganglios linfáticos axilares el principal sitio de metástasis regionales en el cáncer de mama, por ser la región principal de drenaje del carcinoma de mama (Chevinski *et al.,* 1990).

Los ganglios axilares están agrupados en 3 niveles, el nivel I son aquellos que se encuentran en el borde infero-lateral del músculo pectoral menor, el nivel II se considera la región que aloja a los ganglios posteriores al pectoral menor por debajo de la vena axilar y finalmente en el nivel III se encuentran los ganglios localizados en la parte media del pectoral menor y contra la pared torácica. Metástasis encontradas en los

niveles más altos en el cáncer de mama implican un peor pronóstico que el de los niveles proximales, aunque usualmente ocurre de una manera secuencial. (Harris *et al.*, 1993)

Es conocido que el estado de los ganglios linfáticos regionales es uno de los factores pronósticos más importante en cáncer de mama (Kuter, 2001; King *et al.*, 2004). Los pacientes con ganglios negativos tienen una mayor probabilidad de supervivencia que los pacientes con ganglios involucrados (Harris *et al.*, 1993). La presencia de ganglios linfáticos positivos incrementa el riesgo de metastasis a distancia (Clare *et al.*, 1997).

Black y colaboradores fueron los primeros en observar una correlación entre la supervivencia de pacientes con cáncer de mama y ciertas características de sus ganglios linfáticos axilares. El 60% de sus pacientes que presentaban una marcada reacción de histiocitosis en sus ganglios axilares tenían una supervivencia mayor que los que no la presentaban. También observó una preponderancia de linfocitos T reactivos en los ganglios de los pacientes con cáncer de mama. Ambos resultados sugirieron la presencia de mecanismos inmunes celulares como respuesta a los antígenos del tumor (Black and Speer, 1960).

4.6.3 Antigenicidad del Tumor de Mama

Como las células tumorales son derivadas de las células del huésped y se parecen a las células normales en muchos aspectos, expresan pocos antígenos que pueden ser reconocidos como extraños y por esta razón muchos tumores tienden a ser débilmente inmunogénicos (Grandics, 2006). No obstante, existe una variedad de antígenos que han sido identificados en los cánceres humanos, los cuales pueden ser reconocidos por

linfocitos T y B. Tales antígenos se clasificaron inicialmente de acuerdo a su patrón de expresión (Boon and Old, 1997).

Antígenos específicos de tumor: Antígenos que se expresan en las células del tumor, pero no en las células normales, algunos de ellos son únicos para un tumor individual y otros son compartidos entre tumores del mismo tipo.

Antígenos asociados a tumor: Antígenos que se expresan también en las células normales pero su expresión en los tumores es aberrada o desrregulada.

La clasificación actual se refiere a la estructura molecular y a la fuente de los antígenos (Abbas *et al.*, 2000).

Productos mutados de oncogenes y genes supresores de tumor: Muchos tumores expresan genes cuyos productos son requeridos para la transformación maligna o para el mantenimiento del fenotipo maligno; esos genes son producidos por mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones cromosomales o inserciones de genes virales que involucran proto-oncogenes o genes supresores de tumor; esos genes alterados no están presentes en las células normales y pueden estimular la respuesta de las células T en el huésped (Abbas *et al.,* 2000). Tal es el caso del gen supresor de tumor p53 que se encuentra mutado en cáncer de mama (Megha *et al.,* 2002; Yamashita *et al.*, 2004).

Proteínas celulares normales expresadas de manera aberrante: En este grupo se reúnen antígenos derivados de genes que solo se expresan en un momento determinado del desarrollo y se desrregulan como consecuencia de la transformación maligna de la célula. La transformación puede resultar en una expresión inapropiada de los genes normales en otro tejido o en un momento inadecuado y por lo tanto las proteínas que se producen pueden funcionar como antígenos tumorales y evocar respuestas inmunes. En

este caso se encuentran las proteínas MAGE, inicialmente aisladas de células humanas de melanoma. Esas proteínas son silentes en la mayoría de los tejidos normales y su expresión está restringida a los testículos y a la placenta, pero se expresan en una variedad de tumores humanos como es el caso del tumor de mama. En pacientes con cáncer de mama se encontrado anticuerpos circulantes y CTL específicos para MAGE-1 (Strong, 1999; Hadden, 1999).

Antígenos oncofetales: Son proteínas que se expresan en elevados niveles durante el desarrollo fetal y en las células de cáncer, pero no en los tejidos adultos. Se cree que los genes que codifican para esas proteínas son silenciados durante el desarrollo y desreprimidos en la transformación maligna. En este caso se encuentra el antígeno carcinoembrionario (CEA o CD66) que es una proteína integral de membrana que se encuentra altamente glicosilada y es miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas; es una molécula de adhesión intercelular que funciona promoviendo la unión entre las células del tumor, su expresión se ha encontrado incrementada en el carcinoma de mama (Hadden, 1995, 1999; Strong, 1999).

Glicoproteínas y glicolípidos alterados: Esas moléculas alteradas incluyen gangliósidos, antígenos de grupo sanguíneo y mucinas, a este último grupo pertenece la molécula MUC-1 expresada en el 90% de los carcinomas de mama, es una proteína integral de membrana que solo se expresa normalmente en la superficie apical del epitelio ductal de la mama, un sitio relativamente secuestrado del sistema inmune. En el carcinoma ductal de la mama la molécula se expresa de una forma no polarizada y contiene nuevos carbohidratos y epítopes peptídicos específicos del tumor, detectables por anticuerpos monoclonales. Los epítopes peptídicos son capaces de inducir respuestas

de células T y anticuerpos en los pacientes y y pueden ser considerados candidatos vacunales (Hadden, 1995, 1999; Strong, 1999).

Antígenos relacionados a virus: El virus del tumor mamario del ratón (MMTV) causa alta incidencia de cáncer de mama en ratones. El MMTV es un retrovirus no relacionado con un oncogén, la mayoría de los tumores inducidos por este tipo de retrovirus causan malignidades hematopoyéticas, aunque algunos de ellos inducen carcinomas, tal es el caso del MMTV. Varias evidencias asocian al MMTV con el carcinoma de mama humano, ya que se han encontrado anticuerpos contra secuencias peptídicas del MMTV y respuesta inmune mediada por células tanto *in vivo* como *in vitro* contra antígenos relacionados al MMTV en pacientes con cáncer de mama. Péptidos relacionados al MMTV expresados en células de cáncer de mama han sido usados como inmunógenos en vacunas sintéticas (Wang *et al.*, 1995; Hook *et al.*, 2000; Lenferink *et al.*, 2004).

4.7 Alteraciones de la Respuesta Inmune en Cáncer de Mama

La significación de los mecanismos inmunológicos en el cáncer de mama fue observada desde 1949 por Moore y Foote. Ambos investigadores observaron que el carcinoma medular de mama estaba generalmente asociado con marcadores de infiltración linfoide, lo que les sugirió una respuesta inmunológica contra esta neoplasia (Moore and Foote, 1949).

Los mecanismos de respuesta inmune celular son los más importantes en el control de la progresión del tumor de mama. Estudios celulares han revelado diversas alteraciones funcionales en pacientes con cáncer de mama: depresión de la respuesta

cutánea a antígenos de memoria, deterioro de la respuesta proliferativa frente a mitógenos, disminución de los efectos líticos de los CTL, disminución de la actividad NK y de las células asesinas activadas por linfocinas (LAK) y alteraciones celulares debidas a factores supresores como las prostaglandinas e IL-10 (Schwartzentrubart *et al.*, 1992; Finke *et al.*, 1993; Beitsch *et al.*, 1994; Hadden, 1995). También se ha descrito en éstas pacientes alteraciones de las subpoblaciones de céluas T, con inversión de la relación CD4:CD8 (Dadmarz *et al.*, 1995) y disminución de la expresión de la molécula CD6 en linfocitos T de sangre periférica y ganglios linfáticos (García *et al.*, 1990; Arango *et al.*, 1997), la cual se ha demostrado que interviene en la coestimulación de células T (Osorio *et al.*, 1995).

4.8 Evasión de la Respuesta Inmune en Cáncer de Mama

Muchas estrategias de inmunoterapia para el tratamiento del cáncer se basan en generar o aumentar una respuesta inmune específica contra los antígenos tumor asociados (TAA) que están presentes en las células tumorales, específicamente la respuesta inmune celular generada por los linfocitos T.

Se han detectado en pacientes con cáncer de mama anticuerpos circulantes y linfocitos T citotóxicos específicos para los antígenos del tumor de mama: Her2, MAGE-1 y MUC-1, además las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ se han identificado como componentes de los TIL en los tumores de mama (Hadden, 1999). No obstante, las evidencias que existen de que el sistema inmune puede reconocer las células tumorales en virtud de sus TAA, se ha detectado en los pacientes una respuesta inmune limitada. A

pesar de las respuestas inmunes específicas, las células del tumor evaden su detección y/o destrucción (Strong, 1999; Urosevic and Dummer, 2003).

Recientes avances en la inmunología tumoral han tratado de explicar la interacción del tumor con el sistema inmune y se han propuesto varios mecanismos por los cuales las células del tumor evaden al sistema inmune.

Las células tumorales pueden presentar propiedades alteradas que les impide el reconocimiento de las células T. Esas alteraciones pueden incluir disminución de la expresión de antígenos específicos o de moléculas MHC, en las células del tumor; defectos en la maquinaria de procesamiento de antígenos, específicamente las moléculas TAP pueden conducir a una disminución en los péptidos inmunogénicos en la superficie del tumor. Otros mecanismos alternativos de los tumores puede ser la secreción de moléculas inmunosupresoras como IL-10 y TGF-β o destruir directamente las células TIL Fas-positivas a través de la expresión del ligando de Fas, debido a que la interacción de Fas con su ligando induce la apoptosis en los TIL. Finalmente otra forma de que las células T no respondan a los tumores pudiera ser que los TAA sean presentados por las células APC de forma tal que induzcan en las células T anergia o tolerancia en lugar que activación (Strong, 1999; Platsoucas *et al.*, 2003).

El microambiente es crítico para la estimulación de una respuesta inmune antitumoral efectiva mediada por células T (Baruch, 2003). La liberación de citocinas como IL-12, GM-CSF (por las APC), IL-2 e IFN-γ (por las células T) estimula una fuerte respuesta inmune celular, sin embargo la producción local de IL-10 o TGF-β suprime la respuesta de las células T (Fig. 11). La presentación de los antígenos a las células T por las células presentadoras debe incluir la participación de moléculas coestimulatorias. La detección

de antígenos en ausencia de esta señal puede resultar en tolerancia. Por otra parte, para que los linfocitos T citotoxicos sean capaces de reconocer sus blancos, las células del tumor tienen un complejo MHC clase I para la presentación de los antígenos tumorales (Strong, 2000).

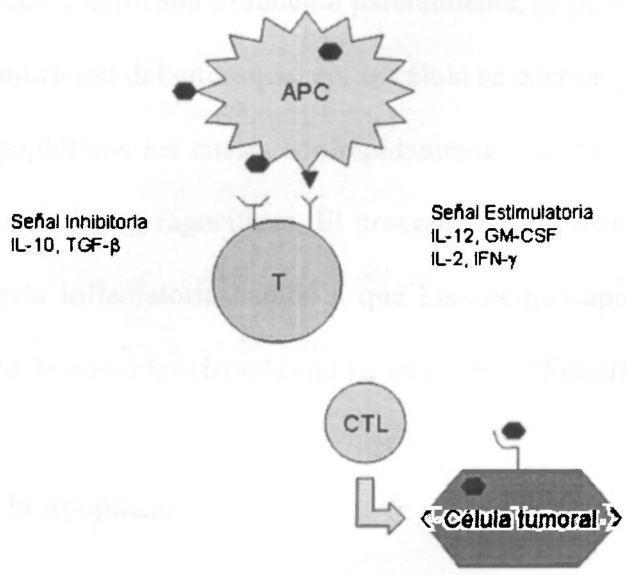

Figura 11: Influencia del microambiente sobre la respuesta inmune celular. *Adaptado de Strong, 2000.*

4.9 Apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es un programa de suicidio celular codificado genéticamente, es un proceso necesario para el desarrollo y la homeostasis, juega un importante papel en muchos procesos biológicos como: embriogénesis, morfogénesis, hematopoyesis y atrofia endocrino-dependiente e hiperplasia. En el sistema inmune la apoptosis está involucrada en varias funciones como son el desarrollo de células T y B maduras, regulación de respuestas inmunes, establecimiento de memoria inmunológica y citotoxicidad mediada por células. La apoptosis se produce en

respuesta a varios estímulos tales como hormonas, citocinas, unión antígeno-receptor, interacciones celulares y una variedad de agentes virales, químicos y físicos (Osorio, 1998).

Las células apoptóticas se caracterizan por presentar arrugas, burbujas y condensación de las membranas nuclear y plasmática. Las mitocondrias y los ribosomas mantienen su estructura y al menos su función parcialmente, se produce agregación de la cromatina y desorganización del citoesqueleto, la célula se encoge y se fragmenta en los llamados cuerpos apoptoticos los cuales son rápidamente ingeridos por los macrófagos adyacentes y por otras células fagocíticas. El proceso de apoptosis se lleva a cabo sin inducción de respuesta inflamatoria debido a que los cuerpos apoptoticos no inducen cantidad significativa de citocinas (Israels and Israels, 1999; Nomura *et al.*, 1999).

4.9.1 Regulación de la Apoptosis

Se puede decir que el proceso de apoptosis se divide en varias etapas; la inicial es la etapa de señalización dada por las diferentes vías inductoras de apoptosis, esta conduce a una etapa central de ejecución y control la cual culmina en una fase de degradación. Las primeras dos etapas están sujetas a eventos regulatorios; sin embargo, durante la etapa de degradación se produce un incremento de la entropía que excluye los procesos regulatorios. Existen varios genes involucrados en la regulación de la apoptosis, como es el caso de p53, la familia de genes de BcL-2, c-myc, ras, nurr 77, la familia de los receptores relacionados al TNF y sus ligandos y la familia de las caspasas, entre otros (Osorio, 1998).

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA U.A.N.L.

4.9.2 Función de p53

La proteína p53 es un factor de transcripción, que regula la transcripción de genes relacionados con diferentes procesos: inhibidores del ciclo celular, reguladores de la apoptosis, reparadores del DNA e inhibidores de la angiogénesis y metástasis. La proteína p53 detiene la multiplicación de las células estresadas y en muchos casos provoca la muerte de estas células en un intento por contener el daño y proteger al organismo; por lo tanto, p53 es importante para inhibir la proliferación de células anormales y el desarrollo de células neoplásicas (Hall, 1998).

Un amplio rango de situaciones de estrés celular puede resultar en activación del gen p53 y esto conduce a una respuesta adaptativa; este proceso está influenciado por el tipo de célula y otros factores específicos de tejido que pueden regular positiva o negativamente el proceso (Fig. 12) (Hall, 1998).

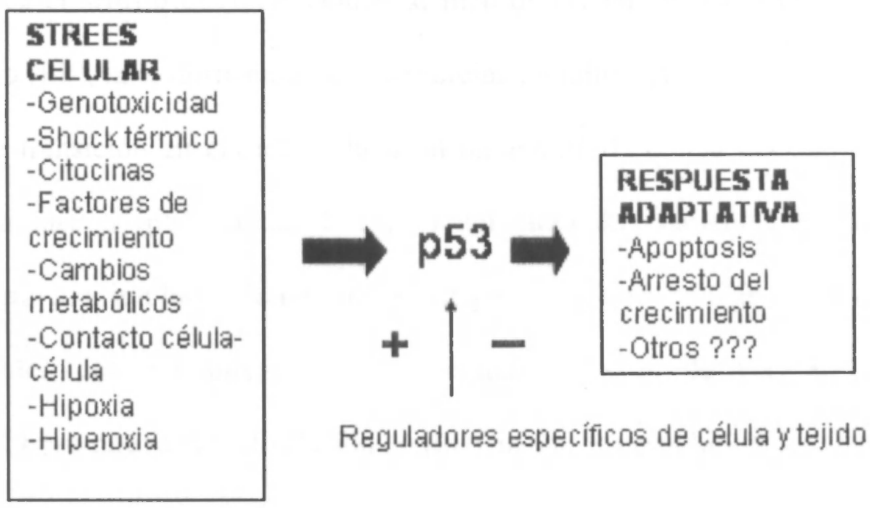

Figura 12: Respuesta de p53 frente al strees celular (*Adaptado de Hall 1998*).

La vía de señalización de p53 en condiciones normales se encuentra en reposo, su activación ocurre en respuesta a situaciones de estrés o daño celular. Se han identificado tres vías de activación que parecen ser dependientes de quinasas reguladoras; la primera es activada por un daño en el DNA producto de radiaciones ionizantes, la segunda es estimulada por señales de crecimiento aberrantes resultantes de la expresión de oncogenes como es el caso de ras y myc y la tercera vía es inducida por drogas quimioterapeúticas, luz ultravioleta e inhibidores de quinasas. Las tres vías de activación inhiben la degradación proteolítica dependiente de MDM2 de la proteína p53, estabilizándola en una alta concentración. La concentración elevada y la modificación coovalente que sufre la proteína durante el proceso de activación permiten que esta lleve a cabo su principal función de unirse a secuencias particulares en el DNA y activar la transcripción de genes que directa o indirectamente conducen a la muerte o a la inhibición de la división celular. (Vogelstein *et al.,* 2000; Gasco *et al.*, 2002)

p53 provoca el arresto del ciclo celular al final de G1 en un punto regulado por el retinoblastoma (Rb), la fosforilación de esta proteína permite a la célula pasar a través de este punto de transición en el ciclo celular, al pasar este, la célula irremediablemente continúa a la fase S. p53 ejerce el control del ciclo directamente estimulando la expresión de p21, un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que son las responsables del movimiento de las células a través de G1. El complejo ciclinaD/CDK4 promueve la fosforilación de Rb. Cuando Rb está hipofosforilado se une a E2F, un factor de transcripción que se requiere para pasar a través del punto de restricción de G1, la fosforilación de Rb libera E2F y lo transloca al núcleo e induce la transcripción de un número de proteínas que promueven que la célula pase a la fase S.

Un daño celular resulta en un incremento en la expresión de p53 seguido por la inducción de p21 y por lo tanto la inhibición de la fosforilación de Rb, por el complejo ciclinaD/CDK4. El mantenimiento de Rb en su estado hipofosforilado mantiene a la célula en G1 permitiendo la reparación del daño. Cuando el daño no es reparable, p53 lleva a cabo su papel de conducir a la célula a apoptosis (Israels and Israels, 1999) (Fig. 13).

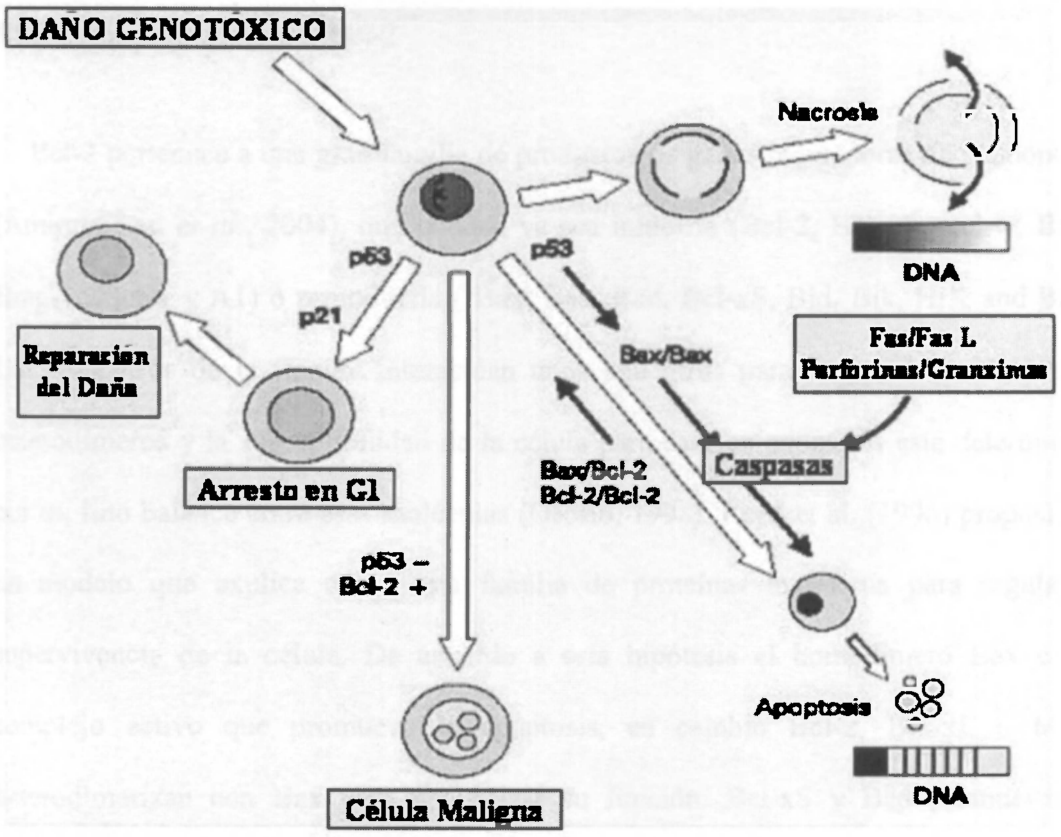

Figura 13: Vías que conducen a la apoptosis cuando se produce un daño no reparable (*Adaptado de Israels and Israels, 1999).*

Existen varios mediadores potenciales de la apoptosis inducida por p53. La transcripción del gen Bax, en células humanas es directamente activada por la unión de p53 a sitios específicos en la región reguladora del gen. Recientemente se han

descubierto algunos genes que son directamente activados por p53, las proteínas codificadas por estos genes se localizan en las mitocondrias. Otros mediadores incluyen proteínas similares a los receptores clásicos de muerte celular como es el receptor de TNF y Fas. Finalmente p53 también puede causar la muerte de la célula directamente estimulando a la mitocondria para producir un exceso de especies del oxígeno reactivo altamente tóxicas (Vogelstein *et al.*, 2000).

4.9.3 Familia de Proteínas Bcl-2

Bcl-2 pertenece a una gran familia de productos de genes reguladores de la apoptosis (Amirghofran *et al.*, 2004), que pueden ya sea inhibirla (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1 y A1) o promoverla (Bax, Bak, Bad, Bcl-xS, Bid, Bik, HrK and Bim). Los miembros de la familia interactúan unos con otros para formar homodímeros o heterodímeros y la susceptibilidad de la célula para caer en apoptosis está determinada por un fino balance entre esas moléculas (Osorio, 1998). Reed et al. (1996) propusieron un modelo que explica como esta familia de proteínas interactúa para regular la supervivencia de la célula. De acuerdo a esta hipótesis el homodímero Bax es un complejo activo que promueva la apoptosis, en cambio Bcl-2, Bcl-xL o Mcl-1 heterodimerizan con Bax para neutralizar su función. Bcl-xS y Bad promueven la apoptosis uniéndose a Bcl-2 y a Bcl-xL y previniendo la dimerización de Bax. Existe una competencia *in vivo* entre Bax y Bcl-2, sin embargo cada uno es capaz de regular la apoptosis independientemente (Reed *et al.*, 1996).

Las proteínas Bax residen en el citosol y por una señal de apoptosis migran a la membrana mitocondrial e inducen la pérdida de la permeabilidad selectiva a los iones, al

parecer por una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, como resultado de los cambios en la membrana se libera al citosol el contenido del espacio intermembrana incluyendo el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF), este último se mueve directamente al núcleo donde produce la condensación de cromatina y la fragmentación nuclear, mientras el citocromo c desencadena el evento terminal de la apoptosis, uniendose al factor Apaf-1 y activándolo, este a su vez activa la caspasa-9 y esta a las casapasas siguientes de la vía incluyendo la caspasa-3, responsable de los cambios citosolicos característicos de la apoptosis (Israels and Israels, 1999).

Las proteínas BcL-2 se encuentran en la membrana mitocondrial externa orientadas hacia el citosol, gobiernan el transporte de iones y protegen contra aberturas en la membrana. Se han sugerido dos mecanismos para la actividad antiapoptótica de BcL-2: secuestra al activador de caspasa, Apaf-1 e impide la liberación de citocromo c y de AIF. BcL-2 también puede ejercer su actividad antiapoptótica inhibiendo la translocación de Bax a la membrana mitocondrial (Osorio, 1998).

4.9.4 Regulación de la Apoptosis en Cáncer de Mama

La homeostasis en el tejido normal es regulada por un balance entre la actividad proliferativa y la pérdida de células por apoptosis. El proceso de apoptosis es necesario en el desarrollo normal de la glándula mamaria (Kumar *et al.*, 2000). Un defecto en la regulación de la apoptosis y la proliferación en la glándula mamaria puede ejercer un importante efecto en el desarrollo del cáncer de mama. Un bajo nivel de apoptosis puede conducir a un cambio en la cinética del tejido hacia la expansión del número de células y a la preservación de células genéticamente aberrantes favoreciendo la progresión

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA U.A.N.L.

neoplásica. Existen evidencias que indican una disminución de la apoptosis espontánea en células de carcinoma de mama comparado al epitelio normal de la mama (Jiong *et al.*, 2000).

Los niveles de expresión de varios reguladores del crecimiento y de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas están usualmente perturbados en cáncer de mama y su alteración se ha asociado con el pronóstico y con la respuesta a la terapia anticáncer convencional.

Muchos factores de crecimiento y sus receptores influyen en el crecimiento y proliferación de las células de cáncer de mama, por ejemplo, la sobrexpresión de Her-2 sobrerregula los genes anti-apoptoticos bcl-2 y bcl-xL y además inhibe *in vitro* la apoptosis inducida por tamoxifen (Gomez-Navarro *et al.,* 1999).

Además de los factores involucrados en el control de la proliferación se han identificado en el cáncer de mama, anormalidades en los genes: p53, bcl-2, bax, c-myc, p21 y otros. Como consecuencia las células tumorales expresan varias proteínas que provocan resistencia a la apoptosis y promueven la transformación neoplásica (Gómez-Navarro *et al.*, 1999).

Muchos agentes citotóxicos y quimioterapeúticos usados en el tratamiento de enfermedades malignas funcionan activando el proceso de apoptosis, algunos activan directamente las caspasas, otros por daño en el DNA y estimulación de p53. Los inhibidores de la apoptosis que sobrerregula a Bcl-2 o inhiben las caspasas pueden estimular el crecimiento del tumor y la resistencia a drogas (Israels and Israels, 1999).

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA U.A.N.L.

4.9.4.1 Función de p53 en la Regulación de la Apoptosis en Cáncer de Mama

p53 es uno de los genes más comúnmente mutados en los cánceres humanos, la proteína mutada resultante puede tener defecto en su secuencia de unión a DNA y por tanto no llevar a cabo la regulación de los genes que son normalmente transactivados por la proteína nativa (Lukas *et al.*, 2000). Las mutaciones en p53 son comunes en cáncer de mama, una consecuencia de la pérdida de la función normal de p53 puede ser la no-inducción de apoptosis en las células con daño en el DNA y esto puede empeorar la respuesta apoptotica a la quimioterapia y a la terapia hormonal, además de que puede contribuir a la inestabilidad genómica y esto incrementa la probabilidad de aparición de mutaciones adicionales que son ventajosas para la supervivencia de las células tumorales (Gómez-Navarro *et al.*, 1999).

La pérdida de heterocigocidad en el gen p53 es un evento común en los carcinomas primarios de mama y pudiera estar acompañado por mutaciones en el alelo residual, aunque en el 60% de los casos retienen el alelo nativo (Gasco *et al.*, 2002).

Se han encontrado diferentes tipos de mutaciones de p53 en tumores de mama, estas pueden aparecer en los sitios donde interactúa la proteína con el DNA, en sitios que preservan la integridad estructural de la proteína y en sitios fuera del dominio core. Los resultados en el estudio de las mutaciones de p53 sugieren que estas ocurren antes de la invasión en la progresión de la enfermedad en carcinoma ductal, aunque se han observado en el carcinoma ductal in situ de alto grado (Lukas *et al.*, 2000). Numerosos estudios han identificado mutaciones de p53 en cánceres con mutaciones en línea germinal de los genes BRCA1 y BRCA2. En el carcinoma medular se ha encontrado mutaciones en el 100% de los casos, este tipo de tumor presenta características clínico-

patológicas similares a los casos que se asocian con mutaciones de BRCA1 (Gasco *et al.*, 2002).

No obstante la alta frecuencia de mutaciones de p53 en cáncer de mama, es significativamente más baja que en otros tipos de cáncer. Existe una proporción de casos en los que ocurren diferentes mecanismos de inactivación de p53 independiente de la presencia de mutaciones y estas alteraciones se han identificado en proteínas regulatorias de la vía y algunas de ellas inducidas por p53, las cuales comprometen la función normal de la proteína (Gasco *et al.*, 2002).

