

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EXPRESION DE CITOCINAS Y DE MOLECULAS
DE ACTIVACION DE LINFOCITOS T Y SU
RELACION CON LA EXPRESION DE MARCADORES
TUMORALES EN CANCER DE MAMA**

PRESENTA

LETICIA LLANES FERNANDEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
INMUNOBIOLOGIA**

AGOSTO 2003

2003

TM

RC280

.B8

L5

2003

c.1

EXPRESION DE CITOCINAS Y DE MOLECULAS DE ACTIVACION

DE LINFOCITOS T Y SU RELACION CON LA EXPRESION DE

MARKADORES EN CANCER DE MAMA



1080124326

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EL PRESENTE DE CITOCINAS Y DE MOLECULAS DE ACTIVACION DE
LINFOCITOS T Y SU RELACION CON LA EXPRESION DE MARCADORES
TUMORALES EN CANCER DE MAMA

EXPRESION DE CITOCINAS Y DE MOLECULAS
DE ACTIVACION DE LINFOCITOS T Y SU
RELACION CON LA EXPRESION DE MARCADORES
TUMORALES EN CANCER DE MAMA

PRESENTA

LETICIA LLANES FERNANDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
INMUNOBIOLOGIA

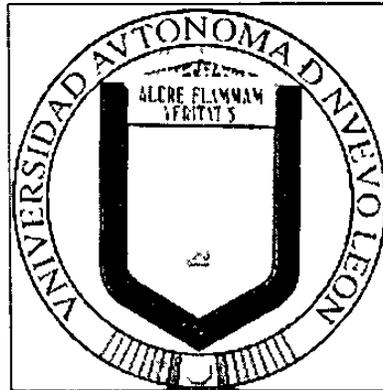
AGOSTO 2003



TM
RL280
B8
L5
2083

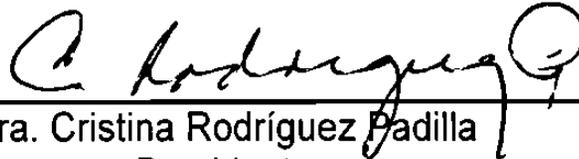


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

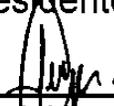


EXPRESIÓN DE CITOCINAS Y DE MOLÉCULAS DE ACTIVACIÓN DE
LINFOCITOS T Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE MARCADORES
TUMORALES EN CÁNCER DE MAMA

COMISIÓN DE TESIS



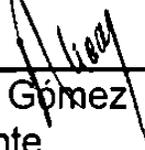
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Presidente



Dr. Juan Manuel Alcocer González
Secretario



Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal



Dr. Ricardo Gómez
Suplente

AGOSTO 2003



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EXPRESIÓN DE CITOCINAS Y DE MOLÉCULAS DE ACTIVACIÓN DE
LINFOCITOS T Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE MARCADORES
TUMORALES EN CÁNCER DE MAMA**

DIRECTORES DE TESIS



Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Director Interno



Dr. Juan Manuel Acocer González
Director Interno

Dra. María del Carmen Arango Prado
Director Externo

AGOSTO 2003

LOCALIZACIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo en:

Las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Las instalaciones de La Unidad de Evaluación e Investigación de Productos Antitumorales del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, Ciudad de la Habana, Cuba.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico con todo mi amor

*A mi Hijo
A mis Padres
A mi abuelita Nena*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que me otorgaron para realizar mis estudios de Postgrado (Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología) en la Facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Agradezco al Ministerio de Salud Pública de Cuba y al Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología por haberme aceptado para desarrollar la Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología en la Facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo le agradezco a Jorge Eduardo, mi hijo, por ser el motor impulsor de mi vida, le doy las gracias por ser como es y hacer que viva orgullosa de él, gracias, por ser lo más importante de mi existencia.

Agradezco especialmete a mis padres por su amor y apoyo incondicional, en mi vida personal y profesional. Agradezco que con su ejemplo han 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.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología por haberme acogido durante estos tres años de estudio.

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 Maria del Carmen Arango por la confianza que depositó en mí al poner este proyecto en mis manos.

A Martica por su valiosa ayuda en la realización de los análisis estadísticos y en la confección de las tablas. Su paciencia y comprensión fueron muy importantes para mí.