4.9.4.2 Proteínas Bcl-2 en la Regulación de la Apoptosis en Cáncer de Mama

La sobrexpresión de Bcl-2 ocurre con la translocación del gen bcl-2 del cromosoma 18 al locus de las inmunoglobulinas en el cromosoma 14 (Osorio, 1998). Los genes de la familia Bcl-2 se desrregulan en el cáncer de mama. La proteína Bcl-2 se ha detectado en el 80% de los cánceres de mama femeninos. La apoptosis está inversamente asociada a la expresión de bcl-2 en las lesiones malignas y pre-malignas de la mama (Kumar *et al.*, 2000).

Se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales Bcl-2 ejerce su efecto positivo apoyando el crecimiento y su función antiapoptótica. La supresión de la expresión de p21 se propuso como uno de los mecanismos por el cual la proteína previene la apoptosis, se observó una asociación altamente significativa entre la expresión de p21 y la sobreexpresión de Bcl-2 en tumores de mama (Kumar *et al.*, 2000).

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA U.A.N.L.

Bcl-2 juega una función importante en la división celular; la alta velocidad de proliferación y el alto grado de tumor se han asociado fuertemente con la ausencia de expresión de Bcl-2. La pérdida de expresión de Bcl-2 también se ha correlacionado con un incremento de la muerte celular por necrosis y por apoptosis, con una alta velocidad de proliferación y el alto grado tumoral; en cáncer de mama. Otros investigadores han mostrado que la sobreexpresión de Bcl-2 prolonga la progresión del ciclo celular incrementando el tiempo de doblaje en células humanas de cáncer de mama (Gomez-Navarro *et al.*, 1999).

La expresión de esta familia de proteínas en cáncer de mama es también influenciada por el estradiol y la progestina. El estradiol incrementa los niveles de Bcl-2 en el tratamiento de células MCF-7 y los antiestrógenos revierten este efecto (Kandouz *et al.*, 1996). Antiestrogenos como el tamoxifen inducen la apoptosis en células de cáncer de mama disminuyendo la expresión de Bcl-2, sin embargo no afectan la expresión de Bax, Bcl-xl o p53 tanto del RNAm como de la proteína (Zhang *et al.*, 1999).

La proteína Bag-1 es otro miembro de la familia que se une a Bcl-2 e incrementa su actividad antiapoptotica, el RNAm y la concentración de esta proteína se han encontrado sobreexpresados en líneas celulares humanas de cáncer de mama (Kumar *et al.*, 2000).

Bax es un miembro de la familia de proteínas Bcl-2 y tiene un efecto proapoptótico (Amirghofran *et al.*, 2004). Varios estudios han mostrado una correlación entre la pérdida de expresión de Bax y el incremento en la progresión del tumor y disminución de la supervivencia en pacientes con cáncer de mama. Se ha reportado la degradación incrementada de la proteína Bax vía ubiquitina proteosomal como uno de los

mecanismos por el cual las células de cáncer regulan la expresión de Bax (Gomez-Navarro *et al.*, 1999).

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA U.A.N.L.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Pacientes y Obtención de Muestras

Se estudiaron 30 pacientes del sexo femenino procedentes del servicio de mastología del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR) de Cuba, con diagnóstico histológico confirmado de cáncer mamario, sin tratamiento oncológico específico previo al menos en 5 años y sin otra enfermedad séptica, crónica o endocrino-metabólica. Estas pacientes pertenecían a las etapas clínicas I y II y se encontraban en edades comprendidas entre los 27 y los 85 años en el momento de la cirugía.

Durante la cirugía se obtuvieron las muestras tumorales de aproximadamente 1-3 cm de diámetro, recolectadas asépticamente. De igual manera se recolectaron los ganglios linfáticos axilares no metastásicos de las pacientes. Las muestras se conservaron a –80 °C hasta su uso.

En el estudio se incluyó un grupo de 30 pacientes que cumplieron los criterios anteriores y a los que le fue posible la obtención de ambas muestras biológicas. Los sujetos fueron incluidos en un período de 5 años; entre 1996 y 2001. Se recogieron los datos clínicos de las pacientes incluidas como: edad, etapa clínica, clasificación TNM post-quirúrgica, tipo histológico, grado nuclear, tratamiento y fechas de operación, inscripción, cirugía, recaída y última noticia.

Los tejidos normales se obtuvieron de 5 pacientes que se practicaron reducción estética de las mamas en el Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras, de La Habana, Cuba. Estas muestras fueron recogidas bajo condiciones asépticas y conservadas a –80 °C hasta su uso.

5.2 Extracción de RNA

La extracción del RNA total de las muestras se llevó a cabo a partir de 100 mg de tejido según utilizando el método del Trizol (Chomczynski, 1993). Los fragmentos de tejido congelados se cortaron hasta obtener piezas de 1-2 mm de diámetro para su procesamiento, se homogeneizaron con un politrón en 1 ml de Trizol, se incubaron 5 min a temperatura ambiente (TA) e inmediatamente se les agregaron 200 µL de cloroformo, se agitaron en vortex por 15 segundos y se incubaron de 2-3 min a TA. Posteriormente se centrifugó a 12 000 x g por 5 min. a 4 °C, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se le añadió 500 µL de isopropanol para precipitar el RNA, las muestras se incubaron de 15 a 30°C por 10 min, se centrifugaron a 12 000 x g por 10 min a 4°C. La fase orgánica se guardó a –20°C para la extracción de proteínas. El RNA precipitado se lavó con etanol al 75% en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), centrifugando a 7 500 x g durante 5 min a 4°C y el RNA se disolvió con 25 µL de agua tratada con DEPC calentando en baño de maría a 70°C durante 10 min. Finalmente se cuantificó el RNA total de cada muestra por espectrofotometría y se visualizó en geles de urea-poliacrilamida para evaluar su integridad. Los RNAs totales fueron guardados a -80 °C hasta su uso.

5.3 Extracción de Proteínas

La extracción de proteínas se llevó a cabo por el método de Trizol (Chomczynski, 1993), utilizando la fase orgánica resultante del procesamiento de extracción de RNA. Después de la obtención de la fase acuosa donde se encontraba el RNA, las proteínas de la interfase fueron solubilizadas por inversión después de agregar etanol absoluto (Etanol:Trizol, 0.3 vol:1 vol), posteriormente se centrifugó a 2000 x g por 5 min a 4°C con el objetivo de precipitar el DNA y las proteínas que se encontraban en el sobrenadante se precipitaron con tres volúmenes de acetona y se incubaron toda la noche a –20°C. Después de la centrifugación a 5 000 x g por 2 min, se eliminó el sobrenadante y el paquete de proteínas se solubilizó con SDS al 1% y se dializó por 72 horas contra SDS al 0.1%; el material residual se eliminó por centrifugación a 5 000 x g por 2 min. Las muestras se guardaron a –20 °C hasta su uso.

5.4 Método Bradford

La concentración de las proteínas obtenidas por Trizol se determinó por el método de Bradford. A 800 µL de las muestras diluídas en H_2O destilada se les adicionaron 200 µL del reactivo Bio-Rad Protein Assay (Laboratorios Bio-Rad), se agitaron en vortex y se incubaron de 5 min a 1 hora en la oscuridad, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 595 nm. Se utilizó una curva patrón de BSA en un rango de 4 µg/ml hasta 64 µg/ml.

5.5 Inmunohistoquímica

Determinamos la expresión de la interleucina IL-10 y de los marcadores tumorales: Receptor de estrógenos y progesterona, Her-2, p53, Bcl-2, Bax y Ki67 por el método de inmunohistoquímica (IHQ). Se utilizaron fragmentos de tejidos tumorales incluidos en formalina y embebidos en parafina, procesados por el departamento de anatomía patológica del INOR. Se realizaron para cada muestra 2 cortes de 4 micras cada uno, se montaron sobre láminas silanizadas y se incubaron a 68°C durante 12 horas. Los cortes de tejidos se desparafmaron en xilol y se hidrataron en etanol a concentraciones decrecientes, se aclararon durante 5 min en H_2O destilada y se lavaron en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF). El desenmascaramiento antigénico se llevó a cabo hirviendo las láminas en buffer citrato 0.01 M pH 6.0 en horno microondas durante el tiempo indicado para cada caso, los cortes se dejaron enfriar durante 20 min, se lavaron con H_2O destilada y posteriormente con solución SSTF. La peroxidasa endógena se inhibió con una solución de H_2O_2 al 3% (DAKO) durante 10 min, los cortes se lavaron con SSTF y se llevó a cabo también una etapa de bloqueo de proteínas inespecíficas (DAKO) durante 10 mim; posteriormente se aplicaron los anticuerpos monoclonales primarios específicos a su dilución de trabajo y el control negativo, en este último caso el anticuerpo primario fue omitido y se sustituyó por solución SSTF, se incubaron durante 30 min, se lavaron los tejidos con SSTF y se aplicó el segundo anticuerpo biotinilado por 10 min, los cortes se lavaron con SSTF y se aplicó el complejo estreptavidina-peroxidasa por 10 min y finalmente las secciones de tejidos se incubaron con una mezcla fresca de una solución de 3,3' diaminobencidina tetrahidroclorhidrica

(DAB) (DAKO) en 1 ml de buffer sustrato durante 5 a 10 min, contrastándose con hematoxilina de Mayer, seguido de deshidratación en etanol a concentraciones crecientes, clarificandose en xilol y finalmente se montó en medio permanente Eukitt (Kinder GmbH & CO). La técnica se llevó a cabo a TA. En cada experimento se usaron controles positivos del marcador específico. Existen algunas variaciones en el procesamiento para cada marcador. La evaluación fue llevada a cabo por un médico anatomopatólogo y se realizó de forma semicuantitativa utilizando un microscopio de luz blanca (Leica) y el marcaje se clasificó según el marcador. La inmunotinción se clasificó en cuatro grupos según el porciento de células marcadas: 1+ para <25%; 2+ de 25-50%; 3+ de 50-75% y 4+ de 75% hasta más del 90%. Esta clasificación se llevó a cabo por igual para todos los marcadores, exceptuando a Her-2.

5.5.1 Receptor de Estrógenos

El desenmascaramiento antigénico se llevó a cabo por 10 min. Se emplea un bloqueador de peroxidasa endógena. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-RE prediluído de Anacrom Diagnósticos, S.L., un sistema de detección ultrasensible para Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (MLINK) y un sistema para revelado que emplea 3,3' diaminobencidina tetrahidrocloridrica (Anacrom Diagnósticos, S.L).

5.5.2 Her2/Neu

La detección de este marcador se llevó a cabo utilizando el juego diagnóstico DAKO Hercep Test™, el cual no emplea un sistema avidina-biotina, sino una tecnología de alta

sensibilidad, rapidez y de bajo fondo; que se basa en la utilización de un gran número de moléculas de enzima (peroxidasa) que se unen a un segundo anticuerpo a través de un esqueleto de un polímero (Dextrana). No obstante la metodología es similar a la que se describe con algunas variaciones de acuerdo al procedimiento recomendado por el fabricante. El tiempo de desenmascaramiento fue de 40 min. Se emplea un bloqueador de peroxidasa endógena. Se utilizó un anticuerpo anti-Her2 prediluído y el control negativo del sistema, ambos durante 30 min, después del lavado se empleó el reactivo de visualización por igual tiempo y finalmente las secciones de tejido se incubaron con DAB durante 10 min. En cada experimento se utilizó una lámina control del sistema que contiene tres clones celulares con diferente expresión de la oncoproteína Her2 y en ocasiones se utilizaron controles alternativos. Para este marcador la inmunotinción se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante:

Negativo (0): Ausencia de coloración en toda o parte de la membrana citoplasmática en menos del 10% de las células tumorales.

Negativo (1+): Fina barrera de coloración en parte de la membrana citoplasmática en más del 10% de las células.

Ligeramente positivo (2+): De leve a moderada coloración en toda la membrana citoplasmática en más del 10% de las células tumorales.

Fuertemente positivo (3+): De moderada a fuerte coloración en toda la membrana citoplasmática en más del 10% de las células tumorales.

5.5.3 p53, Bcl-2 Bax, Ki67 e IL-10

Para la determinación de estos marcadores se utilizó el sistema LSAB2 (peroxidasa) de la DAKO, siguiendo la metodología general descrita. Este método es basado en la aplicación consecutiva del anticuerpo primario, el segundo anticuerpo biotinilado, la enzima conjugada con estreptavidina y finalmente la solución sustrato-cromógeno. La diferencia en el procesamiento de cada marcador radicó en los tiempos de desenmascaramiento: para IL-10 fue de 10 min; para p53, 20 min, para Bcl-2 y Bax fue de 15 min y para Ki67 fue de 30 min. Los anticuerpos primarios usados y su dilución de trabajo fueron: anti-p53 (Pab 1801) y Bcl-2 (100) 1:200; IL-10 (E-10) 1:20 y Bax (B-9) 1:50 (Santa Cruz Biotechnology) y Ki67 (antigenMIB-1, DAKO) 1:75.

5.6 Western Blot

Las proteínas de activación linfocitaria fueron detectadas por la técnica de Western Blot, para lo cual se utilizaron las proteínas extraídas por el método de Trizol provenientes de las muestras de tumor y de ganglios linfáticos regionales de las pacientes con cáncer de mama. 20μg de cada muestra se corrieron en una electroforesis SDS-PAGE al 12%. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas separadas en el gel a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN BA83, Schleicher & Schuell), en una cámara de electrotransferencia semiseca (Owl Panther Semidray Electroblotter) acoplada a una fuente de poder EC570-90 (E-C Apparatus-Corporation) durante 1 hora y 30 min a 120 MA constante (2 MA por cm^2 de gel); la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% disuelta en buffer de lavado (TBS/Tween20 al 0.05%), durante 1 hora

a TA en agitación, luego se incubó con el primer anticuerpo monoclonal específico, diluido en TBS/Tween20 0.05% y leche descremada al 2.5%, a 4°C durante toda la noche en agitación. Los anticuerpos primarios usados y su dilución de trabajo fueron: anti-CD3-ζ (6B10.2) 1:1000, anti-CD3-ε (UCH-T1) 1:50, anti-Lck (3A5) 1:100, anti-Fyn (15) 1:100, p-Tyr (PY99) 1:100, anti-actine (C-2) 1:100 y anti-CD2 (Huly-m1) 1:100 (Santa Cruz Biotechnology); los dos últimos fueron usados como control. La membrana se lavó con buffer de lavado 4 veces por 15 min. en agitación, se incubó con el segundo anticuerpo: anti-IgG de ratón (H+L) conjugado con peroxidasa (Promega), diluido 1:2500 en TBS/Tween20 0.05% y leche descremada al 2.5% durante 2 horas a TA en agitación. Transcurrido este tiempo se procedió a lavar la membrana en las mismas condiciones anteriores y se reveló por el método de quimioluminiscencia para peroxidasa de acuerdo a las especificaciones del fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent, Pierce).

5.7 RT-PCR

Los niveles de citocinas fueron analizados mediante la técnica de Reverso Transcripción - Reacción en Cadena de la Polimerasa (Favre *et al.*, 1997), para lo cual se generó el DNA complementario (cDNA) utilizando 5 µg de RNA y una mezcla de reacción de 6 µL de solución amortiguadora RT 5x (Transcriptasa Reversa), 1 µL de DTT (Ditiotreitol) 0.1M, 1 µL de inhibidor de RNAsas (RNAsin), 1 µL de dNTP (Desoxinucleótidos) 10 mM, 1 µL de oligo $d(T)_{18}$ 165µM, 3µL de MMLV-RT (Transcriptasa Reversa) (200 U/µL) y agua tratada con DEPC al 0.5% hasta obtener un

volumen final de 20μL. La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas y luego por 10 min a 65°C y se guardó a –80°C hasta su uso. La amplificación por PCR del cDNA resultante se realizó en un Peltier Thermo Cycler PTC200, en un volumen final de reacción de 50 μL conteniendo: 5μL de buffer PCR 10X, 3μL de $MgCL_2$ 25mM, 1 μL de dNTP (10mM), 1 μL (20μM) de los primers 3′ y 5′ específicos para cada citocina o para el G3PDH que se usó como control, 0.5 μL (5U/μL) de Taq polimerasa (Gibco, BRL.), 1 μL de cDNA de cada muestra y agua PCR hasta completar un volumen de 50 μL. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 5 min a una temperatura inicial de 94°C, 45 seg a 94°C para desnaturalización, 45 seg a 65°C para la alineación de IL-2; 60°C de IFN-γ y G3PDH y 55°C de IL-10; 2 min a 72°C para la extensión y 35 ciclos para amplificación y la extensión final se llevó a cabo durante 7 min a una temperatura de 72°C.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio antes de su visualización en iluminación ultravioleta.

Los productos de PCR resultantes fueron de 305 pb para IL-2, 427 pb para IFNγ, 426 pb para IL-10 y 452 pb para G3PDH.

Las secuencias de los oligonucleótidos que se usaron fueron:

IL-10 a	5′-ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA (sense)
IL-10 b	5′-TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA (antisense)
IL-2 a	5′-CATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCA (sense)
IL-2 b	5′-CGTTGATATTGCTGATTAAGTCCCTG (antisense)

IFN-γ a 5′-GCATAGTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGC (sense)

IFN-γ b 5′-CTCCTTTTTCGCTTCCCTGTTTT (antisense)

G3PDH a 5′-ACCACAGTCCATGCATCAC (sense)

G3PDH b 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTCA (antisense)

5.8 Análisis Estadístico

Se conformó un modelo en el que se recogieron de manera detallada todos los datos de interés (Anexo 1) y posteriormente se conformó una base de datos en Excell que se utilizó para realizar el análisis estadístico de los mismos.

Se realizó un análisis exploratorio de los datos que permitió la descripción del comportamiento global de las variables registradas en el estudio tanto las referidas a la enfermedad y a las características de base de los pacientes como las relacionadas con el estatus inmunológico. El mismo se desarrolló de acuerdo a la naturaleza de las variables: cuantitativa o cualitativa. En el caso de las variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central (media, mediana) y de dispersión (valores mínimo y máximo, rango); en tanto que para las cualitativas se utilizaron distribuciones de frecuencias y porcentajes.

Se estudió la relación entre diferentes variables categóricas de interés, para lo cual se utilizaron tablas cruzadas y test estadísticos chi-cuadrado de asociación.

La estimación de la supervivencia y el intervalo libre de enfermedad (ILE) se realizó a través del método no paramétrico de Kaplan–Meier. Se realizó un análisis univariado

para la identificación de posibles factores inmunológicos pronósticos en el ILE, para lo cual se utilizó el test de Logrank de comparación de curvas de supervivencia.

En todos los casos en los que se aplicaron test estadísticos se utilizó un nivel de significación de 0.05.

Los datos se resumen en tablas y gráficos con el fin de ilustrar adecuadamente el comportamiento de las variables analizadas.

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS, ver. 11.0 para Windows.

6. RESULTADOS

6.1 Expresión de Factores Pronósticos Clásicos en Cáncer de Mama

Teniendo en cuenta la heterogeneidad que presenta el cáncer de mama, tanto por sus características biológicas como por su progresión clínica, se hace necesario contar con parámetros que ayuden en la determinación de un pronóstico certero y un tratamiento eficaz. Algunos de los factores pronósticos clásicos en el carcinoma de mama son el tamaño del tumor, el estado de los ganglios linfáticos, el tipo histológico, el grado nuclear y la edad de la paciente (Almasry and Hamad, 2005).

No obstante, en pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales, los parámetros morfológicos clásicos son incapaces de discriminar el 30% de los casos que evolucionarán desfavorablemente y que son susceptibles de tratamiento sistémico adyuvante. En las pacientes con neoplasias avanzadas, también es esencial disponer de nuevos criterios de selección de terapias. Las respuestas al tratamiento hormonal o a la quimioterapia no son uniformes, ni totalmente predecibles a partir solamente de criterios morfológicos o de factores pronósticos clásicos.

En el presente estudio, la muestra estuvo comprendida por un total de 30 pacientes del sexo femenino, diagnosticadas de cáncer de mama con confirmación histológica, sin tratamiento oncológico específico previo al menos en 5 años y sin otra enfermedad séptica, crónica o endocrino-metabólica en el momento de inicio de su tratamiento. La

edad media de las pacientes fue de 51 años, con un rango de variación que osciló entre 26 y 85 años. El tipo histológico más frecuente resultó ser el carcinoma ductal infiltrante, el cual se presentó en 23 pacientes (76.7%), 3 pacientes presentaban carcinoma lobular invasivo (10%), 2 pacientes carcinoma medular (6.7%), 1 paciente carcinoma mucinoso (3.3%) y 1 paciente carcinoma papilar intraquístico (3.3%). El grado nuclear pudo ser definido en 27 casos, de los cuales, 6 corresponden a GN I (22.2%), 12 a GN II (44.4%) y 9 a GN III (33.3%). Las pacientes se encontraban en etapas tempranas de la enfermedad con una distribución del 43.3% y 56.7% en etapas I y II respectivamente. En un 23.3% de los casos se encontraron ganglios metastásicos (7 pacientes). Las características clínicas de las pacientes se muestran en la tabla 4, donde se recogen datos como: edad, etapa clínica, clasificación TNM post-quirúrgica, tipo histológico de los tumores y grado nuclear.

El análisis de los factores pronósticos en pacientes con cáncer de mama se utiliza fundamentalmente con un objetivo clínico. En este trabajo, el análisis de las características clínicas y morfológicas del tumor, así como las características de las pacientes serán utilizados como una aproximación inicial para establecer las condiciones generales de la enfermedad, conocer la agresividad tumoral en cada paciente y poder relacionarlas con anormalidades en la expresión de factores de tipo inmunológico.

Tabla 4

Datos clínicos individuales de las pacientes.

PACIENTE	EDAD	TNM	ETAPA	HISTOLOGIA	GN
1	51	T1cN0M0	I	CDI	ND
4	42	T3N0Mx	IIb	CDI	III
5	27	T2N0M0	IIa	CDI	III
7	34	T2N0M0	IIa	CM	ND
8	49	T1cN0M0	I	CLI	II
9	55	T2N1M0	IIb	CLI	ND
12	70	T1bN0M0	I	CDI	I
13	72	T1bN0M0	I	CDI	I
14	36	T2N1M0	IIb	CDI	III
15	47	T2N0M0	IIa	Cm	I
16	56	T1cN1M0	IIa	CDI	III
17	57	T2N0M0	IIa	CDI	III
18	47	T1cN1M0	IIa	CLI	II
19	45	T2N0M0	IIa	CDI	I
20	42	T2N0M0	IIa	CDI	III
21	72	T1cN1M0	IIa	CDI	I
22	48	T1bN0M0	I	CDI	III
24	33	T2N1M0	IIb	CDI	II
25	69	T3N0M0	IIb	CDI	II
26	50	T1aN0M0	I	CDI	II
27	37	T1cN0M0	I	CDI	II
28	26	T1cN0M0	I	CDI	II
29	46	T1bN0M0	I	CDI	II
30	44	T1cN0M0	I	CDI	II
31	60	T2N0M0	IIa	CDI	III
32	72	T1cN0M0	I	CPI	I
33	44	T2N0M0	IIa	CDI	II
34	44	T1cN0M0	I	CDI	II
36	60	T1cN1M0	IIa	CM	III
37	85	T1bNxM0	I	CDI	II

CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante, CM: Carcinoma Medular, Cm: Carcinoma Mucinoso, CPI: Carcinoma Papilar Intraquístico, CLI: Carcinoma Lobular Invasivo. ND: No Definido, GN: Grado Nuclear

6.2 Expresión de Marcadores Tumorales Pronósticos de Cáncer de Mama

Se ha estudiado un grupo de moléculas involucradas en la biología del cáncer de mama como marcadores tumorales pronósticos potenciales. Entre las moléculas que se usan rutinariamente para tomar decisiones en pacientes en estadios iniciales de la enfermedad se encuentran, marcadores de proliferación (Ki67), receptores hormonales (RE y RPg) y factores de crecimiento (Her-2). Los receptores de estrógeno y progesterona son marcadores con connotación de selección de tratamiento, por lo que se encuentran entre los marcadores de mayor aceptación y aplicación clínica. Otros como las ciclinas D1 y E, la catepsina D, p53 y miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Bcl-2 y Bax) muestran un importante valor pronóstico pero no son utilizados rutinariamente. Existe un grupo de marcadores cuyo nivel de evidencia como factores pronósticos, necesita ser más investigado (Esteva and Hortobagyi, 2004; Yamashita *el al.*, 2004). En este trabajo estudiamos la expresión de diferentes marcadores tumorales, en pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales de la enfermedad; entre estos se encuentran importantes marcadores pronósticos en cáncer de mama que forman parte de un panel capaz de predecir la evolución clínica de la neoplasia, incluyendo su respuesta a un tratamiento terapéutico.

Para estudiar las características del tumor en cuanto a sus marcadores tumorales pronósticos, se determinaron por inmunohistoquímica los marcadores: Her2, p53, Bcl-2, Bax, Ki67 y los receptores hormonales RE y RPg. Estos parámetros se determinaron en una totalidad de 27 pacientes, excepto para Bax y Rpg determinados en 26 y 25 casos

respectivamente. En la Tabla 5 se resume la expresión de los marcadores tumorales analizados.

La inmunorreactividad para los receptores hormonales se observó en el núcleo de las células tumorales de la mama. RE resultó positivo en el 51.8% de los casos (14/27), mientras que RPg se expresó en el 32% de las pacientes (8/25). En la figura 14 se observa la tinción de RE; la paciente 30 (Fig. 14 A) muestra una tinción nuclear moderada en las células del epitelio ductal al igual que la paciente 19 (Fig. 14 C) donde la inmunoreactividad es intensa y se observa un predominio de un patrón cribiforme con un componente invasivo. La paciente 18 (Fig. 14 B) muestra un patrón lobular infiltrando con más del 75% de núcleos marcados. La figura 15 muestra el marcaje de RPg. La paciente 26 (Fig. 15 A) presenta un CDI mejor diferenciado donde se pueden observar los conductos, en la paciente 19 (Fig. 15 B) se observan zonas más desmoplásicas y menos epitelio ductal; la paciente 18 (Fig. 15 C) muestra células pleomórficas con menor intensidad de marcaje que las células más uniformes y en la paciente 20 (Fig. 15 D) se observa parte de un lobulillo donde la proliferación de las células tumorales distorciona su arquitectura.

Tabla 5

Expresión de los marcadores tumorales

Paciente	RE	RPg	HER-2	p53	Bcl-2	Bax	Ki67
4	0	ND	0	1+	0	ND	ND
5	0	0	0	0	3+	2+	0
8	2+	0	0	0	4+	4+	0
12	4+	0	0	0	3+	3+	ND
13	4+	1+	0	0	3+	4+	< 20%
14	4+	2+	1+	3+	3+	4+	25%
15	2+	0	0	0	3+	0	0
16	0	0	0	4+	0	4+	25%
17	0	0	0	4+	0	4+	0
18	4+	3+	3+	0	4+	4+	< 20%
19	4+	2+	2+	0	4+	4+	< 20%
20	4+	3+	3+	0	4+	4+	0
21	0	0	0	0	2+	0	ND
22	0	0	0	0	1+	4+	0
24	0	0	2+	0	4+	4+	0
25	0	0	3+	4+	0	3+	0
26	3+	3+	1+	0	4+	4+	0
27	3+	0	3+	0	4+	3+	25%
28	0	0	3+	0	3+	4+	< 5%
29	3+	2+	0	0	2+	3+	0
30	4+	3+	1+	0	4+	4+	0
31	0	0	2+	0	3+	3+	30%
32	4+	ND	0	3+	3+	3+	5%
33	0	0	3+	4+	2+	4+	25%
34	0	0	2+	4+	0	4+	< 10%
36	0	0	3+	0	0	4+	40%
37	4+	0	0	0	4+	3+	25%

La clasificación de la tinción de los diferentes marcadores se realizó según se describe en la sección de materiales y métodos. ND: No Determinado. La clasificación de Ki67 se refiere al por ciento de células marcadas

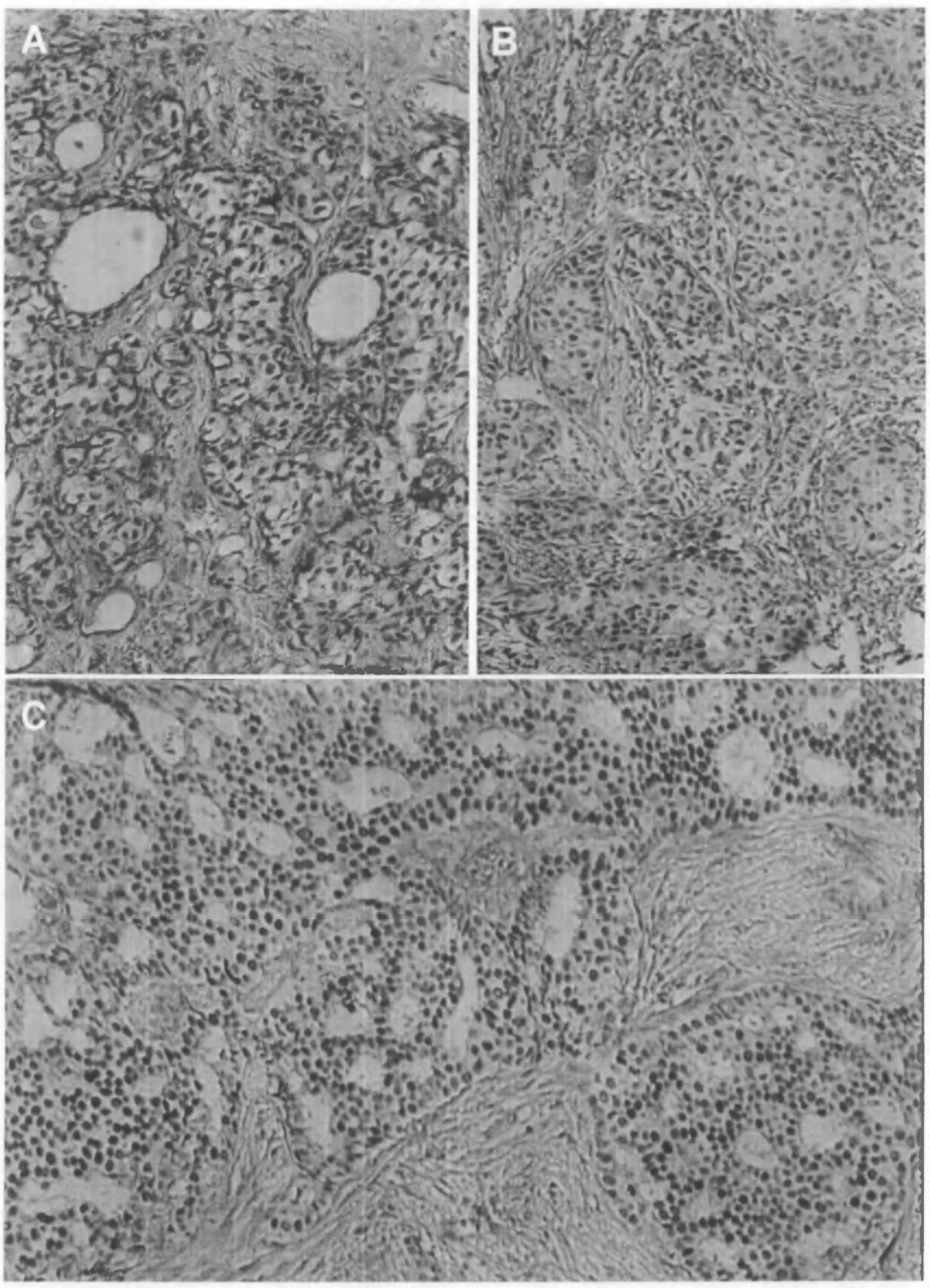

Figura 14: Expresión de RE en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama. Inmunoreactividad nuclear de células tumorales de mama marcadas por inmunohistoquímica con anti-RE en cortes de tejidos fijados y embebidos en parafina de 27 pacientes. A: paciente 30; B: paciente 18 y C: paciente 19. Las fotos se tomaron con un aumento x40 y x20.

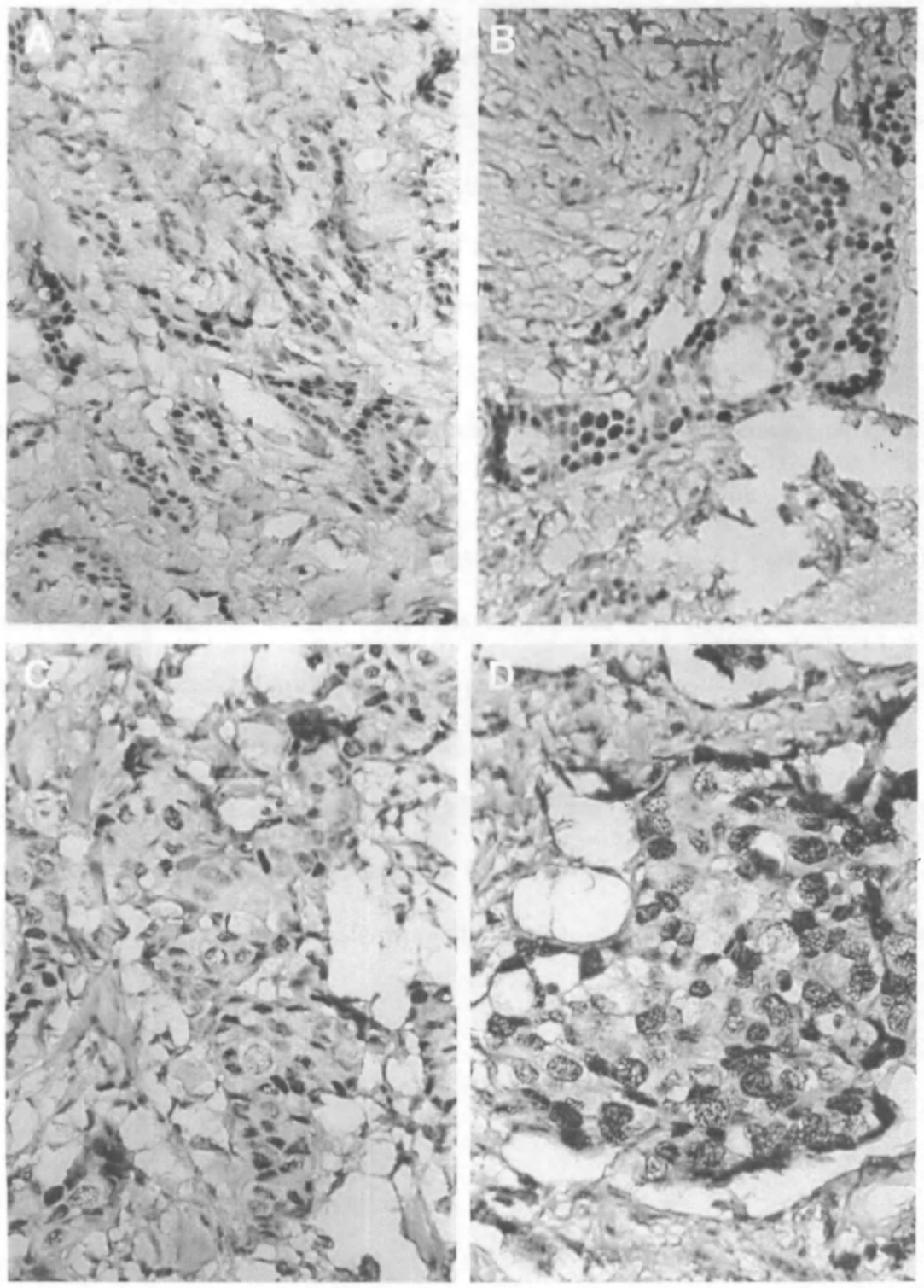

Figura 15: Expresión de RPg en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama. Inmunoreactividad nuclear de células tumorales de mama marcadas por inmunohistoquímica con anti-RPg en cortes de tejidos fijados y embebidos en parafina de 25 pacientes. A: paciente 26; B: paciente 19; C: paciente 18 y D: paciente 20. Las fotos se tomaron con un aumento x40 y x20.

El patrón de tinción inmunohistoquímica de Bcl-2 y Bax mostró una localización celular citoplasmática característica, en las células de cáncer de mama. Los linfocitos infiltrantes de tumor resultaron positivos para ambos marcadores. Bax resultó positivo en el 92.3% de los casos (24/26) y Bcl-2 en el 77.8% (21/27). La figura 16 muestra la tinción del marcador Bcl-2 en pacientes representativas. En algunos casos se observó una intensificación de la tinción perinuclear para este marcador. La paciente 24 (Fig. 16 B) muestra una tinción citoplasmática del componente tumoral que infiltra el estroma y el tejido adiposo. En las pacientes 21 (Fig. 16 C) y 30 (Fig. 16 A) se observan estructuras ductales, en esta última se presenta un patrón cribiforme en algunas zonas, la paciente 21 muestra una menor intensidad de marcaje. En la figura 17 se observa la inmunoreactividad del marcador Bax. En las pacientes 8 (Fig. 17 A) y 28 (Fig. 17 B) se observa un acúmulo de células epiteliales neoplásicas con moderada intensidad de marcaje que se encuentra infiltrando el estroma, en la paciente 28 también se observan células aisladas infiltrando el estroma. Las pacientes 18 (Fig. 17 C) y 36 (Fig. 17 D) muestran una panorámica del tumor, en el primer caso (paciente 18) se observa una disposición lobulillar y en el segundo (paciente 36) un CM predominante con participación de un CDI moderadamente diferenciado que muestra estructuras ductales con tinción intensa.

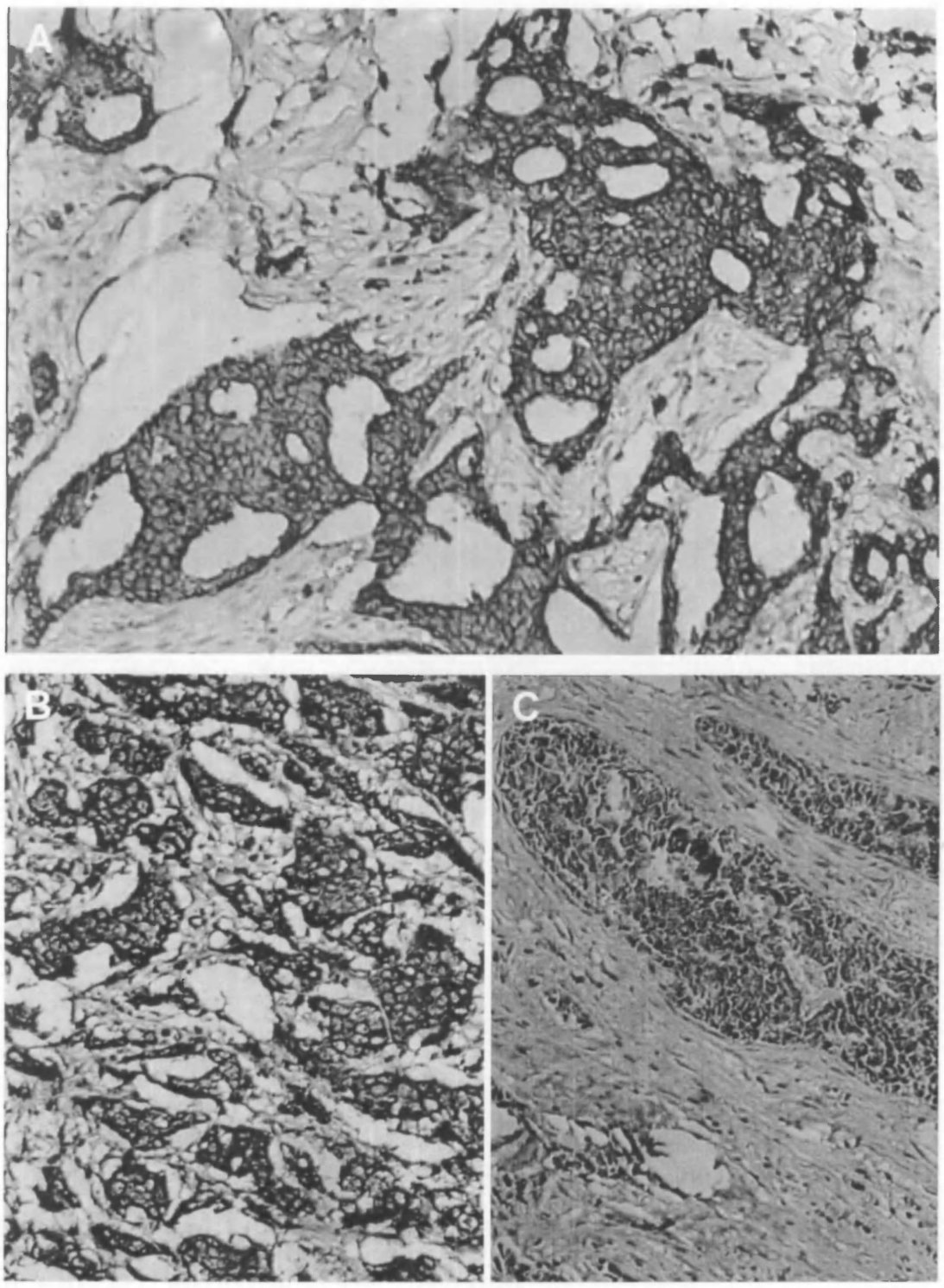

Figura 16: Expresión de Bcl-2 en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama. Inmunoreactividad citoplasmática de células tumorales de mama marcadas por inmunohistoquímica con anti-Bcl-2 en cortes de tejidos fijados y embebidos en parafina de 27 pacientes. A: paciente 30; B: paciente 24 y C: paciente 21. Las fotos se tomaron con un aumento x20.

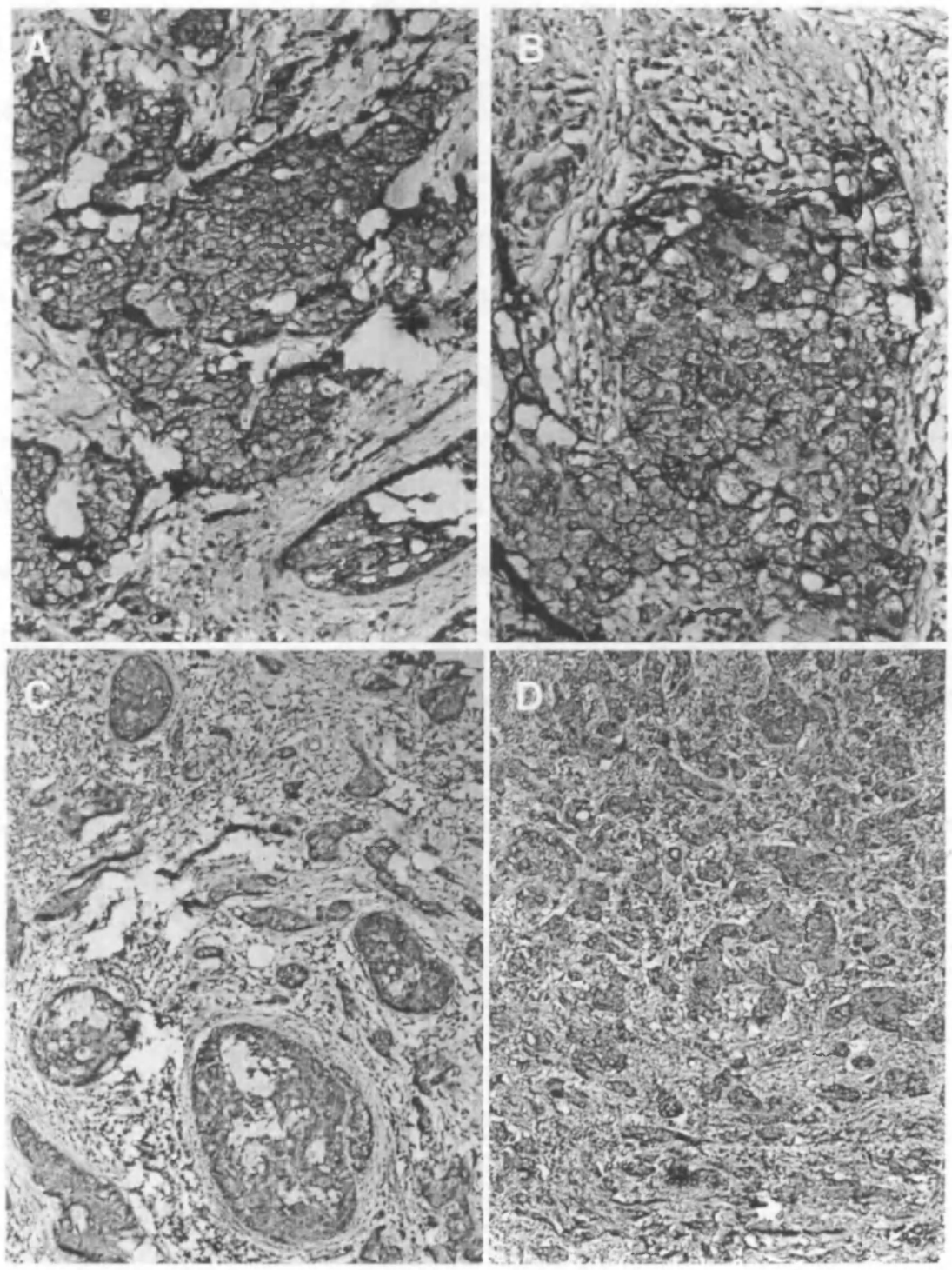

Figura 17: Expresión de Bax en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama. Inmunoreactividad citoplasmática de células tumorales de mama marcadas por inmunohistoquímica con anti-Bax en cortes de tejidos fijados y embebidos en parafina de 26 pacientes. A: paciente 8; B: paciente 28; C: paciente 18 y D: paciente 36. Las fotos se tomaron con un aumento x40 y x20.

La inmunorreactividad observada en el caso de p53 fue en el núcleo de las células tumorales de la mama. p53 resultó positiva en el 29.6% (8/27) de los casos. En la figura 18 se observan tres pacientes con marcaje nuclear de diferentes intensidades en las células epiteliales tumorales que se encuentran infiltrando el estroma: paciente 17 (Fig. 18 A) marcaje intenso 4+, 34 (Fig. 18 B) moderado 4+ y 14 (Fig. 18 C) ligero 3+; en ninguno de los tres casos se observan estructuras ductales, solo la infiltración del tumor; en la paciente 14 se observa mayor pleomorfismo, anisocariosis y metaplasia.

En el caso de Her-2 el marcaje se obtuvo en el 40.7% de los casos (11/27). La inmunorreactividad se clasificó según el porciento de células marcadas y las características de la tinción de la membrana. En la Figura 19, se observa el marcaje de las membranas citoplasmáticas de células epiteliales ductales, la paciente 28 (Fig. 19 A y B) presenta un CDI indiferenciado con una tinción 3+ para este macador, en la Figura 19 B se observan las células tumorales rellenando la luz de un conducto. La paciente 36 (Fig. 19 C) presenta un CM también con una tinción 3+. En la paciente 27 (Fig. 19 D) se observa una diferenciación moderada del tejido tumoral y no se presentan bien definidos los conductos.

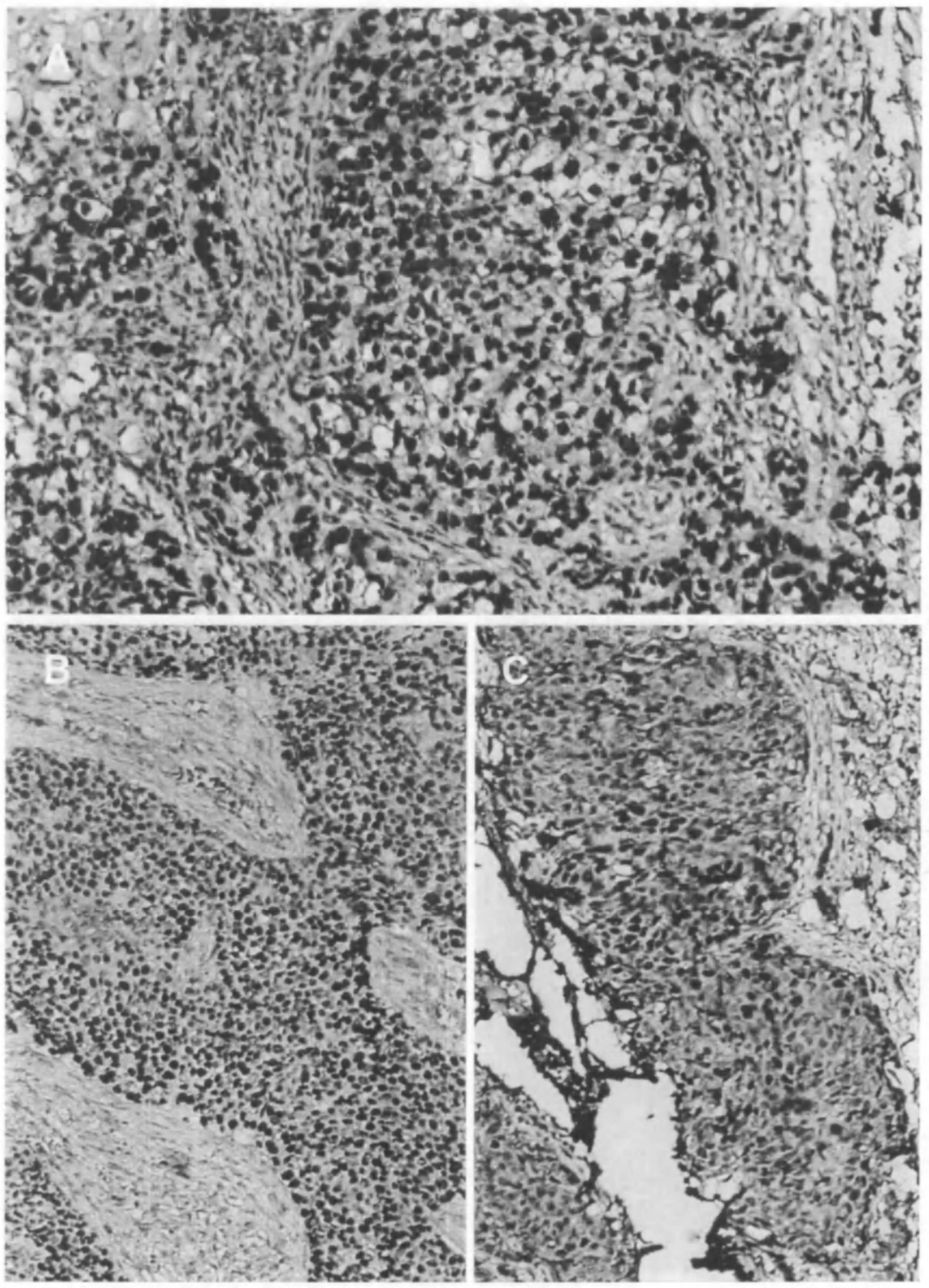

Figura 18: Expresión de p53 en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama. Inmunoreactividad nuclear de células tumorales de mama marcadas por inmunohistoquímica con anti-p53 en cortes de tejidos fijados y embebidos en parafina de 27 pacientes. A: paciente 17; B: paciente 34 y C: paciente 14. Las fotos se tomaron con un aumento x40 y x20.

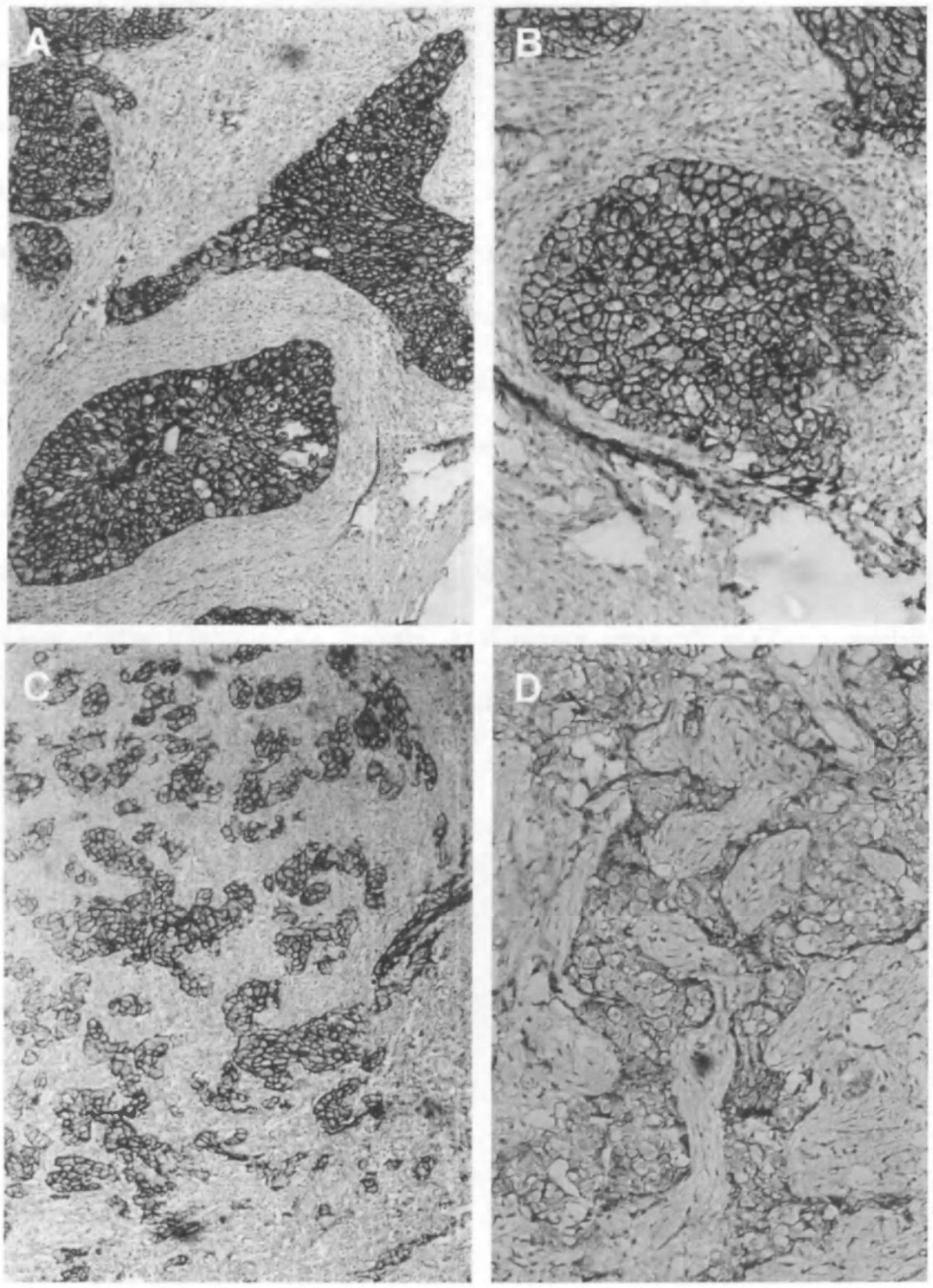

Figura 19: Expresión de Her-2 en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama. Inmunoreactividad de membranas citoplasmáticas de células tumorales de mama marcadas por inmunohistoquímica con anti-Her-2 (Hercep Test) en cortes de tejidos fijados y embebidos en parafina de 27 pacientes. A y B: paciente 28; C: paciente 36 y D: paciente 27. Las fotos se tomaron con un aumento x40 y x20.

Se determinó también por inmunohistoquímica, la expresión de Ki67 en 24 pacientes; su expresión se clasificó en positiva o negativa según el por ciento de células marcadas; una tinción mayor al 20% se consideró positiva e indicativa de alta actividad proliferativa. La expresión de Ki67 resultó positiva en 7 de las muestras analizadas (Tabla 5). Su inmunorreactividad se observó en el núcleo de las células tumorales de la mama que se encuentran proliferando (Fig. 20). Las pacientes 33 (Fig. 20 A) y 31 (Fig. 20 B) muestran un CDI de grado II y III respectivamente, en el primer caso (paciente 33) la inmunorreactividad se presenta en islotes de células poco diferenciadas (anaplásicas) que se encuentran rellenando el conducto mientras que en el segundo caso (paciente 31) se observan células proliferantes marcadas que se encuentran infiltrando el estroma. La paciente 36 (Fig. 20 C y D) muestra un índice de proliferación más elevado por presentar mayor intensidad de marcaje y mayor por ciento de células marcadas, la inmunoreactividad se observa en las células infiltrantes que se encuentran proliferando.

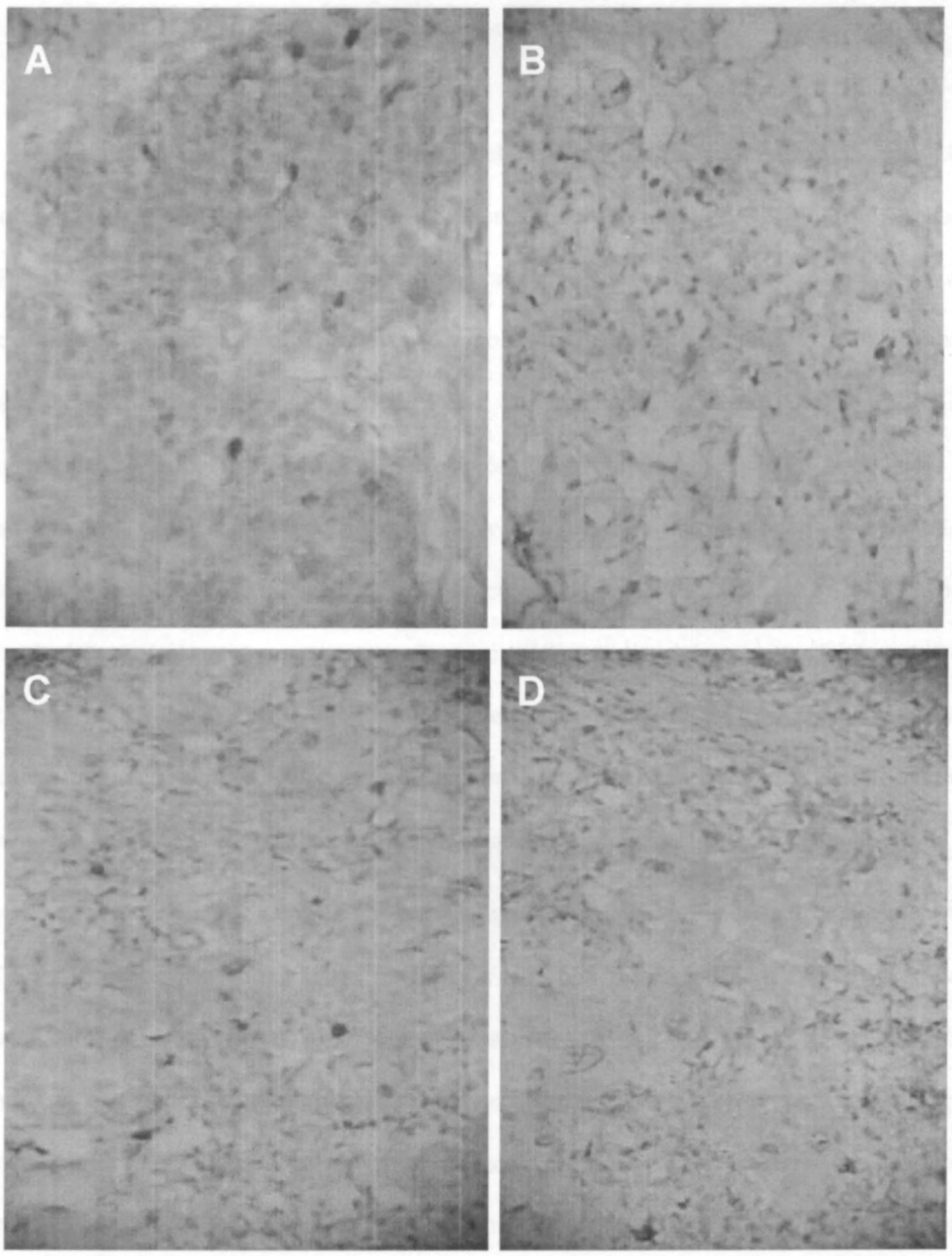

Figura 20: Expresión de Ki67 en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama. Inmunoreactividad nuclear de células tumorales de mama proliferantes, marcadas por inmunohistoquímica con anti-Ki67 en cortes de tejidos fijados y embebidos en parafina de 24 pacientes. A: paciente 33; B: paciente 31; C y D: paciente 36. Las fotos se tomaron con un aumento x20.

6.2.1 Asociaciones entre los Diferentes Marcadores Tumorales

Se analizó la asociación entre el RE y el resto de los marcadores estudiados. La sobreexpresión de p53 concuerda con una pérdida de expresión de RE, de los 14 casos positivos para RE, 12 resultaron negativos para p53, estos hallazgos corroboraron los resultados obtenidos por otros autores (Coppola *et al.*, 1999; Megha *et al.,* 2002). Se ha establecido que la sobreexpresión de Her-2 coincide con RE negativo (Ellis, 2004); nuestros resultados muestran una correlación inversa entre RE y Her-2, de las 11 pacientes positivas a Her-2, 7 fueron negativas a RE. Una correlación directa ha sido previamente establecida entre Bcl-2 y RE en cáncer de mama (Sjostrom *et al.*, 2002), los resultados aquí obtenidos mostraron una asociación estadísticamente significativa entre RE y Bcl-2 (p=0.004), en la cual todos los casos positivos a RE (14 pacientes) también resultaron positivos a Bcl-2. La misma relación directa fue observada entre RE y Bax, de las 14 pacientes que expresaron RE, 13 expresaron Bax.

La relación observada entre RPg y el marcador Her-2 es similar a la observada entre RE y Her-2; de las 11 pacientes positivas a Her-2, 8 resultaron negativas a RPg. La asociación de este receptor hormonal con los marcadores Bcl-2 y Bax, resultó directa pero no estadísticamente significativa, teniendo que de los 8 casos positivos a RPg, todos resultaron positivos a ambos marcadores. RPg y p53 se asociaron de manera inversa, pero no significativa; de las 8 pacientes positivas a RPg, 7 resultaron negativas a p53.

Entre los receptores de estrógeno y progesterona se observó una relación directa y estadísticamente significativa (p=0.001); todas las pacientes positivas a RPg (8) fueron también positivas a RE.

La expresión de Bcl-2 está relacionada a la expresión de otros marcadores tumorales. Algunos autores han reportado fuerte expresión de Bcl-2 en tumores de mama negativos a p53 (Coppola *et al.*, 1999). En nuestro caso obtuvimos una asociación inversa estadísticamente significativa (p=0.001) observándose que de las 19 pacientes que fueron negativas a p53, 18 (94.7%) resultaron positivas a Bcl-2. Se ha reportado previamente una interacción positiva entre Bcl-2 y Bax y se ha sugerido por otros autores que el análisis de ambos marcadores es más informativo (Yang *et al.*, 2000, Martinez-Arribas *et al.*, 2003). En nuestro caso sin embargo, esta relación fue directa pero no estadísticamente significativa; de las 24 pacientes que fueron positivas para Bax, 19 también fueron positivas para Bcl-2.

La asociación entre Bax y p53 resultó inversa pero no estadísticamente significativa, teniendo que de las 24 pacientes que marcan positivas a Bax, hay 17 que marcan p53 negativo.

La expresión de p53 y Her-2 se ha analizado como factor pronóstico en el cáncer de mama; sin embargo la significación pronóstica de la coexpresión de ambos marcadores permanece en controversia (Tsutsui *et al.*, 2003). En nuestro estudio, obtuvimos una relación inversa, pero no significativa entre ambos; de los 11 casos que fueron positivos para Her-2, sólo 3 sobreexpresaron p53.

Her-2 es capaz de inhibir la apoptosis inducida por Tamoxifen *in vitro.* Se ha reportado sobrexpresión de los genes bcl-2 y bcl-xl por sobreexpresión de Her-2

(Gomez-Navarro *et al.,* 1999). Obtuvimos una interacción directa pero no significativa entre Her-2 y Bcl-2 en los tumores; de las 11 pacientes positivas para Her-2, 8 sobrexpresaron Bcl-2.

6.2.2 Relación entre Marcadores Tumorales y Factores Pronósticos Clásicos

Estudiamos la asociación de los marcadores tumorales, Bcl-2, Bax, p53 y Her-2 con la expresión de factores pronósticos tales como: el estado de los receptores hormonales, el grado nuclear y la expresión del marcador de proliferación Ki67.

En nuestro trabajo, tanto el tamaño tumoral como la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos axilares, resultan ser variables controladas debido a los criterios de inclusión que se tomaron en cuenta para el reclutamiento de las pacientes, de modo que la relación entre el resto de los marcadores y estos dos factores va a estar afectada por las características de la muestra.

Las pacientes fueron agrupadas teniendo en cuenta la expresión de los marcadores tumorales y ambos receptores hormonales. Los marcadores Bax, p53 y Her-2 se observaron sobreexpresados en pacientes negativas a ambos receptores hormonales; de los 12 casos negativos a ambos receptores, 11 expresaron Bax y 7 Her-2. El 83.3% de los casos que expresaron p53, no expresaron sus receptores hormonales. La expresión de Bcl-2 está asociada de manera significativa con la de los receptores hormonales ($p=0.034$) (Fig. 21).

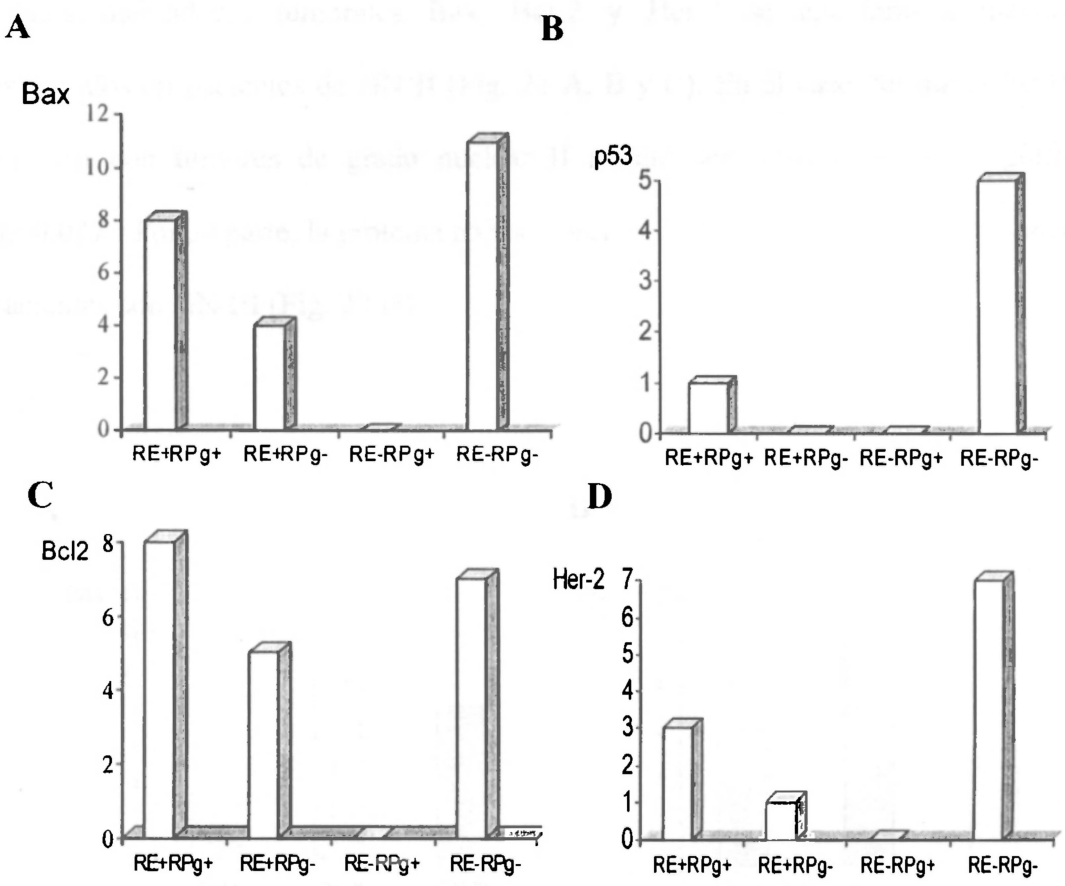

Figura 21: Relación entre la expresión de marcadores tumorales y el estado de los receptores hormonales. Se estudió la asociación de la expresión de los marcadores, Bax, Bcl2, p53 y Her-2; con la presencia de RE y RPg en los tumores de pacientes con cáncer de mama, determinados por el método de IHQ en fragmentos de tejidos fijados y embebidos en parafina. A: Relación entre la expresión de Bax y los receptores hormonales; B: Relación entre la expresión de p53 y los receptores hormonales; C: Relación entre la expresión de Bcl2 y los receptores hormonales, esta asociación resultó significativa; D: Relación entre la expresión de Her-2 y los receptores hormonales.

Los marcadores tumorales Bax, Bcl-2 y Her-2 se encontraron mayormente expresados en pacientes de GN II (Fig. 22 A, B y C). En el caso del marcador Bax su relación con tumores de grado nuclear II resultó ser estadísticamente significativa (p=0.027). Por su parte, la proteína p53 se observó sobreexpresada fundamentalmente en pacientes con GN III (Fig. 22 D).

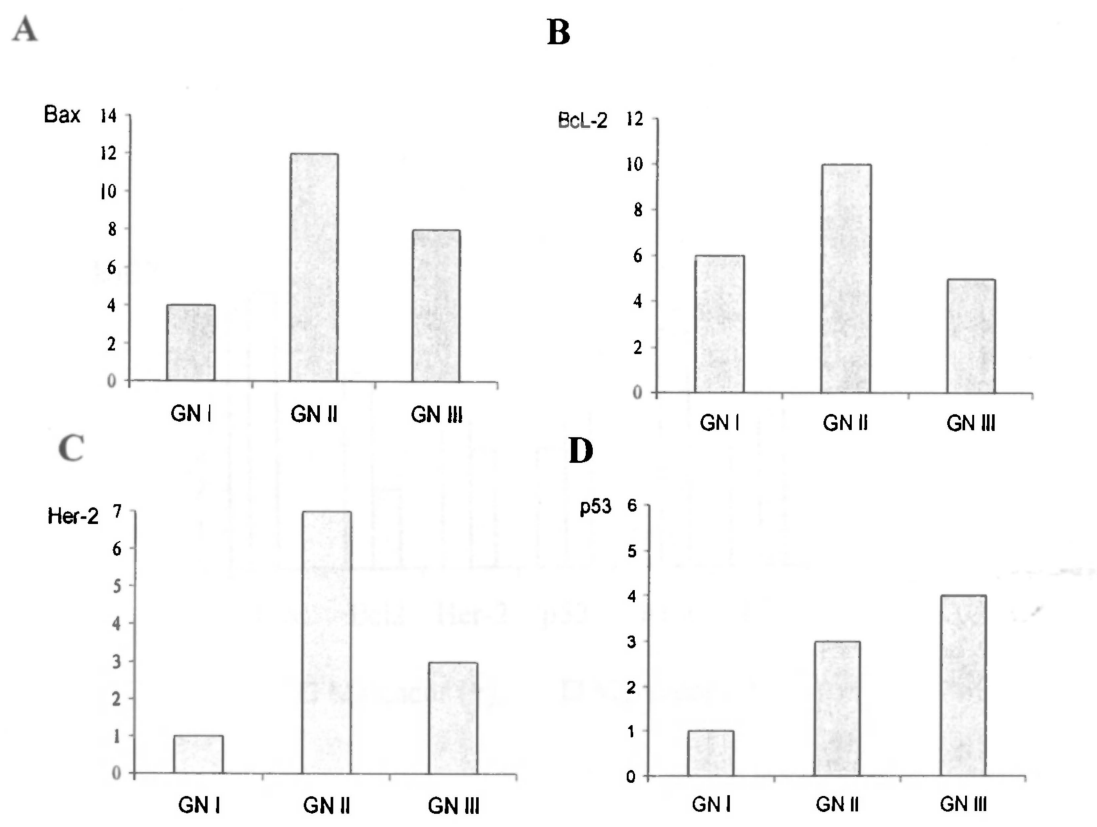

Figura 22: Relación entre la expresión de marcadores tumorales y el grado nuclear del tumor en pacientes con cáncer de mama. Se estudió la asociación de los marcadores tumorales, determinados por el método de inmunohistoquímica, con el grado nuclear de los tumores en las pacientes incluidas en nuestro estudio. A: Relación entre la expresión de Bax y el GN, esta asociación resultó significativa; B: Relación entre la expresión de Bcl2 y el GN; C: Relación entre la expresión de Her-2 y el GN; D: Relación entre la expresión de p53 y el GN.

El receptor Bax está positivamente asociado a Ki67, todos los pacientes que expresaron el marcador de proliferación, expresaron a su vez Bax; no obstante, esta asociación no fue estadísticamente significativa. En el caso de Bcl-2, el 71.4% de las pacientes (5/7) que expresaron Ki67, expresaron el marcador de apoptosis. Contrariamente, observamos una asociación negativa entre la expresión de Ki67 y RPg, donde el 85.7% de las pacientes (6/7) que expresaron Ki67, no expresaron RPg (Fig. 23).

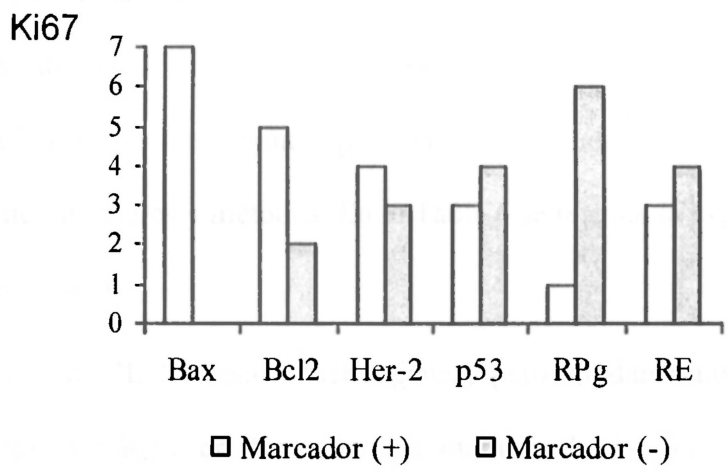

Figura 23: Asociación entre la expresión de marcadores tumorales y Ki67. Se estudió la asociación de la expresión de los marcadores, Bax, Bcl2, p53 y Her-2, RE y RPg con el marcador de proliferación Ki67, en tumores de pacientes con cáncer de mama, determinados por el método de IHQ en fragmentos de tejido fijados y embebidos en parafina. Las barras de color gris se refieren a la frecuencia de casos negativos al marcador indicado y las barras en blanco a los casos positivos; todos en asociación a Ki67.

6.3 Expresión de IL-10 en Muestras de Tumor Determinada por Inmunohistoquímica

Es conocido que IL-10 ejerce un efecto inhibitorio en la función de las células T, inhibe su proliferación y se ha asociado con la inducción de anergia en linfocitos T; además, es capaz de inhibir la presentación de antígenos por las células APC y de antígenos tumor-asociados por las células del tumor. Estas características hacen de esta interleucina un factor supresor de la respuesta inmune. Por estas razones es importante conocer su expresión en el microambiente tumoral en pacientes con cáncer de mama.

La expresión de IL-10 se determinó por el método de inmunohistoquímica en fragmentos de tumor de 27 pacientes, fijados y embebidos en parafina. La inmunotinción se clasificó según el por ciento de células marcadas, como se describe en la sección de materiales y métodos. En la Tabla 6 se resume la expresión de IL-10 en las muestras analizadas.

La tinción de IL-10 resultó heterogénea, pero fundamentalmente se observó un marcaje citoplasmático en las células tumorales de la mama y en los linfocitos infiltrantes, sólo en casos aislados se obtuvo un marcaje nuclear, lo cual, pudiera ser debido a la presencia de una proteína homóloga a la IL-10 proveniente del virus Epstein Barr (Huang *et al.*, 1999). En el 85.2% de las pacientes (23/27) se observó la presencia de la proteína IL-10 en el tejido tumoral.

La Figura 24 muestra un ejemplo de la tinción de IL-10 en el tejido tumoral de 4 pacientes representativas. La paciente 16 (Fig. 24 A) muestra un tumor de citoplasma apocrino con una tinción moderada en más del 90% de las células tumorales. La paciente

29 (Fig. 24 B) muestra una infiltración del estroma fibroso, con una tinción intensa en más del 85% de las células tumorales. En ambos casos se presenta la formación de estructuras ductales en algunas áreas, la tinción es de apariencia granular y se observan linfocitos focalmente marcados. En las pacientes 30 (Fig. 24 C) y 37 (Fig. 24 D) se observa un marcaje intenso en más del 90% de las células tumorales; la paciente 30 muestra un tumor de moderada diferenciación, donde no se observa la formación de conductos y el marcaje es de apariencia granular; la paciente 37 muestra una foto panorámica del tejido tumoral (CDI).

Tabla 6

Expresión de IL-10 (determinada por inmunohistoquímica) en las muestras de tumor

Paciente	Grado de tinción IHQ de IL-10
4	4+
5	4+
8	4+
12	4+
13	4+
14	4+
15	0
16	4+
17	4+
18	4+
19	4+
20	3+
21	0
22	4+
24	4+
25	0
26	3+
27	4+
28	4+
29	4+
30	4+
31	4+
32	0
33	4+
34	4+
36	4+
37	4+

La clasificación de la tinción se realizó según se describe en el texto

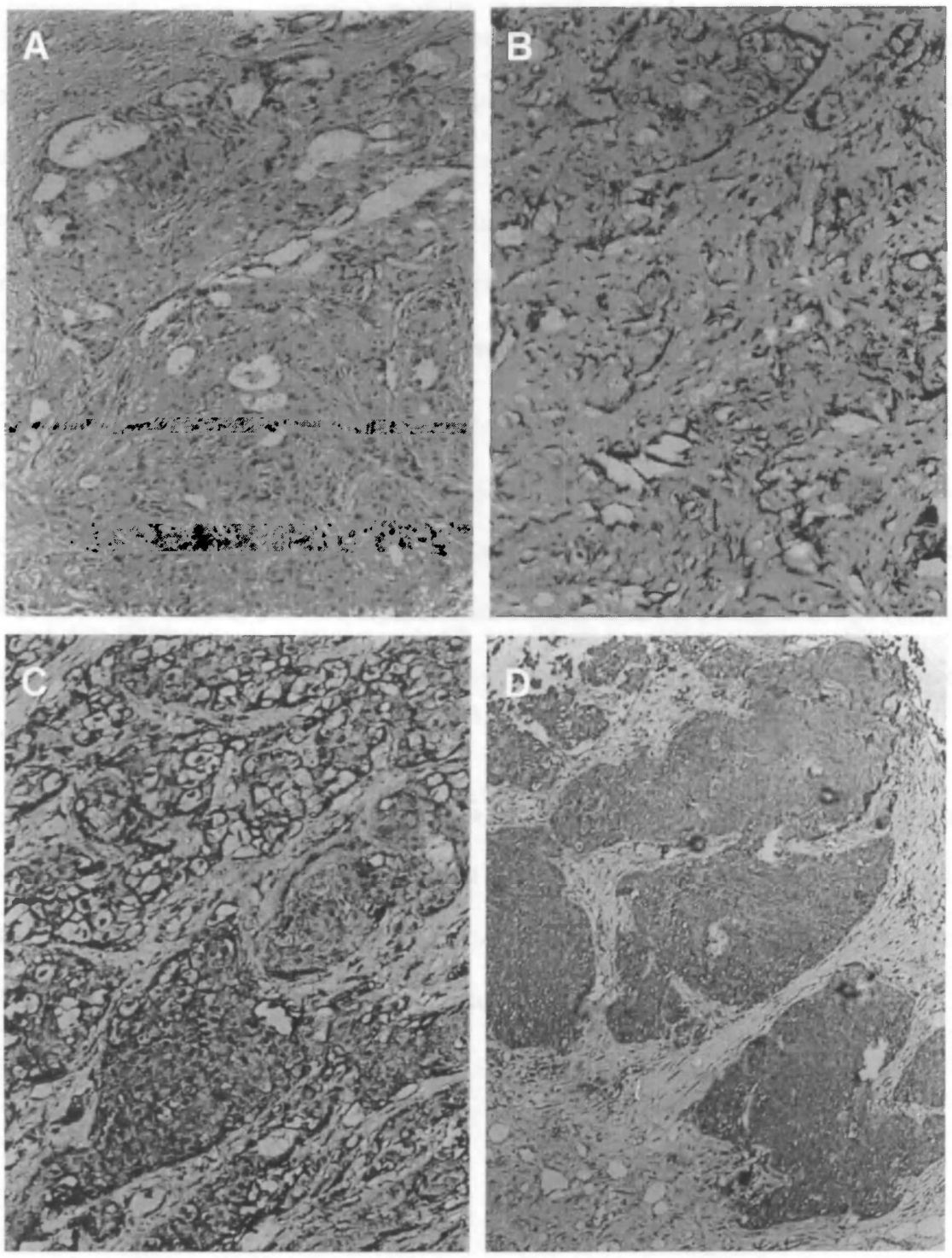

Figura 24: Expresión de IL-10 en el tejido tumoral en pacientes con cáncer de mama. Inmunoreactividad citoplasmática de células tumorales de mama marcadas por inmunohistoquímica con anti-IL-10 en cortes de tejidos fijados y embebidos en parafma de 27 pacientes. A: paciente 16; B: paciente 29; C: paciente 30 y D: paciente 37. Las fotos se tomaron con un aumento x40 y x20.

6.3.1 Relación entre la Expresión de IL-10 y los Marcadores Tumorales y Factores Pronósticos

Teniendo en cuenta la elevada expresión de IL-10 en el microambiente tumoral de más del 50% de las pacientes y debido a que es una citocina supresora de la respuesta inmune, resultó importante determinar la relación de esta interleucina con marcadores tumorales y factores pronósticos de la lesión, para conocer si la agresividad del tumor se encontraba asociada a la presencia de factores supresores a nivel local, en pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales de la enfermedad.

La relación entre IL-10 y los marcadores tumorales se muestra en la Tabla 7. Se observó una asociación estadísticamente significativa entre IL-10 y Bax (p=0.001); las 22 pacientes positivas a IL-10, resultaron positivas a Bax. La relación de IL-10 con Bcl-2 también fue directa, pero no significativa. Contrariamente, se observó una relación inversa entre IL-10 y p53, de los 23 casos positivos a IL-10, 17 (73.9%) resultaron negativos a p53.

IL-10 se relacionó positivamente con los receptores hormonales; de las 14 pacientes que marcaron RE positivo, 12 fueron positivas a IL-10 y de las 8 pacientes positivas a Rpg, todas resultaron positivas a IL-10. Se observó también una asociación directa entre IL-10 y Her-2; de los 11 casos positivos a Her-2, 10 resultaron positivos a IL-10.

Tabla 7

Relación entre IL-10 y los marcadores tumorales

Marcador		IL-10		TOTAL
		Negativo	Positivo	
RE	Negativo	2	11	13
	Positivo	2	12	14
	Total	4	23	27
		$\chi^2 = 0.006$	p = 0.936	
Bax	Negativo	2	0	2
	Positivo	2	22	24
	Total	4	22	26
		$\chi^2 = 11.917$	p = 0.001*	
Her-2	Negativo	3	13	16
	Positivo	1	10	11
	Total	4	23	27
		$\chi^2 = 0.482$	p = 0.488	
p53	Negativo	2	17	19
	Positivo	2	6	8
	Total	4	23	27
		$\chi^2 = 0.934$	p = 0.334	
Bcl-2	Negativo	1	5	6
	Positivo	3	18	21
	Total	4	23	27
		$\chi^2 = 0.021$	p = 0.885	
RPg	Negativo	3	14	17
	Positivo	0	8	8
	Total	3	22	25
		$\chi^2 = 1.604$	p = 0.205	

Los resultados expresan el número de pacientes

* Asociación estadísticamente significativa

La figura 25 ilustra la relación de IL-10 con los factores pronósticos analizados. IL-10 se expresó fundamentalmente en tumores de grado nuclear II y III (Fig. 25 A) y esta relación resultó ser estadísticamente significativa (p=0.02). A pesar de su relación con los receptores hormonales por separado, IL-10 se encontró altamente expresada en tumores negativos a receptores hormonales; de los 12 casos negativos a ambos receptores, 10 expresan IL-10 (Fig. 25 B). Esta interleucina mostró una asociación positiva con el marcador de proliferación Ki67; todas las pacientes positivas a Ki67 resultaron positivas a IL-10 (Fig. 25 C).

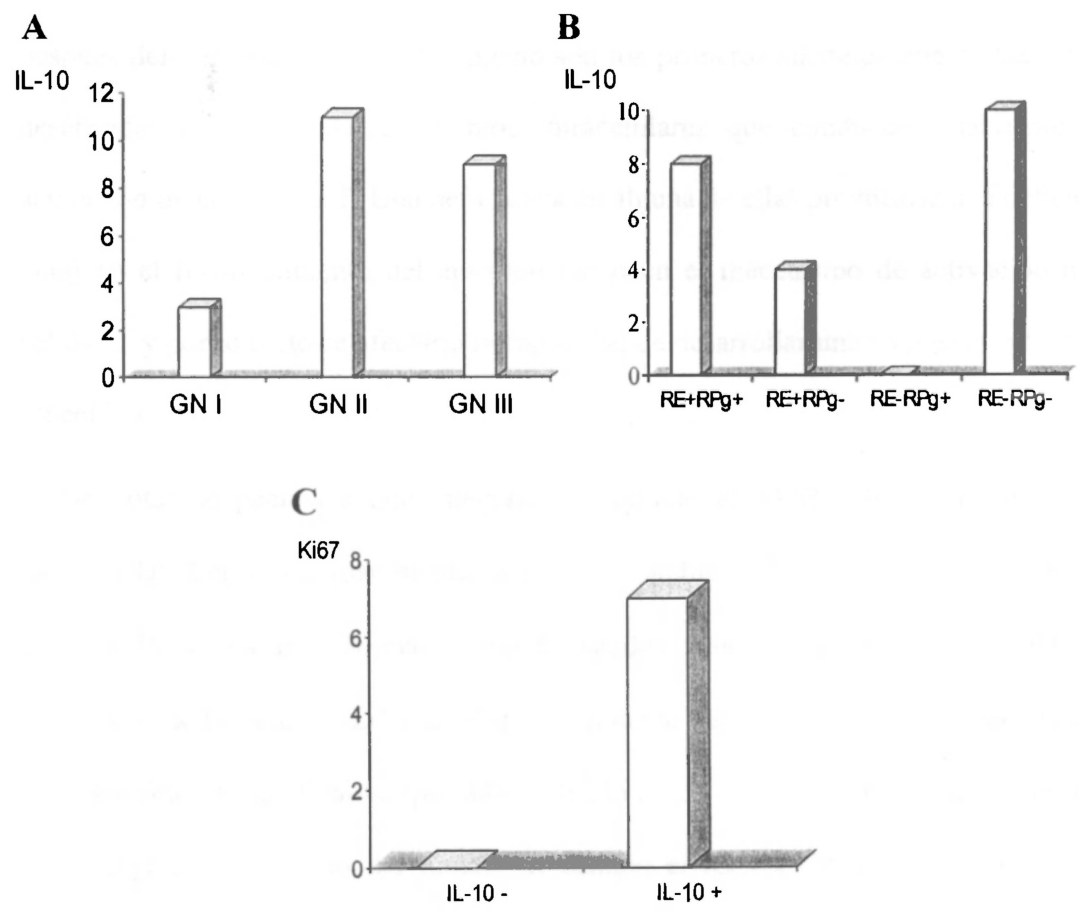

Figura 25: Relación de la expresión de IL-10 con factores pronósticos del tumor. IL-10, RE, RPg y Ki67 se determinaron por IHQ en fragmentos de tumor fijados y embebidos en parafina. A: Relación de IL-10 con el GN, B: Relación de IL-10 con el estado de los receptores hormonales, C: Relación de IL-10 con la expresión del marcador de proliferación Ki67.

6.4 Expresión de Proteínas de Activación de Linfocitos T

6.4.1 Expresión de CD3-ζ y CD3-ε en Tumores y Ganglios Linfáticos

La expresión de los polipeptidos CD3-ζ y CD3-ε se determinó mediante la técnica de Western Blot. La importancia de las cadenas CD3-ζ y CD3-ε radica en dos razones fundamentales; en primer lugar, su síntesis es imprescindible para el ensamblaje del TCR y por lo tanto para lograr su expresión en la superficie celular. En segundo lugar, después del reconocimiento del antígeno son los primeros sustratos que se fosforilan y desencadenan la cascada de eventos intracelulares que conducen finalmente a la activación de las células T. Una deficiencia en alguna de ellas provocaría una deficiencia tanto en el reconocimiento del antígeno como en el mecanismo de activación de las células T y por lo tanto se afectaría la capacidad de desarrollar una respuesta antitumoral específica.

Del total de pacientes que integran este estudio el 33.3% (10/30) no expresó la cadena CD3-ζ en su microambiente tumoral, en cambio el 90% (27/30) la expresó en sus ganglios linfáticos, esta diferencia resultó estadísticamente significativa (p=0.028). La deficiencia de la cadena CD3-ε en el microambiente tumoral fue más marcada y también estadísticamente significativa (p=0.003), debido a que el 53.3% (16/30) de las pacientes no la expresó en el sitio del tumor, en cambio el 83.3% (25/30) la expresó en sus ganglios linfáticos no mestastásicos. La expresión de las cadenas CD3-ε y CD3-ζ se resume en la Tabla 8.

Tabla 8

Expresión de los polipéptidos de CD3-ε y CD3-ζ

Paciente	CD3-ε (T)	CD3-ε (G)	CD3-ζ (T)	CD3-ζ (G)	CD2 (T)	Actina (T y G)
1	+	+	+	+	+	+
4	-	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
7	-	+	+	-	+	+
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+
13	-	+	-	+	+	+
14	-	+	+	-	+	+
15	-	+	-	+	+	+
16	+	+	-	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
19	+	-	+	-	+	+
20	-	+	+	+	+	+
21	-	+	-	+	+	+
22	-	+	-	+	+	+
24	-	+	-	+	+	+
25	-	+	-	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+
27	-	+	-	+	+	+
28	-	+	+	+	+	+
29	-	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+
31	-	-	+	+	+	+
32	-	-	-	+	+	+
33	-	+	+	+	+	+
34	+	-	-	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+
37	+	-	+	+	+	+

T: muestras de tumor

G: muestras de ganglios linfáticos regionales no metastásicos

La Figura 26 (A y B) muestra la expresión de las cadenas ζ y ε en el microambiente del tumor y en los ganglios linfáticos regionales en un grupo de 13 pacientes. Es notable destacar que algunas pacientes expresaron los polipéptidos en sus ganglios pero no en sus tumores (pacientes 21-25 y 27, Fig 26 A y B). Otras pacientes expresaron CD3-ζ (pacientes 26, 28-31 y 33, Fig. 26 A) y CD3-ε (pacientes 26 y 30; Fig. 26 B) en ambos microambientes. En casos aislados la expresión de los polipepetidos estuvo restringida a los tumores (paciente 34, Fig. 26 B). Finalmente, en diez pacientes la expresión conjunta de CD3-ζ y CD3-ε coincidió en sus muestras de ganglios y tumores.

En todas las muestras de tumor la presencia de linfocitos se verificó mediante el marcador de células T, CD2 (Fig. 26 C). La detección del control de actina, tanto del tumor como de los ganglios, resultó exitosa en todas las muestras de tejido analizadas. En la Figura 26 D se observa un ejemplo de la expresión de CD2 en las muestras de tumor. Los tejidos sanos de mama no expresaron ninguna de las dos cadenas de CD3 estudiadas (Fig. 26 E).

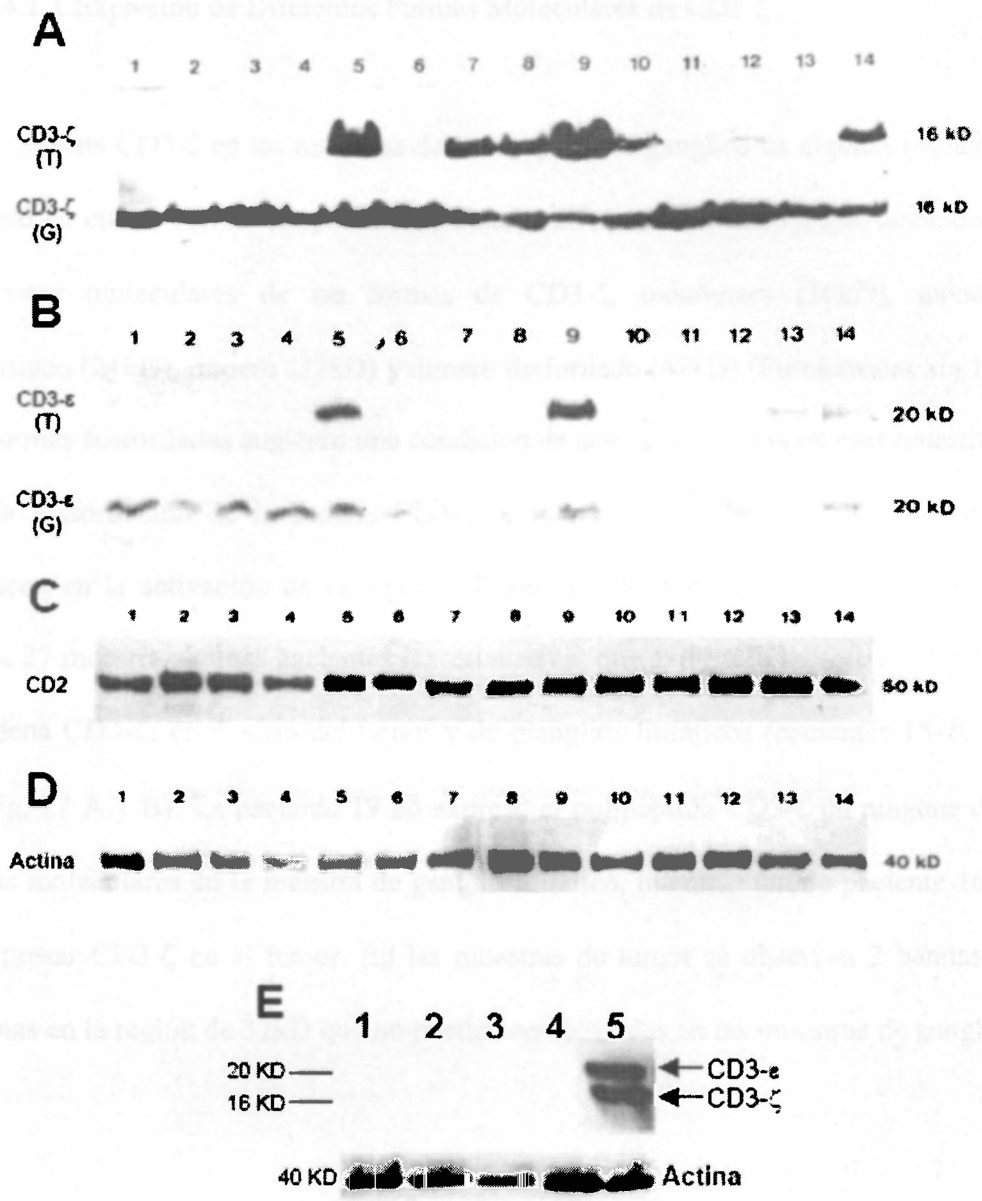

Figura 26: Expresión de las proteínas de activación linfocitaria CD3-ζ y CD3-ε en el microambiente tumoral y en ganglios linfáticos no metastásicos de pacientes con cáncer de mama. CD3-ζ y CD3-ε se determinaron por Western Blot, se usaron 20 μg de proteína por línea. Las líneas 1-13 representan los pacientes 21-34, la línea 14 representa el control de células MNP estimuladas con PHA. A: Expresión de la cadena ζ en los tumores (T) y en los ganglios (G); B: Expresión de la cadena ε en los tumores (T) y en los ganglios (G); C: Expresión del marcador linfocitario CD2 en las muestras de tumor como control de linfocitos; D: Expresión del control de actina en las muestras de tumor; E: Expresión de CD3-ζ y CD3-ε en tejidos normales de mama, las membranas se incubaron con anti-CD3-ζ y anti-CD3-ε al mismo tiempo. Las líneas 1-4 representan los tejidos sanos 1-4, la línea 5 representa el control de células MNP estimuladas con PHA. Se muestra el control de actina para cada tejido.

6.4.1.1 Expresión de Diferentes Formas Moleculares de CD3-ζ.

La cadena CD3-ζ en las muestras de tumor y en los ganglios de algunas pacientes se expresó en cuatro formas de pesos moleculares diferentes (Tabla 9), que coinciden con los pesos moleculares de las formas de CD3-ζ: monómero (16kD), monómero fosforilado (21kD), dímero (32kD) y dimero fosforilado (42kD) (Furukawa *et al.*, 1994). Las formas fosforiladas sugieren una condición de activación previa en esas muestras, ya que la fosforilación de la cadena CD3-ζ es uno de los primeros fenómenos que se producen en la activación de las células T después del reconocimiento antigénico. La Figura 27 muestra algunas pacientes representativas que expresaron diferentes formas de la cadena CD3-ζ; en el sitio del tumor y de glanglios linfáticos (pacientes 15-20, 36 y 37, Fig. 27 A y B). La paciente 19 no expresó el polipeptido CD3-ζ en ninguna de sus formas moleculares en la muestra de ganglio linfático, mientras que la paciente 16 dejó de expresar CD3-ζ en el tumor. En las muestras de tumor se observan 2 bandas muy cercanas en la región de 32kD que no pueden ser definidas en las muestras de ganglios.

Tabla 9

Expresión de diferentes formas moleculares de CD3-ζ en el tumor y en ganglios linfáticos regionales no metastásicos

	TUMORES				GANGLIOS			
Pacientes	**16kD**	**21kD**	**32kD**	**42kD**	**16kD**	**21kD**	**32kD**	**42kD**
1	-	-	+	+	+	+	+	+
4	-	-	+	+	-	-	+	+
5	-	-	+	+	-	-	+	-
7	-	-	+	+	-	-	-	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+
9	-	-	+	+	-	-	+	+
12	-	-	+	+	-	-	+	+
13	-	-	-	-	-	-	+	+
14	-	-	+	+	-	-	-	-
15	-	-	-	-	+	+	+	+
16	-	-	-	-	-	+	+	-
17	-	-	+	+	+	+	+	+
18	-	-	+	+	-	+	+	-
19	-	-	+	+	-	-	-	-
20	-	-	+	+	+	+	+	+
21	-	-	-	-	+	-	-	-
22	-	-	-	-	+	-	-	-
24	-	-	-	-	+	-	-	-
25	-	-	-	-	+	-	-	-
26	+	-	-	-	+	-	-	-
27	-	-	-	-	+	-	-	-
28	+	-	-	-	+	-	-	-
29	+	-	-	-	+	-	-	-
30	+	-	-	-	+	-	-	-
31	+	-	-	-	+	-	-	-
32	-	-	-	-	+	-	-	-
33	+	-	-	-	+	-	-	-
34	-	-	-	-	+	-	-	-
36	-	-	+	+	+	+	+	+
37	-	-	+	+	+	+	+	+

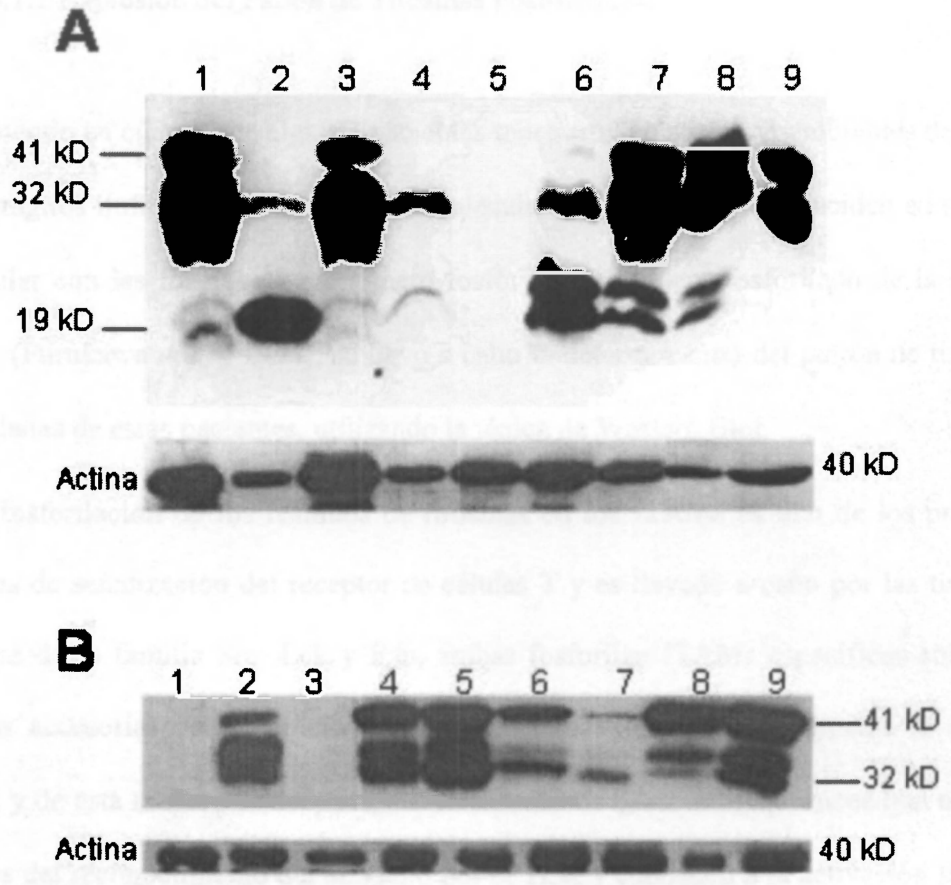

Figura 27: Expresión de diferentes formas moleculares de la cadena ζ en muestras de tumor y ganglios linfáticos no metastásicos de pacientes con cáncer de mama. CD3-ζ se determinó por Western Blot, se usaron 20 μg de proteína por línea. A: Expresión de CD3-ζ en ganglios linfáticos; las líneas 1-6, representan los pacientes 15-20, las líneas 7 y 8, los pacientes 36 y 37 y la línea 9, células MNP estimuladas con ConA. B: Expresión de CD3-ζ en tumores; línea 1 tejido sano de mama; líena 2, células MNP estimuladas con ConA; líneas 3-7, pacientes 16-20; líneas 8 y 9, pacientes 36 y 37. Se muestra el control de actina para cada línea.

6.4.1.2 Expresión del Patrón de Tirosinas Fosforiladas.

Teniendo en cuenta que algunas pacientes mostraron en sus microambientes de tumor y de ganglios linfáticos axilares formas moleculares de CD3-ζ que coinciden en su peso molecular con las formas de monómero fosforilado y dimero fosforilado de la cadena CD3-ζ (Furukawa *et al.*, 1994), se llevó a cabo la determinación del patrón de tirosinas fosforiladas de estas pacientes, utilizando la ténica de Western Blot.

La fosforilación de los residuos de tirosinas en los ITAMs es uno de los procesos iniciales de señalización del receptor de células T y es llevado a cabo por las tirosinas quinasas de la familia Src: Lck y Fyn, ambas fosforilan ITAMs específicos sobre las cadenas accesorias del complejo receptor de células T, fundamentalmente la cadena CD3-ζ y de esta manera se desencadena la cascada de eventos bioquímicos que ocurren después del reconocimiento del antígeno por el TCR y conducen a la activación final de los linfocitos T para la generación de una respuesta inmune efectora (Huang and Wange, 2004).

Se encontró un patrón de expresión de tirosinas fosforiladas en las muestras tanto de tumor como de los ganglios linfáticos regionales de las pacientes analizadas. La Figura 28 muestra la expresión de fosfoproteínas en un rango de 21, 41 y 75 kD en el microambiente de los ganglios linfáticos regionales y en los tumores de algunas pacientes representativas (ganglios de las pacientes: 16-18, 20 y 37 y tumores de las pacientes: 9,12,14, 18-20, 36 y 37). Estas bandas coinciden en su peso molecular con las observadas en las membranas que fueron incubadas con anti-CD3-ζ, las cuales mostraron pesos moleculares similares a las formas fosforiladas monomérica y dimérica

de la molécula de CD3-ζ. La muestra de ganglio linfático de la paciente 19 y el tejido normal de mama se utilizaron como controles negativos de la expresión de CD3-ζ (líneas 6 y 7 Fig. 28).

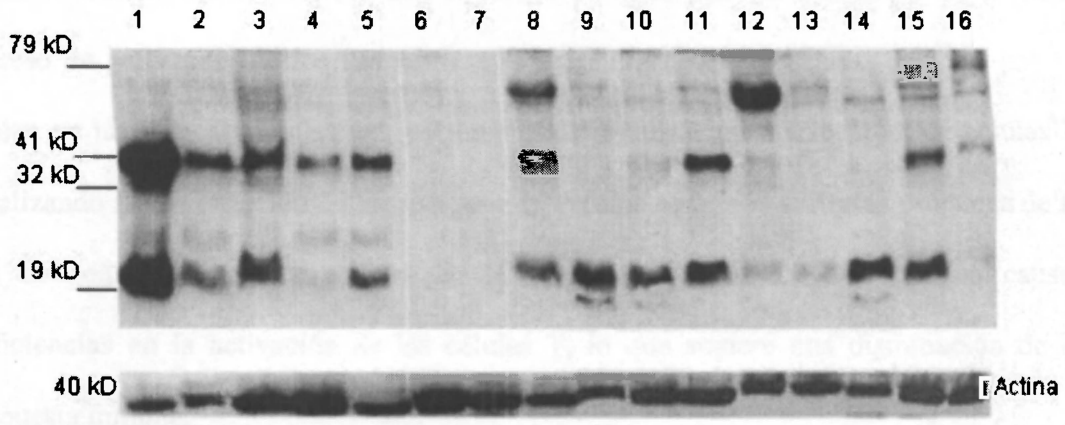

Figura 28: Expresión del patrón de tirosinas fosforiladas en muestras de tumores y ganglios linfáticos no metastásicos de pacientes con cáncer de mama. Las fosfoproteínas se determinaron por Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosinas; se utilizaron 20 μg de proteína por línea. Las líneas 1-6, muestras de ganglios de las pacientes: líneas 1-3, pacientes 16-18; línea 4, paciente 20; línea 5, paciente 37; línea 6, paciente 19; la línea 7 muestra tejido normal usado como control negativo. Las líneas 8-15, muestras de tumor de las pacientes: líneas 8-10, pacientes 9,12,14; líneas 11-13, pacientes 18-20; líneas 14 y 15, pacientes 36 y 37 y línea 16, células MNP estimuladas con ConA. Se muestra el control de actina para cada línea.

Estos resultados pudieran sugerir un estado de activación previa de los linfocitos presentes en ambos microambientes dado que, cuando se produce el reconocimiento del antigeno por el TCR ocurre la activación de la familia de las kinasas *src* y la fosforilación de las secuencias motivo de activación ITAM, en la cadena ζ y en otras cadenas de CD3.

6.4.2 Expresión de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en Tumores y Ganglios Linfáticos

Las proteínas tirosinas kinasas $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ fueron detectadas mediante la técnica de Western Blot en las muestras de tumor y de ganglios linfáticos no metastásicos de pacientes con cáncer de mama. La expresión de estas proteínas es importante en el proceso de activación de los linfocitos. Las proteínas tirosinas kinasas $p56^{lck}$ y actúan en las etapas iniciales del mecanismo de señalización del receptor de células T catalizando la fosforilación de los residuos de tirosina en varios sustratos proteicos de la vía de señalización. Alteraciones en la expresión de estas PTKs pueden causar deficiencias en la activación de las células T, lo que sugiere una disminución de la respuesta inmune.

La proteína $p56^{lck}$ se observó en el 50% (15/30) de las muestras de tumor de las pacientes mientras que el 96,7% (29/30) la expresó en sus ganglios linfáticos. Esta diferencia de expresión resultó estadísticamente significativa (p=0.000). En el caso de la diferencia de expresión entre los dos microambientes es menos marcada, solo el 42.8% (12/28) la expresó en el sitio del tumor y el 64.3% (18/28) en sus ganglios linfáticos. La Tabla 10 muestra la expresión de las proteínas $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en los tumores y en los ganglios linfáticos de las pacientes.

Tabla 10

Expresión de PTKs $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$

	$p56^{lck}$		$p59^{fyn}$		Actina
Paciente	**T**	**G**	**T**	**G**	**T y G**
1	+	+	+	+	+
4	-	+	ND	ND	+
5	+	-	+	-	+
7	-	+	-	+	+
8	+	+	ND	ND	+
9	+	+	+	+	+
12	-	+	+	+	+
13	-	+	-	+	+
14	-	+	-	+	+
15	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
17	-	+	-	-	+
18	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	-	+	-	+	+
21	-	+	-	-	+
22	-	+	-	-	+
24	-	+	-	+	+
25	+	+	+	+	+
26	+	+	-	-	+
27	+	+	+	+	+
28	-	+	-	+	+
29	+	+	-	-	+
30	+	+	+	+	+
31	-	+	-	-	+
32	-	+	-	-	+
33	-	+	-	-	+
34	-	+	-	-	+
36	+	+	-	+	+
37	+	+	+	+	+

ND: No Determinado, T: tumor y G: ganglios.

La Figura 29 ilustra la expresión de las PTKs en ambos microambientes en pacientes representativas. Algunas pacientes no expresan PTKs en el sitio del tumor, como las pacientes 21, 22 y 24 (Figura 29 A); en cambio sí expresan $p56^{lck}$ (pacientes 21, 22 y 24-27) y $p59^{fyn}$ (pacientes 24, 25 y 27) en sus ganglios linfáticos (Fig. 29 B). Igual comportamiento se observa en la Figura 30, que muestra otro grupo de pacientes representativas. La expresión de ambas quinasas no se detectó en los tejidos normales de mama analizados (Fig. 29 A y B y Fig. 30). El control de actina resultó exitoso en todas las muestras.

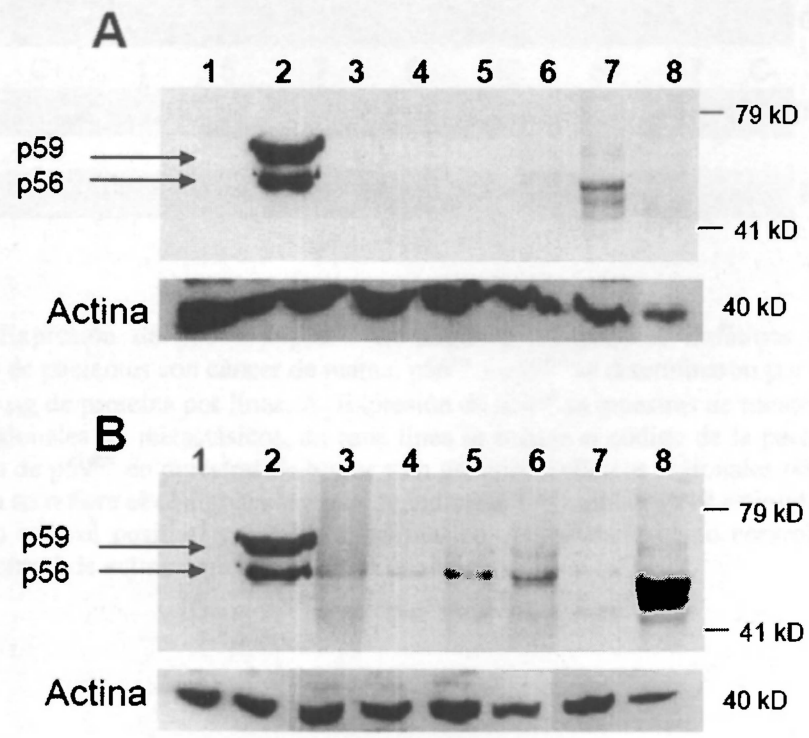

Figura 29: Expresión de PTKs $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en tumor y en ganglios linfáticos regionales no metastásicos de pacientes con cáncer de mama. $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ se determinaron por Western Blot, se usaron 20 µg de proteína por línea. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con anti-Lck y anti-Fyn al mismo tiempo. A: Expresión de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en tumor. Línea 1, tejido normal; línea 2, células MNP estimuladas con PHA; líneas 3 y 4 , pacientes 21 y 22; líneas 5 y 6, pacientes 24 y 25; líneas 7 y 8, pacientes 27 y 29. B: Expresión de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en ganglios linfáticos regionales no metastasicos. Línea 1, tejido normal; línea 2, células MNP estimuladas con PHA; líneas 3 y 4, pacientes 21 y 22; líneas 5-8, pacientes 24-27. Se muestra el control de actina para cada línea.

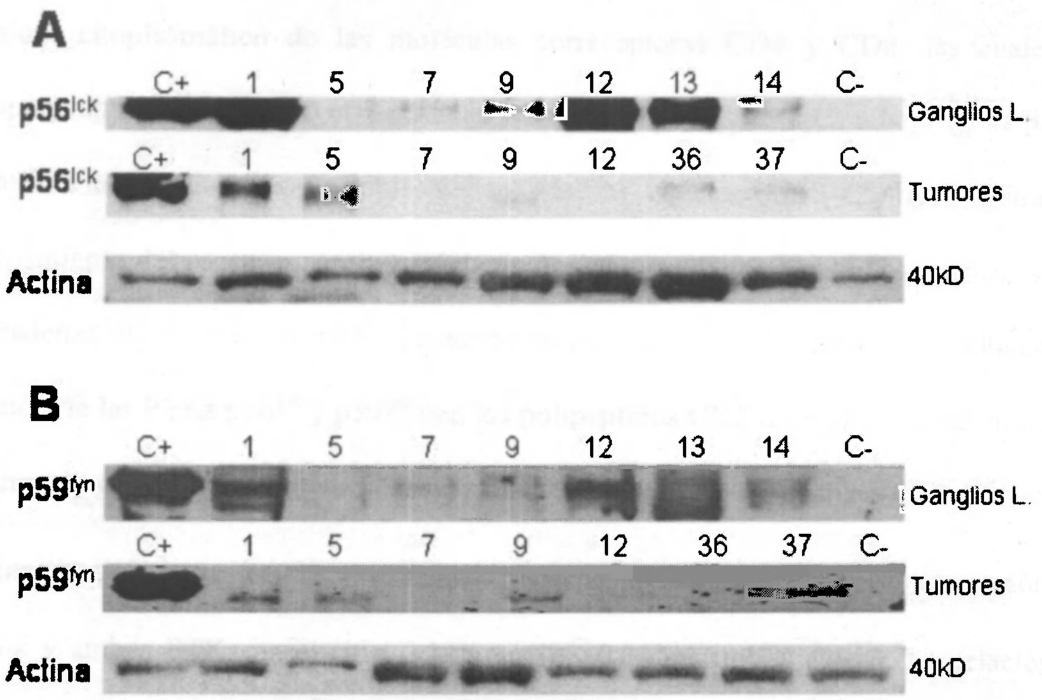

Figura 30: Expresión de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en tumor y en ganglios linfáticos regionales no metastásicos de pacientes con cáncer de mama. $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ se determinaron por Western Blot, se usaron 20 μg de proteína por línea. A: Expresión de $p56^{lck}$ en muestras de tumor y en ganglios linfáticos regionales no metastásicos, en cada línea se refiere el código de la paciente indicada. B: Expresión de $p59^{fyn}$ en muestras de tumor y en ganglios linfáticos regionales no metastasicos, en cada línea se refiere el código de la paciente indicada. C+, células MNP estimuladas con PHA usadas como control positivo y C-, tejido normal de mama usado como control negativo. Se muestra el control de actina para las muestras de tumor.

6.4.3 Asociación entre la Expresión de las PTKs y los Polipeptidos de CD3

Es conocido que la proteína $p56^{lck}$ se encuentra constitutivamente asociada al dominio citoplasmático de las moléculas correceptoras CD4 y CD8, las cuales se agrupan con el TCR cuando este se une a su ligando (peptido-MHC) y la proteína $p59^{fyn}$ se asocia a los dominios citoplasmáticos de las cadenas CD3-ε y CD3-ζ tras el agrupamiento del receptor. Ambas PTKs fosforilan secuencias ITAMs específicas sobre las cadenas accesorias del TCR. Teniendo en cuenta estas asociaciones estudiamos la relación de las PTKs $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ con los polipeptidos CD3-ε y CD3-ζ en las muestras de tumor y ganglios no metastásicos de pacientes con cáncer de mama.

Encontramos una asociación estadisticamente significativa entre la expresión de CD3-ε y ambas PTKs en el sitio del tumor ($p< 0.05$ en ambos casos). La relación de CD3-ζ en ambos microambientes y CD3-ε en los ganglios linfáticos con las PTKs no es estadísticamente significativa pero la mayoría de los pacientes que expresan $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ expresan los polipeptidos de CD3 (Tabla 11).

Tabla 11

Relación de la expresión de $p59^{fyn}$ y $p56^{lck}$ con la presencia de los polipeptidos CD3-ζ y CD3-ε en tumores y en ganglios.

A

$p59^{fyn}$ (T)	CD3-ε (T)*			CD3-ζ (T)		
	Neg	Pos	Total	Neg	Pos	Total
Neg	12	4	16	6	10	16
Pos	3	9	12	4	8	12
Total	15	13	28	10	18	28

B

$p59^{fyn}$ (G)	CD3-ε (G)			CD3-ζ (G)		
	Neg	Pos	Total	Neg	Pos	Total
Neg	3	7	10		10	10
Pos	2	16	18	3	15	18
Total	5	23	28	3	25	28

C

$p56^{lck}$ (T)	CD3-ε (T)*			CD3-ζ (T)		
	Neg	Pos	Total	Neg	Pos	Total
Neg	12	3	15	6	9	15
Pos	4	11	15	4	11	15
Total	16	14	30	10	20	30

D

$p56^{lck}$ (G)	CD3-ε (G)			CD3-ζ (G)		
	Neg	Pos	Total	Neg	Pos	Total
Neg		1	1		1	1
Pos	5	24	29	3	26	29
Total	5	25	30	3	27	30

* Asociación estadísticamente significativa. T: tumor y G: ganglio

6.4.4 Asociación de las Proteínas de Activación con los Marcadores Tumorales y Factores Pronósticos

Se ha discutido que la presencia de factores supresores y las anormalidades en la expresión de proteínas que se relacionan con la activación de los linfocitos T afectan la respuesta inmune contra el tumor a nivel local; por esta razón uno de los objetivos más importantes de este trabajo fue estudiar la relación entre estos parámetros inmunológicos y el estado del tumor, tomando en cuenta la expresión de importantes marcadores tumorales y factores pronósticos del tumor, en pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales de su enfermedad.

6.4.4.1 Asociación de CD3-ζ y CD3-ε con los Marcadores Tumorales y Factores Pronósticos.

En nuestro trabajo determinamos la asociación de las cadenas CD3-ζ y CD3-ε con los marcadores tumorales RE, RPg, Bcl-2, Bax, Her-2 y p53 (Tablas 12 y 13). No se observó asociación estadísticamente significativa entre CD3-ζ y CD3-ε, con los marcadores, en el tumor. No obstante; en el caso del marcador Bcl-2, se observó, que cuando este es positivo (21 pacientes), la mayoría de las pacientes resultan negativas a CD3-ε (13/21, 61.9%); mientras que para CD3-ζ un por ciento semejante (66.7%) resultaron positivas. Esta asociación entre la cadena ζ y Bcl-2 pudiera estar relacionada con la regulación del mecanismo de apoptosis a nivel local. En el caso de CD3-ε su expresión en el tumor no estuvo relacionada con una expresión diferencial del resto de

los marcadores tumorales estudiados. En cambio, la expresión de CD3-ζ fue más frecuente en pacientes que expresaron sus receptores hormonales.

No se observó asociación estadìsticamente significativa entre la expresión de las cadenas de CD3 presentes en los linfocitos de los ganglios y los marcadores del tumor. No obstante, un elevado por ciento de las pacientes coexpresaron los polipeptidos CD-ε y CD3-ζ y los marcadores Bcl-2 y Bax en sus ganglios (Tablas 12 y 13).

Tabla 12

Asociación de CD3-ζ y los marcadores tumorales

Marcador		CD3-ζ (T)		CD3-ζ (G)		Total
		Neg	Pos	Neg	Pos	
RE	Neg	6	7	0	13	13
	Pos	4	10	2	12	14
	Total	10	17	2	25	27
RPg	Neg	8	9	0	17	17
	Pos	1	7	2	6	8
	Total	9	16	2	23	25
Bax	Neg	2	0	0	2	2
	Pos	8	16	2	22	24
	Total	10	16	2	24	26
Her-2	Neg	6	10	1	15	16
	Pos	4	7	1	10	11
	Total	10	17	2	25	27
p53	Neg	6	13	1	18	19
	Pos	4	4	1	7	8
	Total	10	17	2	25	27
Bcl-2	Neg	3	3	0	6	6
	Pos	7	14	2	19	21
	Total	10	17	2	25	27

Los resultados expresan el número de pacientes. T: tumor, G: ganglios linfáticos no metastásicos

Tabla 13

Asociación de CD3-ε y los marcadores tumorales.

Marcador		CD3-ε (T)		CD3-ε (G)		Total
		Neg	Pos	Neg	Pos	
RE	Neg	8	5	2	11	13
	Pos	7	7	3	11	14
	Total	15	12	5	22	27
RPg	Neg	9	8	3	14	17
	Pos	4	4	1	7	8
	Total	13	12	4	21	25
Bax	Neg	2	0	0	2	2
	Pos	12	12	5	19	24
	Total	14	12	5	21	26
Her-2	Neg	8	8	2	14	16
	Pos	7	4	3	8	11
	Total	15	12	5	22	27
p53	Neg	10	9	3	16	19
	Pos	5	3	2	6	8
	Total	15	12	5	22	27
Bcl-2	Neg	2	4	1	5	6
	Pos	13	8	4	17	21
	Total	15	12	5	22	27

Los resultados expresan el número de pacientes. T: tumor, G: ganglios linfáticos no metastásicos

Se analizó la asociación de los polipéptidos CD3-ζ y CD3-ε con factores pronósticos tales como: el estado de los receptores hormonales, el grado nuclear y la expresión del marcador de proliferación Ki67.

La ausencia de expresión de las cadenas CD3-ζ y CD3-ε no se asoció significativamente con un incremento en el grado nuclear de los tumores. El polipeptido CD3-ζ en los tumores fue el único que estuvo mayormente expresado en casos que muestran sus dos receptores hormonales positivos (Tabla 14, Figura 31). Esto coincide con el resultado obtenido al comparar la expresión del polipeptido ζ con los receptores hormonales por separado (Tabla 12). Más del 50% de las pacientes que expresaron CD3-ε tanto en el tumor como en los ganglios estuvo distribuido entre los grupos RE+/Rpg+ y RE+/Rpg-. Por otra parte, el 72.7 y 73.7 % de los ganglios que expresaron los polipeptidos CD3-ζ y CD3-ε respectivamente, dejaron de expresar el marcador de proliferación Ki67 (Tabla 15).

Tabla 14

Expresión de CD3-ζ y CD3-ε en tumores y ganglios linfáticos no metastásicos con relación a la expresión de receptores hormonales

	CD3-ζ (T)	**CD3-ζ (G)**	**CD3-ε (T)**	**CD3-ε (G)**
RE+/Rpg+	7	6	4	7
RE+/Rpg-	3	5	3	4
RE-/Rpg+	0	0	0	0
RE-/Rpg-	6	12	5	10

T: Tumores G: Ganglios

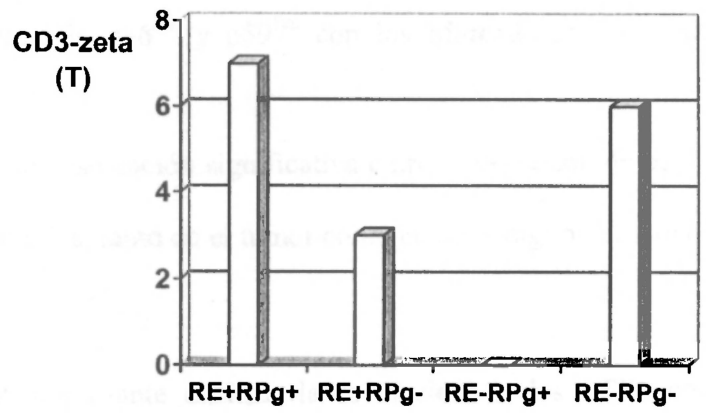

Figura 31: Asociación entre la expresión de CD3-ζ y receptores hormonales en tumores de pacientes con cáncer de mama. Se determinó la relación entre la expresión de la proteína de activación CD3-ζ y los receptores RE y RPg en fragmentos de tumor de las pacientes incluias en el estudio. CD3-zeta: CD3-ζ. T: tumor

Tabla 15

Expresión de CD3-ζ y CD3-ε en tumores y ganglios linfáticos no metastásicos con relación a la expresión de Ki67

	CD3-ζ (T)	**CD3-ζ (G)**	**CD3-ε (T)**	**CD3-ε (G)**
Ki67-	10	16	8	14
Ki67+	5	6	3	5
Total	15	22	11	19

T: muetras de tumor, G: muestras de ganglios

6.4.4.2 Asociación de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ con los Marcadores Tumorales y Factores Pronósticos.

No observamos una asociación significativa entre la expresión de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ con los marcadores tumorales, tanto en el tumor como en los ganglios linfáticos (Tablas 16 y 17).

También resultó importante analizar la asociación de las PTKs con los factores pronósticos: el estado de los receptores hormonales, el grado nuclear y la expresión del marcador de proliferación Ki67. La ausencia de expresión de las PTKs no se asoció significativamente con un incremento en el grado nuclear de los tumores. Sin embargo, la expresión de $p59^{fyn}$ en los microambientes de tumor y de ganglios regionales y de $p56^{lck}$ en el tumor fue mayor en pacientes que expresaron sus dos receptores hormonales. La asociación de $p59^{fyn}$ con la expresión de RE y RPg en el tumor resultó estadísticamente significativa (p=0.03) (Tabla 18 y Fig. 32). Las PTKs no se asociaron estadísticamente con el marcador de proliferación Ki67; no obstante, más del 60% de las pacientes que expresaron las PTKs en sus tumores y ganglios, no expresaron Ki67 (Tabla 19).

Tabla 16

Asociación de $p56^{lck}$ con los marcadores tumorales

Marcador		$p56^{lck}$ (T)		$p56^{lck}$ (G)		Total
		Neg	Pos	Neg	Pos	
RE	Neg	9	4	1	12	13
	Pos	5	9	0	14	14
	Total	14	13	1	26	27
Rpg	Neg	9	8	1	16	17
	Pos	3	5	0	8	8
	Total	12	13	1	24	25
Bax	Neg	1	1	0	2	2
	Pos	12	12	1	23	24
	Total	13	13	1	25	26
Her-2	Neg	8	8	1	15	16
	Pos	6	5	0	11	11
	Total	14	13	1	26	27
p53	Neg	8	11	1	18	19
	Pos	6	2	0	8	8
	Total	14	13	1	26	27
Bcl-2	Neg	3	3	0	6	6
	Pos	11	10	1	20	21
	Total	14	13	1	26	27

Los resultados expresan el número de pacientes. T: tumor, G: ganglios linfáticos no metastásicos

Tabla 17

Asociación de $p59^{fyn}$ con los marcadores tumorales

Marcador		$p59^{fyn}$ (T)		$p59^{fyn}$ (G)		Total
		Neg	Pos	Neg	Pos	
RE	Neg	9	3	7	5	12
	Pos	6	7	3	10	13
	Total	15	10	10	15	25
Rpg	Neg	9	7	7	9	16
	Pos	5	3	2	6	8
	Total	14	10	9	15	24
Bax	Neg	1	1	1	1	2
	Pos	14	9	9	14	23
	Total	15	10	10	15	25
Her-2	Neg	8	6	7	7	14
	Pos	7	4	3	8	11
	Total	15	10	10	15	25
p53	Neg	10	8	6	12	18
	Pos	5	2	4	3	7
	Total	15	10	10	15	25
Bcl-2	Neg	3	2	2	3	5
	Pos	12	8	8	12	20
	Total	15	10	10	15	25

Los resultados expresan el número de pacientes. T: tumor, G: ganglios linfáticos no metastásicos

Los resultados expresan el número de pacientes. T: tumor, G: ganglios linfáticos no metastásicos

Tabla 18

Expresión de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en tumores y ganglios linfáticos no metastásicos con relación a la expresión de receptores hormonales

	$p56^{lck}$ (T)	$p56^{lck}$ (G)	$p59^{fyn}$ (T) *	$p59^{fyn}$ (G)
RE+/Rpg+	5	8	3	6
RE+/Rpg-	4	5	4	4
RE-/Rpg+	0	0	0	0
RE-/Rpg-	4	11	3	5

* asociación estadísticamente significativa

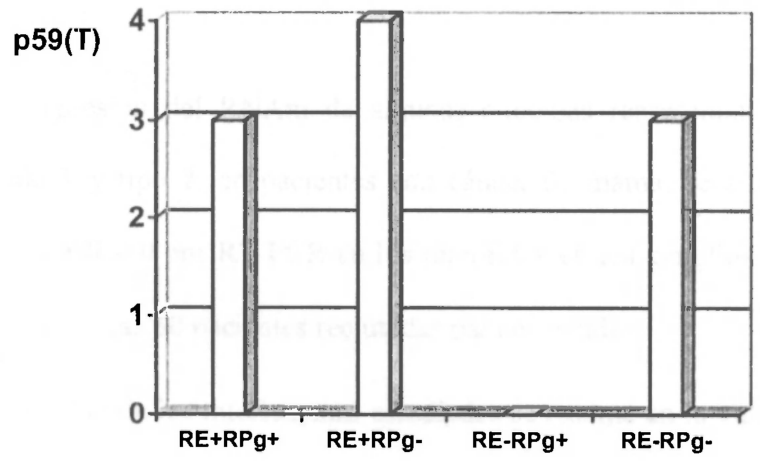

Figura 32: Asociación de la expresión de $p59^{fyn}$ y los receptores hormonales en tumores de pacientes con cáncer de mama. Se determinó la relación entre la expresión de la PTK $p59^{fyn}$ y los receptores RE y RPg en fragmentos de tumor de las pacientes incluias en el estudio. T: tumor.

Tabla 19

Expresión de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en tumores y ganglios no metastásicos con relación a la expresión de Ki67

	$p56^{lck}$ (T)	$p56^{lck}$ (G)	$p59^{fyn}$ (T)	$p59^{fyn}$ (G)
Ki67-	9	16	6	9
Ki67+	4	7	3	5
Total	13	23	9	14

6.5 Expresión de Citocinas en el Microambiente Tumoral y en Ganglios Linfáticos Regionales No Metastásicos

Para analizar la expresión del RNAm de algunas citocinas representativas de la respuesta inmune tipo 1 y tipo 2, en pacientes con cáncer de mama; se amplificó el RNAm de IL-2, IFN-γ e IL-10 por RT-PCR en los tumores y en los ganglios linfáticos axilares no metastásicos de las 30 pacientes reclutadas para el estudio.

La expresión del RNAm de las interleucinas estudiadas se resume en la Tabla 20. La Figura 33 A y B ilustra los productos amplificados de las citocinas en algunas pacientes representativas tanto en las muestras de tumor como en los ganglios linfáticos axilares. En contraste al patrón de citocinas observado en las pacientes; IL-2, IFN-γ e IL-10, no fueron detectadas en ninguno de los tejidos normales de mama analizados (Fig. 33 C), lo

cual coincide con reportes de otros autores (Venetsanacos *et al.*, 1997). La amplificación de G3PDH resultó exitosa en todas las muestras de tejido.

Tabla 20

Expresión de citocinas en los microambientes del tumor y de ganglios linfáticos regionales no metastásicos.

Paciente	IL-10 (T)	IL-2 (T)	IFN-γ (T)	IL-10 (G)	IL-2 (G)	IFN-γ (G)
1	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-
7	-	-	-	-	+	-
8	-	-	-	-	+	-
9	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	+	-
13	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	+	+
15	+	+	-	-	-	-
16	+	+	-	-	+	-
17	+	+	-	-	-	-
18	+	+	-	-	+	+
19	+	-	-	-	-	-
20	+	+	-	-	-	-
21	-	+	-	-	-	-
22	+	-	-	+	-	-
24	+	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
26	+	+	-	+	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	+	-	-	+	+	-
29	-	-	-	-	+	-
30	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	+	-
32	-	-	-	+	+	-
33	+	+	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-
36	+	-	-	+	+	+
37	+	-	-	+	+	+

(T): expresión en el microambiente tumoral

(G): expresión en el microambiente de los ganglios linfáticos axilares

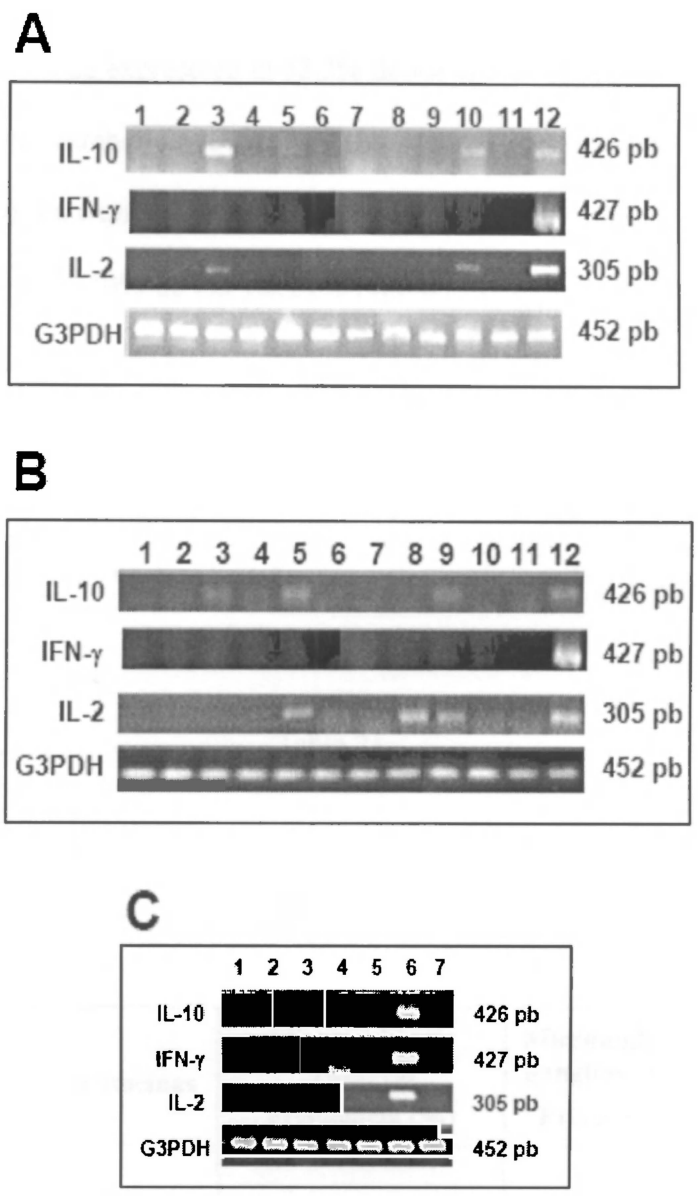

Figura: 33 Amplificación de los RNAm de citocinas en el microambiente tumoral y de ganglios linfáticos regionales no metastásicos de pacientes con cáncer de mama. La amplificación de los RNAm de IL-10, IL-2, IFN-γ y G3PDH se llevó a cabo por RT-PCR. A: Expresión de citocinas en el micrambiente tumoral. Líneas 1-11, pacientes 24-34; línea 12, CMN periféricas estimuladas con PHA como control positivo. B: Expresión de citocinas en el micrambiente de ganglios linfáticos no metastásicos. Líneas 1-11, pacientes 24-34, línea 12, CMN periféricas estimuladas con PHA. C: Tejidos sanos de mama, provenientes de pacientes de cirugía estética de mama. Líneas 1-5, tejido normal 1-5; línea 6, CMN periféricas estimuladas con PHA; línea 7, CMN periféricas no estimuladas como control negativo.

El RNAm de IL-10 se expresó en el 53.3% de los casos (16/30) en el microambiente de los tumores, en cambio, solo el 20% lo expresó en sus ganglios axilares no metastásicos (6/30). La expresión del RNAm de IL-2 resultó positiva en el 33.3% de los tumores (10/30) y en el 40% de los ganglios regionales (12/30). Sin embargo, el IFN-γ no se expresó en el microambiente tumoral en ninguna de las pacientes analizadas y solo el 13.3% (4/30) lo expresó en sus ganglios linfáticos regionales no metastásicos (Tabla 21). Del total de pacientes incluidas en el estudio, 13 no expresaron citocinas en el tumor y 16 no las expresaron en sus ganglios.

Tabla 21

Frecuencia de expresión de citocinas en el microambiente tumoral y de ganglios linfáticos.

Expresión de Citocinas	**Microambiente Tumoral Frecuencia (%)**	**Microambiente de ganglios linfáticos Frecuencia (%)**
• *tipo 1*		
IL-2 (-) & IFN-γ (-)	20 (66.7%)	18 (60.0%)
IL-2 (+) & IFN-γ (-)	10 (33.3%)	8 (26.7%)
IL-2 (+) & IFN-γ (+)		4 (13.3%)
• tipo 2		
IL-10 (-)	14 (46.7%)	24 (80.0%)
IL-10 (+)	16 (53.3%)	6 (20.0%)

El 53,3% de las pacientes expresó una respuesta predominantemente tipo 2, en el microambiente tumoral. Contrariamente, en el microambiente de los ganglios linfáticos regionales se manifestó un predominio de citocinas tipo 1 en el 40% de los casos a consecuencia de la expresión de IL-2 e IFN-γ. Estos resultados sugieren la presencia de un factor supresor en el microambiente tumoral que se expresa con la misma intensidad conque lo hace un factor activador en el microambiente de los ganglios linfaticos no metastásicos.

De los 7 sujetos que presentan metástasis en ganglios, 5 (71.4%) expresaron IL-10 y 3 (42.8%) expresaron IL-2 en microambiente tumoral; en cambio, una paciente expresó IL-10; 4, IL-2 y 3, IFN-γ en sus ganglios no metastásicos. Estas pacientes no muestran un elevado factor supresor en sus ganglios no metastásicos a pesar de tener ganglios comprometidos.

6.5.1 Relación de la expresión de RNAm de citocinas entre los microambientes de tumor y de gánglios

Se estudió la relación de la presencia de IL-2 y de IL-10 entre los dos microambientes (Tabla 22). En el caso de IL-10, el 68.7% de las pacientes (11/16) que expresan IL-10 en el tumor dejan de expresarla en los ganglios linfáticos regionales no metastásicos. No obstante, un 31.2% (5/16) la continuó expresando en ambos microambientes, de los cuales, 4 no expresaron IL-2 en el tumor. Esta expresión diferencial de lL-10 entre los dos microambientes resultó estadísticamente significativa (p=0.0039). También se observó que el 92.8% (13/14) de las pacientes que no

expresaron IL-10 en el microambiente tumoral tampoco la expresaron en el microambiente de los ganglios. La expresión de IL-10 en los ganglios, puede estar dada porque a pesar de ser ganglios no metastásicos, se trata de individuos que padecen cáncer de mama y por lo tanto sus ganglios están relacionados con el tumor por el tránsito de linfocitos de una región a la otra.

Tabla 22

Relación de la expresión de citocinas entre los microambientes de tumor y de ganglios

Microambiente Tumoral	IL-10 *	Microambiente de ganglios linfáticos		
		IL-10 *		
		Neg	Pos	Total
	Neg	13	1	14
	Pos	11	5	16
	Total	24	6	30
	IL-2	IL-2		
		Neg	Pos	Total
	Neg	10	10	20
	Pos	8	2	10
	Total	18	12	30

* Diferencia estadísticamente significativa

El 50% de las pacientes que no expresan IL-2 en sus tumores sí expresa esta citocina en sus ganglos linfáticos, un 30% de este grupo también expresó IFN-γ en sus ganglios y un 40% expresó IL-10 en ambos microambientes. La otra mitad de las pacientes que no expresó IL-2 en sus tumores, no la expresó tampoco en sus ganglios, de este grupo ninguna paciente expresó IFN-γ en sus ganglios; solo una expresó IL-10 en este microambiente y el 30% lo hizo en los tumores. Esto nos sugiere que, aunque en estas pacientes no se observa una respuesta activadora en sus dos microambientes, tampoco hay una elevada frecuencia de respuesta supresora en ambos sitos anatómicos.

El 80% de las pacientes (8/10) que expresaron IL-2 en el microambiente tumoral dejaron de expresarla en los ganglios linfáticos; la mayoría de estas pacientes son de etapa II (87%); ningún caso expresó IFN-γ en ganglios y es importante señalar que el 87% porciento expresó IL-10 en los tumores.

6.6 Asociación de las Proteínas de Activación con la Expresión de Citocinas en el Microabiente Tumoral y en los Ganglios Linfáticos Regionales

6.6.1 Asociación de CD3-ζ y CD3-ε y la Expresión de RNAm de lL-10

Se estudió la relación entre los polipéptidos de CD3 (ζ y ε) y la expresión del RNAm de IL-10 en el microambiente tumoral. No se observó asociación estadísticamente significativa entre ninguna de las dos cadenas de CD3 e IL-10 (RNAm) en el microambiente tumoral (Tabla 23).

Tabla 23

Relación de CD3-ζ y CD3-ε con la expresión del RNAm de IL-10 en las muestras de tumor

		CD3-ζ (T)		CD3-ε (T)		Total
		Neg	Pos	Neg	Pos	
IL-10 RNAm (T)	Neg	6	8	8	6	14
	Pos	4	12	8	8	16
	Total	10	20	16	14	30

T: tumor

Al estudiar la asociación entre las cadenas de CD3 (ζ y ε) y la expresión del RNAm de IL-10 en los ganglios linfáticos regionales tampoco observamos una asociación

6.6 Asociación de las Proteínas de Activación con la Expresión de Citocinas en el Microabiente Tumoral y en los Ganglios Linfáticos Regionales

6.6.1 Asociación de CD3-ζ y CD3-ε y la Expresión de RNAm de IL-10

Se estudió la relación entre los polipéptidos de CD3 (ζ y ε) y la expresión del RNAm de IL-10 en el microambiente tumoral. No se observó asociación estadísticamente significativa entre ninguna de las dos cadenas de CD3 e IL-10 (RNAm) en el microambiente tumoral (Tabla 23).

Tabla 23

Relación de CD3-ζ y CD3-ε con la expresión del RNAm de IL-10 en las muestras de tumor

		CD3-ζ (T)		CD3-ε (T)		Total
		Neg	Pos	Neg	Pos	
IL-10 RNAm (T)	Neg	6	8	8	6	14
	Pos	4	12	8	8	16
	Total	10	20	16	14	30

T: tumor

Al estudiar la asociación entre las cadenas de CD3 (ζ y ε) y la expresión del RNAm de IL-10 en los ganglios linfáticos regionales tampoco observamos una asociación

estadísticamente significativa. No obstante, observamos que del total de pacientes negativas a IL-10 en los ganglios, la mayoría resultó positiva a ambas cadenas (87.5% en ambos casos) (Tabla 24). Estos resultados son contrarios a los obtenidos en el microambiente tumoral, pensamos que se deba a la influencia de diferentes factores regulatorios en cada microambiente.

Tabla 24

Asociación de la expresión de CD3-ζ y CD3-ε con el RNAm de IL-10 en los ganglios linfáticos regionales

		CD3-ζ (G)		CD3-ε (G)		Total
		Neg	Pos	Neg	Pos	
IL-10 RNAm (G)	Neg	3	21	3	21	24
	Pos	0	6	2	4	6
	Total	3	27	5	25	30

G: ganglios

Se analizó la asociación de las formas que coinciden en su peso molecular con las formas fosforiladas de CD3-ζ (21kD y 41kD) y la expresión del RNAm de IL-10, en el microambiente tumoral y de ganglios linfáticos. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre estas moléculas. En el caso de los ganglios linfáticos regionales, se pudo observar que de las 8 pacientes que expresaron la forma de 21kD, 6

estadísticamente significativa. No obstante, observamos que del total de pacientes negativas a IL-10 en los ganglios, la mayoría resultó positiva a ambas cadenas (87.5% en ambos casos) (Tabla 24). Estos resultados son contrarios a los obtenidos en el microambiente tumoral, pensamos que se deba a la influencia de diferentes factores regulatorios en cada microambiente.

Tabla 24

Asociación de la expresión de CD3-ζ y CD3-ε con el RNAm de IL-10 en los ganglios linfáticos regionales

		CD3-ζ (G)		CD3-ε (G)		Total
		Neg	Pos	Neg	Pos	
IL-10 RNAm (G)	Neg	3	21	3	21	24
	Pos	0	6	2	4	6
	Total	3	27	5	25	30

G: ganglios

Se analizó la asociación de las formas que coinciden en su peso molecular con las formas fosforiladas de CD3-ζ (21kD y 41kD) y la expresión del RNAm de IL-10, en el microambiente tumoral y de ganglios linfáticos. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre estas moléculas. En el caso de los ganglios linfáticos regionales, se pudo observar que de las 8 pacientes que expresaron la forma de 21kD, 6

no expresaron el RNAm de IL-10 y de las 11 pacientes que expresaron la forma de 42kD, 9 resultaron negativas a IL-10 (RNAm) (Tabla 25).

Tabla 25

Relación de las formas de 21kD y 42kD de CD3-ζ con la expresión del RNAm de IL-10 en los ganglios linfáticos

		Formas de CD3-ζ (G)				
		21kD		42kD		Total
		Neg	Pos	Neg	Pos	
IL-10 RNAm (G)	Neg	18	6	15	9	24
	Pos	4	2	4	2	6
	Total	22	8	19	11	30

G: ganglios

6.6.2 Asociación de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ y la Expresión del RNAm de IL-10

Se estudió la relación entre las PTKs y la expresión del RNAm de IL-10 en los tumores y en los ganglios linfáticos regionales. No se observó asociación estadísticamente significativa entre ninguna de las dos proteínas e IL-10 (RNAm) en ambos microambientes (Tabla 26). No obstante, 15/18 y 23/29 pacientes que expresaron $p59^{fyn}$ y $p56^{lck}$ respectivamente, no expresaron IL-10 en los ganglios axilares (Tabla 26

B), contrariamente a lo que ocurre en los tumores, donde no se observa diferencia entre la expresión del RNAm de lL-10 y las PTKs (Tabla 26 A).

Tabla 26

Relación de $p59^{fyn}$ y $p56^{lck}$ con la expresión del RNAm de IL-10 en los tumores y en los ganglios.

A

		$p59^{fyn}$ (T)		Total	$p56^{lck}$ (T)		Total
		Neg	**Pos**		**Neg**	**Pos**	
IL-10 RNAm (T)	**Neg**	7	6	13	7	7	14
	Pos	9	6	15	8	8	16
	Total	16	12	28	15	15	30

B

		$p59^{fyn}$ (G)		Total	$p56^{lck}$ (G)		Total
		Neg	**Pos**		**Neg**	**Pos**	
IL-10 RNAm (G)	**Neg**	7	15	22	1	23	24
	Pos	3	3	6	0	6	6
	Total	10	18	28	1	29	30

6.6.3 Asociación de Proteínas de Activación e IL-10 (Determinada por Inmunohistoquímica) en las Muestras de Tumor

Al estudiar la asociación de ambas cadenas de CD3: ζ y ε; con la expresión directa de la proteína IL-10 en las muestras de tumor, se observó una asociación estadísticamente significativa entre CD3-ζ y la presencia de IL-10 en el tejido tumoral (p=0.012); observandose que el 63% de la muestra es positiva a ambas proteínas (Tabla 27). Al medir la relación de CD3-ε e IL-10 en el tejido tumoral, no se encontró significación estadística entre estos parámetros (Tabla 27).

También se analizó la relación entre la expresión de las PTKs, $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ y la expresión de IL-10, determinada por inmunohistoquímica en el tumor de cada paciente. La relación entre ambas PTKs con IL-10 no resultó estadísticamente significativa. En el caso de $p56^{lck}$, del total de pacientes que expresaron IL-10 en sus tumores, 12 dejaron de expresar $p56^{lck}$ y 13 dejaron de expresar $p59^{fyn}$ (Tabla 27).

Tabla 27

Relación de CD3-ζ, CD3-ε, $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ con IL-10 en el tejido tumoral

		CD3-ζ (T)*		CD3-ε (T)		$p56^{lck}$ (T)		Total	$p59^{fyn}$ (T)		Total
		Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos		Neg	Pos	
IL-10 (T)	Neg	4	0	4	0	2	2	4	2	2	4
	Pos	6	17	11	12	12	11	23	13	8	21
	Total	10	17	15	12	14	13	27	15	10	25

T: tumor, * Asociación estadísticamente significativa

6.7 Estimación de la Supervivencia y el Intervalo Libre de Enfermedad.

Determinación del Carácter Pronóstico de Factores Potenciales

Supervivencia: En la serie estudiada, la supervivencia a los tres años resultó de un 89%, o sea, la probabilidad de sobrevivir a este tiempo es de 0.89; a los 5 años se siguió manteniendo esa cifra (Fig. 34).

De la totalidad de pacientes (30 sujetos) tres fallecieron y las restantes se encontraban vivas al término del seguimiento. La mediana del tiempo de seguimiento resultó ser de 4.27 años (alrededor de 52 meses).

Intervalo Libre de Enfermedad: El Intervalo Libre de Enfermedad (ILE) se ha definido como el tiempo que media entre la fecha en la que el paciente se declara en remisión completa y la fecha de recaída, si es que esta ocurre; o la fecha de última noticia en caso contrario. En este estudio, a las pacientes se les extirpa el tumor, por lo tanto en la fecha de la cirugía, las pacientes deben declararse en remisión completa. En la muestra estudiada recayeron cinco pacientes. Al año, el 93% de las pacientes se encontraba libre de enfermedad y a los tres años el 81%. El gráfico de la curva para el ILE puede verse en la Figura 35. La mediana para el ILE resultó ser de 3.98 años (alrededor de 46 meses).

Factores Pronósticos Potenciales: Se realizó un análisis univariado utilizando el método de Kaplan Meier y la prueba de LogRank para identificar diferentes factores pronósticos de tipo inmunológico. Fueron consideradas en este análisis la expresión de

lL-10 y las proteínas de activación linfocitaria CD3-ζ, CD3-ε, p56^{lck} y p59^{fyn}, en los tumores; así como los marcadores tumorales.

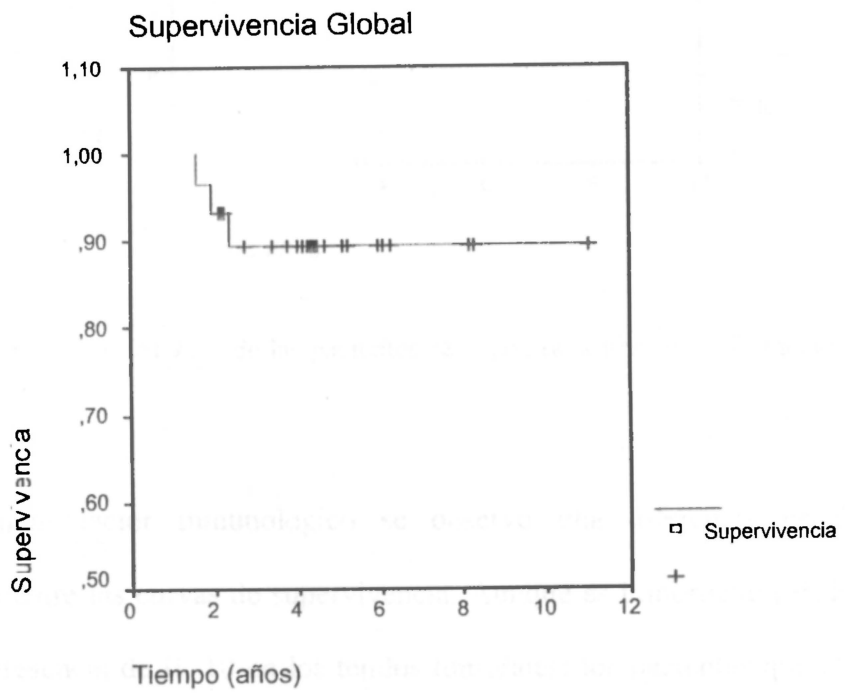

Figura 34: Supervivencia Global. La probabilidad de sobrevivir a a los 3 años es de 0.89, a los 5 años se siguió manteniendo esa cifra.

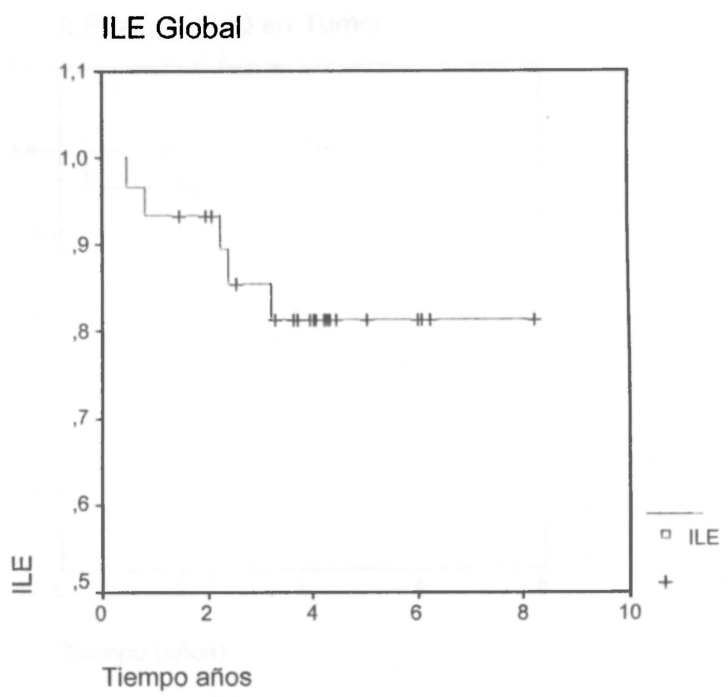

Figura 35: ILE Global. El 93% de las pacientes se encontraba libre de enfermedad al año, a los tres años el 81%.

Para ningún factor inmunológico se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las curvas de supervivencia. Aunque es importante señalar que en el caso de la presencia de IL-10 en los tejidos tumorales; los pacientes que expresan esta citocina tienen una ILE menor que los que no la expresan (Fig. 36). Contrariamente, ocurre con las proteínas de activación, donde los pacientes que expresan las proteínas CD3-ε, $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en el sitio del tumor tienen una ILE mayor que los que no las expresan (Fig. 37, 38 y 39).

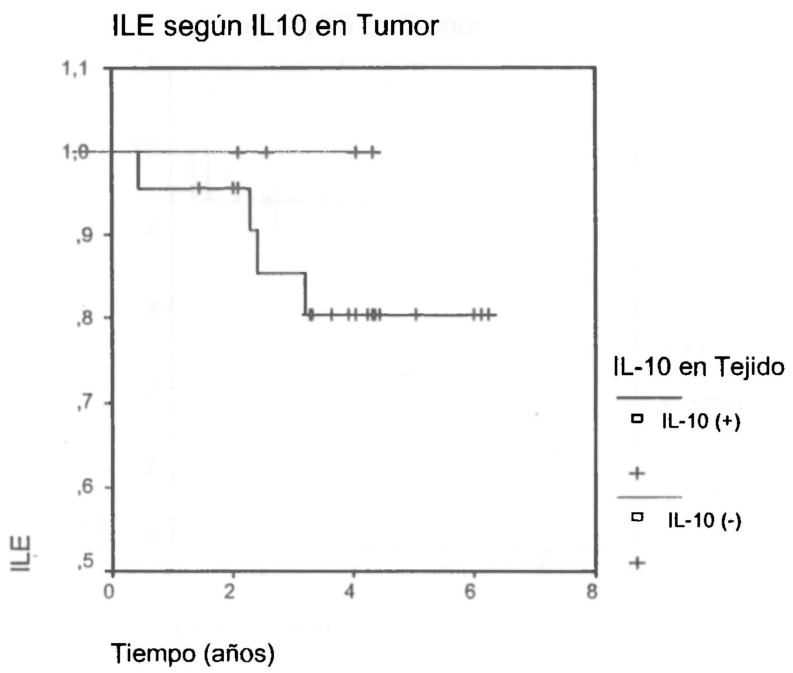

Figura 36: ILE según la expresión de IL-10 en el tejido tumoral

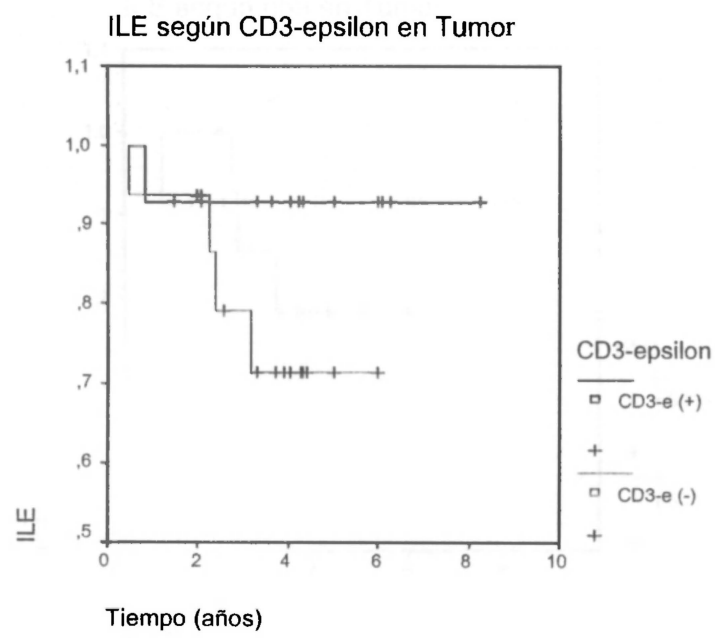

Figura 37: ILE según la expresión de CD3-ε en los tejidos tumorales.

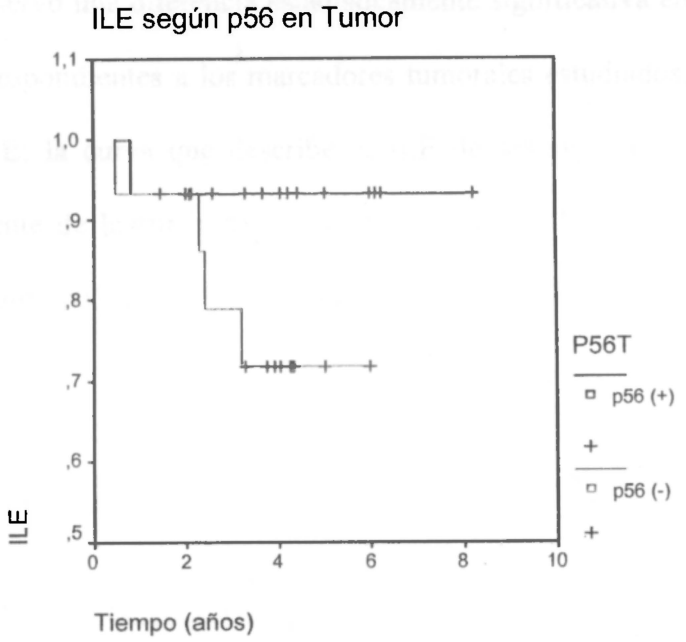

Figura 38: ILE según la expresión de p56[bnk] en el tejido tumoral

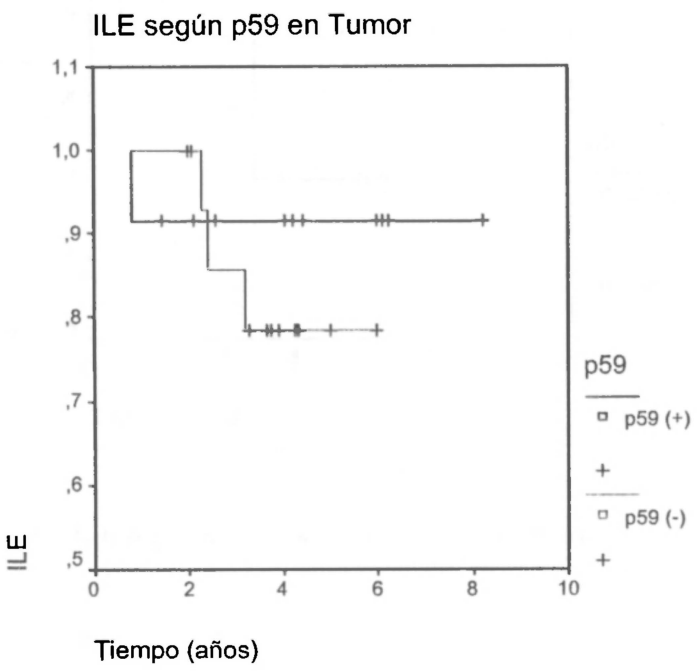

Figura 39: ILE según la expresión de p59[fm] en el tejido tumoral

Tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las curvas de supervivencia correspondientes a los marcadores tumorales estudiados, pero en el caso de p53, Ki67 y RE; la curva que describe el ILE de los sujetos que expresan cada marcador es diferente de la curva de los sujetos negativos. El ILE es menor para los sujetos que expresaron p53 y Ki67, en cambio es mayor para los sujetos que expresaron RE (Fig. 40, 41 y 42).

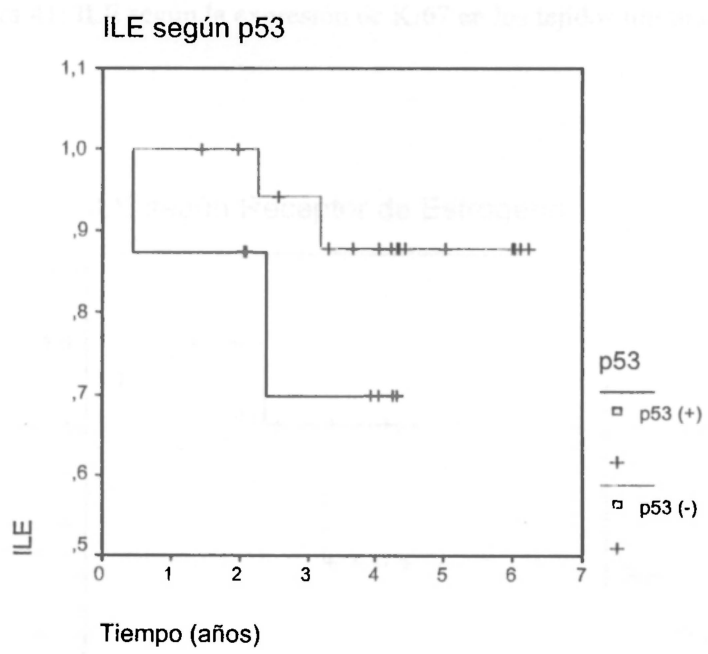

Figura 40: ILE según la expresión de p53 en los tejidos tumorales.

Tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las curvas de supervivencia correspondientes a los marcadores tumorales estudiados, pero en el caso de p53, Ki67 y RE; la curva que describe el ILE de los sujetos que expresan cada marcador es diferente de la curva de los sujetos negativos. El ILE es menor para los sujetos que expresaron p53 y Ki67, en cambio es mayor para los sujetos que expresaron RE (Fig. 40, 41 y 42).

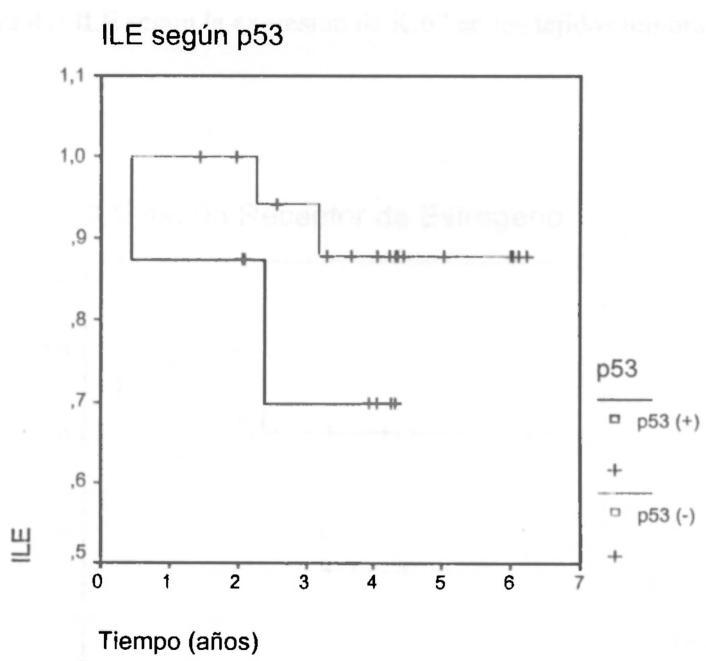

Figura 40: ILE según la expresión de p53 en los tejidos tumorales.

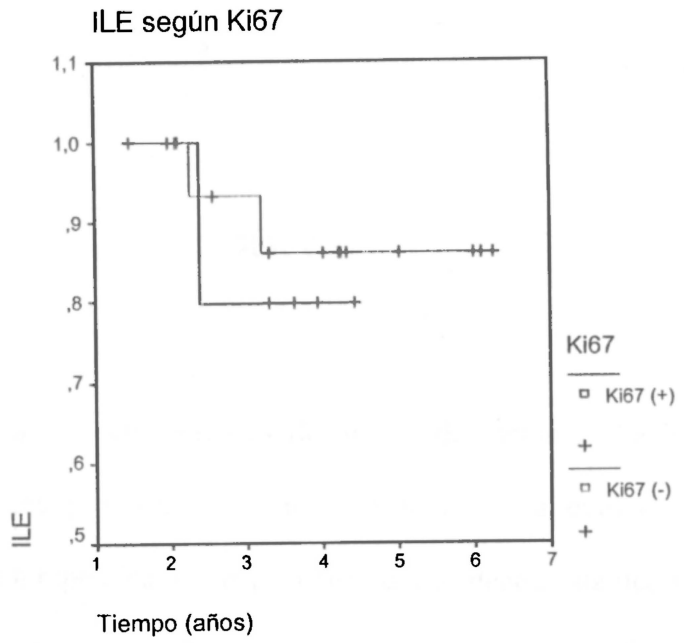

Figura 41: ILE según la expresión de Ki67 en los tejidos tumorales.

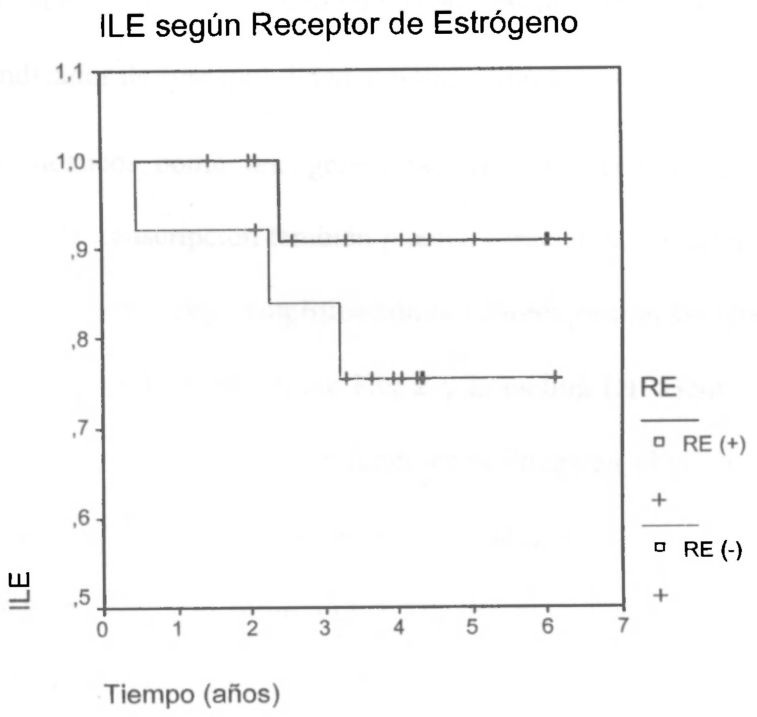

Figura 42: ILE según la expresión de RE en los tejidos tumorales.

7. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta las características del tumor de mama se ha hecho necesario disponer de marcadores pronósticos capaces de predecir la evolución clínica y la respuesta a una pauta terapeútica de las pacientes que padecen esta neoplasia. Entre los factores pronósticos clásicos para el cáncer de mama de mayor significación tenemos el tamaño tumoral y el estado de los ganglios linfáticos axilares. El estudio morfológico proporciona otros parámetros de pronóstico como son el grado de difereciación de la neoplasia y su clasificación. La determinación de receptores de hormonas esteroideas es fundamental como indicador de susceptibilidad al tratamiento hormonal.

Otros factores pronósticos como oncogenes, factores de crecimiento, enzimas y recientemente, factores de transcripción también pueden caracterizar el comportamiento del tumor. Entre los oncogenes cuya amplificación o sobreexpresión se relaciona con una mayor agresividad tumoral se encuentran Her-2 y la ciclina D1. Genes supresores como el gen p53 y el de retinoblastoma con funciones críticas en el control del ciclo celular pueden presentar alteraciones que también se asocian a neoplasias más agresivas. La ploidía del DNA y la capacidad proliferativa han demostrado que son capaces de pronosticar la sobrevida total y libre de enfermedad en pacientes con ganglios metastásicos y no metastásicos.

En el presente trabajo se caracterizó el tumor de mama en las pacientes de acuerdo a sus indicadores pronósticos y marcadores tumorales y se comparó con los parámetros inmunológicos analizados, con el fin de caracterizar la relación del tumor con el sistema inmune del huesped tanto a nivel local como el comportamiento de sus ganglios linfáticos regionales no metastásicos.

Los marcadores tumorales mostraron un patrón de tinción característico y las asociaciones entre ellos siguieron el comportamiento descrito en la literatura. Se observó en las pacientes sobreeexpresión de marcadores relacionados con la agresividad tumoral, como es el caso de Bcl-2 y Bax expresados en el 77 y 92% de las pacientes respectivamente. Marcadores de buen pronóstico como RE y RPg se expresaron en el 51.8 y 32% de las pacientes respectivamente. Por último, otros marcadores de mal pronóstico se expresaron se expresaron en menor medida en la muestra, como son Her-2, p53 y Ki67, expresados en el 40.7, 29.6 y 28% respectivamente

Por otra parte, el estado inmunológico de los pacientes con cáncer es de crucial importancia, en muchos casos se pueden encontrar inmunosuprimidos ya sea como resultado de la enfermedad o de tratamientos previos.

lL-10 inhibe el desarrollo de una respuesta inmune celular por diferentes vías. Tiene un efecto inhibitorio en la función y en la proliferación de los linfocitos T, inhibe la presentación de antígenos por los macrófagos y las células de Langerhans, así como la presentación de antígenos tumor asociados por las células del tumor; inhibe la síntesis de citocinas inflamatorias por los macrófagos, también se ha demostrado que inhibe la maduración de las células dendriticas que son las principales APC en la iniciación de una respuesta inmune (Venetsanakos *et al.*, 1997; Gastman *et al.*, 1999). Por lo tanto, su

función es principalmente supresora de la respuesta inmune y el hecho de encontrar una mayor frecuencia de IL-10 en el microambiente del tumor implicaría una posible supresión local. Se ha demostrado su presencia en el microambiente tumoral en diferentes neoplasias incluido el cáncer de mama. La alta frecuencia de expresión de IL-10 observada en los tejidos tumorales de las pacientes incluidas en este estudio (85.2% de las pacientes) corrobora los resultados de otros investigadores.

En este trabajo se comparó el nivel de expresión de la proteína IL-10 en los tejidos tumorales con la expresión de diferentes marcadores tumorales reportados en cáncer de mama con el objetivo de conocer si existe alguna relación entre el factor supresor lL-10 y diferentes factores pronósticos en esta neoplasia. lL-10 mostró asociación con los marcadores de apoptosis, positiva con los marcadores de la familia Bcl-2 y negativa con p53.

Se ha documentado el papel de IL-10 como factor antiapoptótico. IL-10 es capaz de suprimir la apoptosis de células T a través de un proceso dependiente de Bcl-2. Cohen y sus colaboradores (1997) reportaron que IL-10 suprimió la apoptosis de linfocitos T de sangre periférica *in vitro* por incremento de la expresión de Bcl-2 (Cohen *et al.*, 1997). Taga et al. (1993) observaron que IL-10 previene la apoptosis en celulas T de pacientes con mononucleosis causada por infección con virus Epstein Barr, a través de un incremento en la expresión de Bcl-2, posterior a que se les retira el tratamiento con lL-2 (Taga *et al.*, 1993). No obstante, hay poca información de la interacción entre los reguladores conocidos de Bcl-2 y las señales mediadas por IL-10. La relación entre IL-10 y Bcl-2 también ha sido observada en células humanas de cáncer; una disminución en la expresión de lL-10 en células de linfoma no-Hodgkin´s es responsable de disminución

en la expresión de Bcl-2 (Alas *et al.*, 2001). Los resultados de este trabajo corrobaran las observaciones anteriores. Obtuvimos una asociación positiva entre IL-10 y Bcl-2 en las muestras de tumor de pacientes con cáncer de mama; del total de las pacientes que expresan IL-10, el 78% expresaron Bcl-2.

Wang et al. (2004) demostraron que IL-10 es capaz de promover la expresión del RNAm de Bax en células hepáticas activadas (Wang *et al.*, 2004). En el presente trabajo, la asociación positiva obtenida entre IL-10 y Bax resultó estadísticamente significativa. A pesar de que Bax es una proteína pro-apoptótica, el hecho de que su expresión esté igualmente elevada que su contraparte anti-apoptótica (Bcl-2), puede ser indicativo de inhibición del fenómeno de apoptosis en las células tumorales, debido a que el heterodímero que se forma con ambas moléculas es anti-apoptótico.

Una asociación entre IL-10 y p53 ha sido descrita anteriormente (Fox *et al.*, 2002; Miret *et al.*, 2003). La inducción de la expresión de p53 se ve afectada en los individuos mayores de edad. Alteraciones relacionadas a una pobre respuesta proliferativa, en el envejecimiento, se han asociado con una acumulación de células T de memoria y con alteraciones en la producción de citocinas incluyendo una alta expresión de IL-4 e IL-10 y una baja producción de IL-2, causando una disminución de la función inmune. Este cambio a citocinas Th2 se ha observado en ratones negativos a p53. Ratones p53-/-, muestran acumulación de células T de memoria y una mayor expresión de IL-4, IL-6 e IL-10, después de estimulación antigénica (Fox *et al.*, 2002). Existen reportes que indican que los promotores de algunas citocinas son reprimidos por p53, esto sugiere que la regulación negativa de estas citocinas se pierde cuando hay deficiencia de p53 (Ohkusu-Tsukada *et al.*, 1999). Elevada producción de IL-10 se ha observado en

linfocitos de ratones deficientes de p53 con encefalomielitis autoinmune experimental (Okuda *et al.*, 2003). IL-10 también puede influir sobre la actividad de Lupus Eritematoso Sistémico por Inhibición de la vía de apoptosis a través de p53, en células autorreactivas (Miret *et al.*, 2003). Este comportamiento no se había reportado en cáncer de mama humano. Teniendo en cuenta los resultados anteriores pudieramos explicar la relación inversa obtenida entre IL-10 y p53, donde se observó que el 89% de los pacientes que resultaron negativos a p53, fueron positivos a IL-10.

Estímulos que favorecen la producción de IL-10 en el microambiente tumoral, pueden provocar un incremento en la producción de genes que pueden ser regulados por esta citocina y que sus productos están relacionados con mecanismos que favorecen la progresión del tumor (Fig. 43)

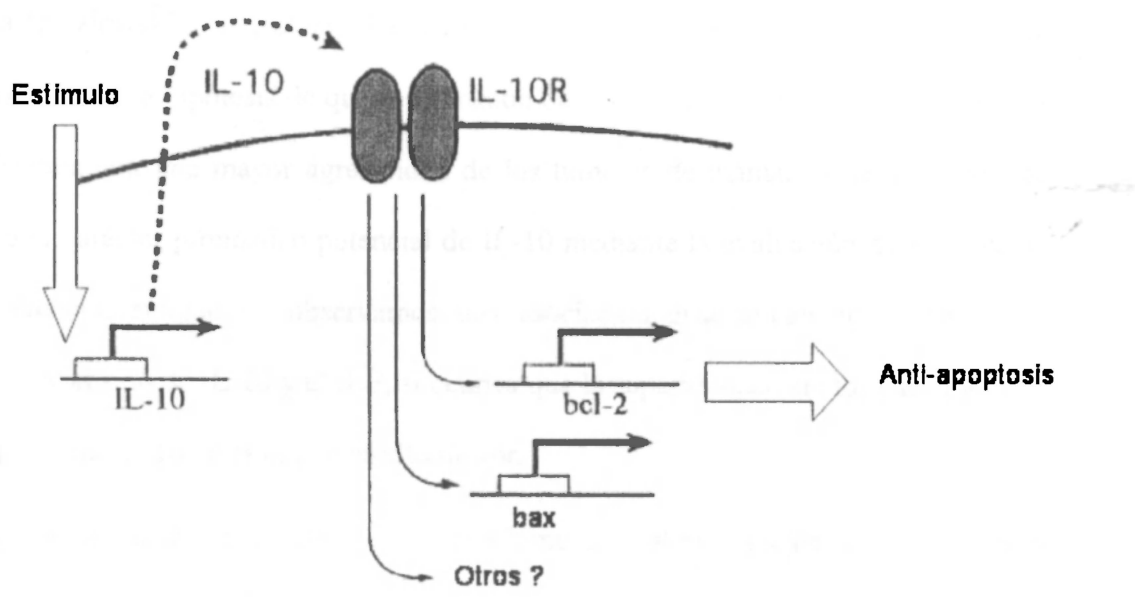

Figura 43: Activación de la producción de IL-10

La relación entre IL-10 y los marcadores de apoptosis no se había documentado en el tumor de mama. La presencia de IL-10 como factor supresor de la respuesta inmune,

además de la elevada expresión de las proteínas de la familia de Bcl-2, en el microambiente tumoral, pudiera representar un incremento de la agresividad de los tumores en cáncer de mama (Fig. 43). Para verificar esta hipótesis se analizó la asociación de IL-10 con diferentes factores pronósticos clásicos, importantes para definir el estado del tumor en cada pacientes. IL-10 se expresó mas frecuentemente en tumores de GN II y III de una forma estadísticamente significativa ($p<0.05$); otra relación importante pero no significativa resultó su alta frecuencia en tumores negativos a receptores hormonales; IL-10 resultó mayormente expresada en tumores RE-RPg-. Esta citocina ha sido considerada como un factor pronóstico en cáncer de ovario por su asociación con el tipo y el grado histológico (Mustea *et al.*, 2006). En cáncer de mama elevados niveles de IL-10 en el suero de las pacientes se correlacionó con la etapa clínica (Kozlowski *et al.*, 2003). Las asociaciones observadas en este trabajo pudieran confirmar nuestra hipótesis de que la expresión de IL-10 en el microambiente del tumor se relaciona con una mayor agresividad de los tumores de mama. En este sentido; se estudió el carácter pronóstico potencial de IL-10 mediante la evaluación de la curva de supervivencia; aunque no observamos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de IL-10 y el ILE, sí ocurrió que la supervivencia de los pacientes que no expresaron IL-10 en el tumor resultó mayor.

Otro factor que puede afectar la respuesta inmune local en pacientes con cáncer es la ausencia o disminución de la expresión de proteínas que intervienen en la activación de linfocitos T. En los últimos años se han reportado defectos en la vía de señalización en las células T de pacientes con cáncer. Estos defectos están mayormente presentes en las células linfoides derivadas del microambiente del tumor y con menos frecuencia se han

observado en sangre periférica (Kuss *et al.*, 1999). La pérdida de expresión de las proteínas CD3-ζ y CD3-ε afecta no solamente la transducción de señales a través del TCR, sino también la expresión del TCR/CD3 en la superficie de los linfocitos T (La Gruta *et al.*, 2004). La expresión anormal de las PTKs $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ también está implicada en la supresión de la respuesta inmune en huespedes que presentan tumor (Gratama *et al.*, 1999; Salvadori *et al.*, 2000). Estos defectos contribuyen a una disfunción inmune celular, por este motivo analizamos la expresión de las cadenas CD3-ζ y CD3-ε y las PTKs $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en los tejidos tumorales y lo comparamos con su expresión en los ganglios linfáticos regionales no metastásicos de pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales de la enfermedad.

Varios grupos han reportado disminución de la cadena ζ en linfocitos asociados a tumor y en TIL de pacientes con cáncer de próstata (Meidenbaner *et al.*, 2002) y ovarios (Taylor *et al.*, 2004), carcinoma renal (Finke *et al.*, 1993), colorectal (Nakagomi *et al.*, 1993; Matsuda *et al.*, 1995), gástrico (Ishigami *et al.*, 2002), cervical (De Gruijl *et al.*, 1999) y en cáncer de cabeza y cuello (Muller *et al.*, 2002). Estos coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo, donde se muestra una disminución significativa en la expresión de las cadenas ζ y ε, en los tumores, en el 33 y 53% de las pacientes respectivamente.

Pocos estudios han investigado la expresión de CD3-ζ en linfocitos de ganglios linfáticos regionales en pacientes con cáncer. Ishigami et al. (2004) en su trabajo encontró disminuida la expresión de CD3-ζ en linfocitos de ganglios linfáticos regionales y de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico (Ishigami *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando analizamos la expresión de CD3 ζ y ε en los ganglios linfáticos

positivamente asociada a los marcadores Bcl-2 y Bax. Gastman (1999) señaló que las caspasas están involucradas en la degradación de la cadena ζ (Gastman *et al.*, 1999). Los mecanismos responsables de la deficiencia en esta cadena son desconocidos pero se ha propuesto que pueden estar relacionados con la apoptosis de las células T inducida por el tumor (Kuss *et al.*, 1999). Nuestros resultados indicaron una cierta asociación directa de CD3-ζ con Bcl-2 en el microambiente tumoral, la cual no fue significativa, pero se observó que cuando el marcador Bcl-2 resultó positivo, el 65% de las pacientes expresaron CD3-ζ. La relación de CD3-ζ con Bax también pudiera estar relacionada con el mecanismo de apoptosis. La expresión del polipeptido CD3-ζ se observó con mayor frecuencia en casos RE+RPg+.

Por otra parte, más del 70% de los ganglios que expresaron los polipeptidos CD3-ζ y CD3-ε dejaron de expresar el marcador de proliferación Ki67. La pérdida de expresión de la cadena ζ se ha correlacionado con la progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Muller *et al.*, 2002) y carcinoma gástrico (Ishigami *et al.*, 2002); por lo que ha sido considerada como un factor pronóstico independiente. Al estudiar el carácter pronóstico de CD3-ζ y CD3-ε, no observamos una asociación significativa entre la expresión de ζ y ε con el ILE; sin embargo, la supervivencia de los pacientes que expresaron CD3-ε en el tumor resultó mayor que la supervivencia de los que no la expresaron.

$p59^{fyn}$ se asoció de manera significativa con los receptores hormonales en las muestras de tumor. Ambas PTKs mostraron una curva de supervivencia mayor para las pacientes que expresaron $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en sus tumores.

Estos resultados pudieran sugerir una influencia negativa del tumor sobre la expresión de las proteínas de activación.

Por otra parte, es conocido que $p59^{fyn}$ se encuentra en asociación física con los polipéptidos ζ y ε de la molécula CD3 y $p56^{lck}$ está asociada a la región citoplasmática de CD4 y CD8 y se acerca a ζ y a otras cadenas de CD3 después de la unión del TCR con el antígeno (Osorio, 1998). Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de CD3-ε y ambas PTKs en el sitio del tumor. La relación de $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ con CD3-ζ en ambos microambientes y con CD3-ε en los ganglios linfáticos no resultó estadísticamente significativa; no obstante, la mayoría de las pacientes que expresaron las PTKs expresaron también los polipeptidos de CD3.

Las citocinas son mensajeros químicos producidos por una variedad de células activadas, los cuales actúan como reguladores y mediadores de la respuesta inmune (Marselli *et al.*, 2001). Han sido demostrados sus múltiples efectos en eventos celulares como: la regulación de la proliferación celular, diferenciación y activación, embriogénesis y respuesta inmune (Huang *et al.*, 1999).

En este trabajo estudiamos la expresión de los RNAm de varias citocinas que caracterizan las respuestas tipo 1 y tipo 2; en tumores y en ganglios linfáticos regionales no metastásicos de pacientes con cáncer de mama. La expresión de citocinas observada en los tumores resultó heterogénea. No obstante, se observó un predominio de RNAm de IL-10 en más del 50% de las pacientes. Varios investigadores han demostrado la presencia de esta citocina en el sitio del tumor, en pacientes con diferentes neoplasias (Karkevitch *et al.*, 1994; Venetsanacos *et al.*, 1997; Asselin-Paturel *et al.*, 1998). Sin embargo, en los ganglios axilares, se observó una prevalencia de citocinas tipo 1, dada

por una mayor frecuencia de expresión de IL-2 e IFN-γ en este microambiente. De acuerdo con los resultados obtenidos observamos mayor expresión de un factor supresor en el microambiente tumoral; mientras que en los ganglios linfáticos, este factor disminuye considerablemente. La expresión de IL-2 en el microambiente tumoral sugiere una activación local que puede ser suprimida por la presencia de IL-10. En los ganglios linfáticos regionales, se observó una pérdida de expresión de IL-10 así como un incremento de la expresión de IL-2.

Las células T cooperadoras específicas para los antígenos del tumor pueden secretar IFN-γ, el cual incrementa la expresión de moléculas MHC clase I y favorece la susceptibilidad a la lisis por las células CTL. El IFN-γ también puede activar a los macrófagos para destruir las células tumorales (Abbas *et al.*, 2000). La falta de secreción de IFN-γ en el sitio del tumor observada en las pacientes estudiadas también pudiera explicar una deficiencia en la respuesta inmune local.

Nieland y sus colaboradores (1998) reportaron una asociación entre la cadena ζ y el patrón de citocinas. Estos investigadores observaron alteraciones de la función Th1 debido a la expresión de la cadena ζ en linfocitos de sangre periférica estimulados con anti-CD3, de pacientes con carcinoma cervical, neoplasia cervical intraepitelial y carcinoma de mama, (Nieland *et al.*, 1998). Por otra parte, una baja expresión de $p56^{Lck}$ ha sido asociada con un desbalance Th2/Th1 en pacientes diabéticos (Nervi *et al.*, 2000). A pesar de estos resultados, no observamos una relación estadística entre la expresión de citocinas y las proteínas de activación de linfocitos T en pacientes con cáncer de mama. No obstante, un elevado por ciento de las pacientes que expresaron los polipeptidos de CD3 y las PTKs, no expresaron RNAm de IL-10 en los ganglios.

En los tumores, la presencia de un factor supresor (IL-10) pudiera afectar la respuesta inmune local aún en el caso de pacientes que expresan la cadena ζ y las PTKs. Estos resultados sugieren que los linfocitos del microambiente tumoral están sometidos a diferentes mecanismos supresores que provocan una disminución de la respuesta inmune contra el tumor. Este comportamiento diferente en ambos microambientes, pudiera deberse a a la influencia de diferentes factores regulatorios.

A pesar de la elevada expresión de IL-10 y la disminución de los polipeptidos de CD3 y las PTKs en las muestras de tumor de mama; la presencia de un patrón de fosforilación en tirosina pudiera sugerir un estado de activación previo de las células T en ambos microambientes.

La producción de IL-10 en el sitio del tumor puede ser utilizado por el tumor para impedir su destrucción por el sistema inmune. La capacidad de IL-10 para inhibir la generación de una respuesta inmune en el sitio del tumor tiene importantes implicaciones con respecto a la inmunoterapia local del cáncer. Esto tiene importancia en el diseño de estrategias dirigidas a generar inmunidad tumor-especifica mediada por células y sugiere que la neutralización de lL-10 pudiera ser clave para la efectividad de tales terapias. (Halak *et al.*, 1999).

La disminución en la función inmune conduce a una pérdida de la inmunovigilancia y por tanto favorece el desarrollo del tumor, pero, por otra parte esta disfunción inmune puede deberse a un efecto secundario inducido por las propias células tumorales. El estudio de los diferentes factores que afectan la respuesta inmune en cáncer de mama resulta importante para entender la respuesta inmunológica que se produce en el microambiente tumoral la cual seria vital en el control de la progresión del tumor,

además, conociendo con precisión las alteraciones que se producen en esta respuesta se pudieran desarrollar estrategias inmunoterapeúticas dirigidas contra la afectación específica.

8. CONCLUSIONES

1. Se observó una elevada frecuencia de expresión Inmunohistoquímica de IL-10 en el microambiente tumoral de pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales de la enfermedad.
2. Asociación de la proteína IL-10 con los marcadores tumorales relacionados con la apoptosis. Esta relación resultó directa con Bcl-2 y Bax e inversa con p53. La asociación entre IL-10 y Bax fue altamente significativa.
3. Se obtuvo una asociación entre la expresión de IL-10 con factores pronósticos de cáncer de mama. La frecuencia de expresión de IL-10 resultó elevada en las pacientes que presentaron tumores negativos a receptores hormonales (RE-RPg-).
4. La frecuencia de expresión de IL-10 también resultó elevada en tumores de grado nuclear II y III; de forma estadísticamente significativa.
5. Las pacientes que no expresaron IL-10 en el microambiente tumoral mostraron una curva de supervivencia mayor que las pacientes que la expresaron.
6. Se obtuvo una deficiencia significativa de expresión de los polipeptidos CD3-ζ y CD3-ε en el microambiente tumoral comparado con la elevada expresión de ambas cadenas en los ganglios linfáticos regionales no metastásicos.

7. Se observó una deficiencia en la expresión de las proteínas tirosinas quinasas $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en el microambiente tumoral comparado con una mayor expresión en los ganglios linfáticos regionales no metastásicos. La deficiencia de expresión de $p56^{lck}$ resultó altamente significativa.

8. Se observó un patrón de fosforilación en tirosinas en las muestras de tumor y de ganglios linfáticos axilares en las pacientes que expresaron diferentes formas de CD3-ζ que corresponden a los pesos moleculares de las formas fosforiladas.

9. Se obtuvo una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de $p59^{fyn}$ y la presencia de receptores hormonales. Se observó una alta frecuencia de expresión de $p59^{fyn}$ en los grupos de pacientes RE+RPg+ y RE+RPg-.

10. Las pacientes que expresaron las proteínas de activación linfocitaria: CD3-ε, $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en el sitio del tumor presentaron una curva de supervivencia mayor que las pacientes que no las expresan.

11. Se observó una mayor frecuencia de expresión de RNAm de IL-10 en los tumores de pacientes con cáncer de mama que en los ganglios linfáticos no metastásicos de estas pacientes. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa.

12. Predominio de RNAm de citocinas tipo 1 en los ganglios linfáticos regionales no metastásicos de pacientes con cáncer de mama, debido a una mayor frecuencia de lL-2 e IFN-γ en este microambiente.

Perspectivas

1. Estudiar la relación entre IL-10 y los indicadores de agresividad tumoral, por el método de Inmunohistoquímica, en un número mayor de pacientes.
2. Estudiar si el polimirfismo de IL-10 está relacionado con la alta frecuencia de expresión de IL-10 en etapas iniciales del cáncer de mama.
3. Estudiar la relación de IL-10 y las proteínas de activación con el indicador de pronóstico de Bloom Richardson (BR) en las muestras de tumor de mama.
4. Estudiar la presencia de células apoptóticas en las muestras de tumor de mama.

Table 3 Relationship between IL-10 and breast tumor markers.

Marker	IL-10		Total
	Negative	Positive	
ER			
Negative	2	11	13
Positive	2	12	14
Total	4	23	27
$\chi^2 = 0.006$		$P = 0.936$	
Bax			
Negative	2	0	2
Positive	2	22	24
Total	4	22	26
$\chi^2 = 11.917$		$P = 0.001$	
Her-2			
Negative	3	13	16
Positive	1	10	11
Total	4	23	27
$\chi^2 = 0.482$		$P = 0.488$	
p53			
Negative	2	17	19
Positive	2	6	8
Total	4	23	27
$\chi^2 = 0.934$		$P = 0.334$	
Bcl-2			
Negative	1	5	6
Positive	3	18	21
Total	4	23	27
$\chi^2 = 0.021$		$P = 0.885$	

The results express the frequency of patient.

markers associated with breast cancer. The interactions found between breast tumor markers in this work agree with reports published by others.[16–21]

IL-10 expression shows an association with the tumor markers related to apoptosis, i.e., positive for the Bcl-2 family of proteins and negative for p53.

The role of IL-10 as an anti-apoptotic factor has been documented; its effect on cell survival was associated with increased expression of Bcl-2. IL-10 is able to prevent the apoptosis induced by the activation of human T cells.[29,30] The relationship between IL-10 and Bcl-2 has also been observed in human cancer cells. A decrease in IL-10 expression in non-Hodgkin's lymphoma cells has been responsible for the downregulation of Bcl-2 expression.[31] We corroborate those results with the positive association obtained between IL-10 and Bcl-2 in breast cancer patients in our study; of 23 patients positive for IL-10, 18 (78%) were positive for Bcl-2.

Wang et al.[13] demonstrated that IL-10 is able to promote the expression of Bax mRNA in culture-activated hepatic stellate cells. In our work, the expression of IL-10 was strongly associated with Bax expression; all the patients who were positive for IL-10 were positive for Bax. Although Bax is a member of the Bcl-2 family and has a pro-apoptotic effect,[32] it is equally expressed as its anti-apoptotic counterpart (Bcl-2), and their heterodimeric association is anti-apoptotic, suggesting the inhibition of apoptosis in tumor cells.

An association between IL-10 and p53 has been described.[33] The induction of p53 expression is affected in aged individuals. Several alterations related to a poor proliferative response in the aged have been associated with an accumulation of memory T cells and alterations in cytokine production, including high expression of IL-4 and IL-10 and low production of IL-2, causing a decrease in the immune function. The change to Th2 cytokines has been observed in p53-negative mice. In a study carried out in p53 -/- mice an accumulation of memory T cells and a high expression of IL-4, IL-6, and IL-10 were shown after antigen stimulation.[33] Some cytokine promoters are repressed by p53, suggesting that a negative regulation of these cytokines might get lost when there is a deficiency of p53.[15] Mice immunization with genetic sequences of p53 stimulated type 1 p53-specific immune response, p53 being an immunity protector to the challenge of murine metastatic mammary adenocarcinoma.[34]. This behavior has not been reported in human breast cancer. Analyzing these previous results, we were able to explain the inverse association between IL-10 and p53 observed in our study, where 89% of patients who were negative for p53 were positive for IL-10.

Conclusion

The interaction between IL-10 and the apoptotic markers had not been documented in breast tumors. The presence of IL-10 and the high expression of Bcl-2 family proteins in the tumor microenvironment may represent an increase in the aggressiveness of breast tumors, even in the early stages of the neoplasia.

Acknowledgements

This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico.

References

1. Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:109–18.
2. Yamashita H, Nishio M, Toyama T, et al. Coexistence of Her2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:R24–30.
3. Wong PY, Staren ED, Tereshkova N, Braun DP. Functional analysis of tumor-infiltrating leukocytes in breast cancer patients. *J Surg Res* 1998;76:95–103.
4. Venetsanakos E, Beckman I, Bradley J, Skinner JM. High incidence of interleukin 10 mRNA but not interleukin 2 mRNA detected in human breast tumours. *Br J Cancer* 1997; 75:1826–30.
5. Huang M, Wang J, Lee P, et al. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res* 1995;55:3847–53.
6. Green AR, Green VL, White MC, Speirs V. Expression of cytokine messenger RNA in normal and neoplastic human breast tissue: identification of interleukin-8 as a potential regulatory factor in breast tumours. *Int J Cancer* 1997;72: 937–41.
7. Marrogi AJ, Munshi A, Merogi AJ, et al. Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factor in breast carcinoma. *Int J Cancer* 1997;74:492–501.
8. Fiorentino DF, Zlotnick A, Vieira P, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991;146:3444–51.
9. O'Garra AKW, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165–90.
10. Cohen SB, Crawley JB, Kahan MC, Feldmann M, Foxwell BM. Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. *Immunology* 1997;92:1–5.
11. Taga K, Cherney B, Tosato G. IL-10 inhibits apoptotic cell death in human T cells starved of IL-2. *Int Immunol* 1993;5:1599–608.
12. Alas S, Bonavida B. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (stat3) activity in b-non-hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Res* 2001;61:5137–44.
13. Wang XZ, Zhang SJ, Chen YX, Chen ZX, Huang YH, Zhang LJ. Effects of platelet-derived growth factor and interleukin-10 on Fas/Fas-ligand and Bcl-2/Bax mRNA expression in rat hepatic stellate cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2004;10:2706–10.
14. Okuda Y, Okuda M, Bernard CC. Regulatory role of p53 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2003;135:29–37.
15. Ohkuso-Tsukada K, Tsukada T, Isobe KI. Accelerated development and aging of the immune system in p53-deficient mice. *J Immunol* 1999;163:1966–72.
16. Coppola D, Catalano ESV, Nicosia SV. Pathology update significance of p53 and Bcl-2 protein expression in human breast ductal carcinoma. *Cancer Control* 1999;6:181–7.
17. Megha T, Ferrari F, Benvenuto A, et al. p53 mutation in breast cancer. Correlation with cell kinetics and cell of origin. *J Clin Pathol* 2002;55:461–6.
18. Ellis M. Overcoming endocrine therapy resistance by signal transduction inhibition. *Oncologist* 2004;9:20–6.
19. Sjostrom J, Blomqvist C, von Boguslawski K, et al. The predictive value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:811–6.
20. Osin PP, Lakhani SR. The pathology of familial breast cancer: immunohistochemistry and molecular analysis [review]. http://breast-cancer-research.com/vol1no1/27oct99/review/3
21. Yang QF, Sakurai T, Yoshimura G, et al. Expression of Bcl-2 but not Bax or p53 correlates with in vitro resistance to a series of anticancer drugs in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2000;61:211–6.
22. Martinez-Arribas F, Nunez-Villar MJ, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, Schneider J. Immunofluorometric study of Bcl-2 and Bax expression in clinical fresh tumor samples from breast cancer patients. *Anticancer Res* 2003;23:565–8.
23. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hachitanda Y. Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer. *Am J Surg* 2003;185:165–7.
24. Navarro-Gómez J, Arafat W, Xiang J. Gene therapy for carcinoma of the breast pro-apoptotic gene therapy. *Breast Cancer Res* 1999;2:32–44.
25. Halak BK, Maguirre Jr HC, Lattime EC. Tumor-induced interleukin-10 inhibits type 1 immune responses directed at a tumor antigen as well as a non-tumor antigen present at the tumor site. *Cancer Res* 1999;59:911–7.
26. Beissert S, Hosoi J, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD. IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J Immunol* 1995;154:1280–6.
27. Toomey D, Harmey J, Condron C, Kay E, Bouchier-Hayes D. Phenotyping of immune cell infiltrates in breast and colorectal tumours. *Immunol Invest* 1999;28:29–41.
28. Becker JC, Brabletz T, Czerny C, Termeer C, Brocker EB. Tumour mechanisms from immunosurveillance: induction of unresponsiveness in a specific MNC-restricted $CD4^+$ human T cell clone by the autologous MHC class II^+ melanoma. *Int Immunol* 1993;5:1501–8.
29. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, et al. Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Chem Biochem* 1996;60:23–32.
30. Hashimoto S, Komuro I, Yamada M, Akagawa KS. IL-10 inhibits granulocyte macrophage colony-stimulating factor dependent human monocyte survival at the early stage of the culture and inhibits the generation of macrophages. *J Immunol* 2001;167:3619–25.
31. Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization of B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res* 2001;7:709–23.
32. Amirghofran Z, Monabati A, Khezri A, Malek-Hosseini A. Apoptosis in transitional cell carcinoma of bladder and its relation to proliferation and expression of p53 and Bcl-2. *Pathol Oncol Res* 2004;10:154–8.
33. Fox JG, Sheppard BJ, Dangler CA, Whary MT, Ihrig M, Wang TC. Germ-line p53-targeted disruption inhibits helicobacter-induced premalignant lesions and invasive gastric carcinoma through down-regulation of Th1 proinflammatory responses. *Cancer Res* 2002;62:696–702.
34. Parajuli P, Pisarev V, Sublet J, Steffel A, Varney M, Singh R. Immunization with wild-type p53 gene sequences coadministered with Flt3 ligand induces an antigen-specific type 1 T-cell response. *Cancer Res* 2001;61:8227–34.