A Irene por su vital participación en la realización de uno de los objetivos de este trabajo, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio en el INOR y por compartir conmigo aquí en Monterrey. Doy las gracias también a las muchachas del laboratorio de Inmunohistoquímica: Maiby y Xiomara que me ayudaron en el trabajo de inmunohistoquímica.

A Grau y a la Dra. Carmen, su ayuda fue fundamental en un momento muy importante de mi vida.

A mis compañeros del Laboratorio 6: Moy, Paloma, Leo y Catarino por haberme soportado y acompañado en estos años durante mi estancia en Monterrey.

A Edgar por su paciencia y comprensión, gracias por haberme ayudado cada vez que lo necesité.

A mis compañeros del laboratorio, Itza, Marta, Gerardo, Beto, que juntos formamos un buen equipo.

A Nancy, Bety y Gloria por su paciencia y ayuda cada vez que las necesité.

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

Al Departamento de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, A la Dra. Julia Verde, a Carmen y a la Maestra Maria Luisa.

Gracias especiales a Goyis y a Sol, por su ayuda y apoyo incondicional durante mi estancia en Monterrey.

A mis amigos en Cuba, especialmente: Maria Marta, Mónica y Tere por su amistad y compañía.

También agradezco a Elías y Alicia que me acogieron como parte de su familia e hicieron grata mi estancia en Monterrey.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMs	Anticuerpos Monoclonales
AIF	Factor Inductor de Apoptosis
APC	Células Presentadoras de Antígenos
CAB	Diaminibencidina
CD	Cluster de Diferenciación
CDKs	Quinasas Dependientes de Ciclinas
CEA	Antígeno Carcinoembrionario
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DEPC	Dietilpirocarbonato
DLN	Linfocitos que Drenan de Ganglios
dNTP	Desoxinucleótidos
DTT	Ditiotreitol
E2F	Factor de Transcripción E2F
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias-Granulocito/Macrófago
Her2	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
HSP	Proteína de Shok Térmico
IFN-γ	Interferón-γ
IL	Interleucinas
ILE	Intervalo Libre de Enfermedad
ITAM	Secuencias Motivo de Activación
LAK	células asesinas activadas por linfocinas
MAGE	Antígeno tumor asociado aisladas inicialmente de melanoma
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
min.	Minutos
MMLV-RT	Transcriptasa Reversa
MMTV	Virus del Tumor Mamario del Ratón
MUC-1	Mucina

NK	Células Asesinas Naturales
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PHA	Fitohemaglutinina
PTKs	Proteínas Tirocinas Kinasas
RE	Receptor de Estrógenos
RNAm	RNA mensajero
SH2	Dominio src-homología 2
SSTF	Solución Salina Tamponada con Fosfatos
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 T cooperadora 2
TIL	Linfocitos Infiltrantes de Tumor
TMN	Clasificación en estadios clínicos en cáncer de mama

RESUMEN

Los pacientes con cáncer pueden expresar respuestas inmunes celulares anormales que afectan su competencia inmunológica. La caracterización del patrón de citocinas y la expresión de las proteínas de activación de células T en ganglios linfáticos no metastáticos y en el microambiente tumoral puede contribuir a determinar con precisión a nivel local o sistémico anomalías en la respuesta inmune en pacientes con cáncer. En este trabajo determinamos el patrón de citocinas y la expresión de proteínas de activación en el microambiente del tumor y compararlo con su expresión en los ganglios linfáticos regionales no metastáticos de pacientes con cáncer de mama. También estudiamos la expresión de diferentes marcadores tumorales con el objetivo de evaluar su posible asociación con factores supresores presentes en los tumores. La muestra estuvo comprendida por un total de 30 pacientes del sexo femenino, cuya edad media fue de alrededor 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 (77%) y las pacientes se encontraban en estadios tempranos de la enfermedad con una distribución del 47% y 53% en etapas I y II respectivamente. En un 20% de los casos se encontraron ganglios metastáticos. La expresión de citocinas, proteínas de activación y marcadores tumorales se determinó por RT-PCR, Western Blot e inmunohistoquímica, respectivamente. Los marcadores linfocitarios de superficie se estudiaron por citometría de flujo, el 50% de los sujetos tenían valores de CD3 fuera de su rango de referencia, mientras un 47% en el caso del CD8 y un 43% para el CD4. El promedio CD4/CD8 se encuentra invertido en cuatro sujetos, se trata en su totalidad de pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante, de ellos, uno en etapa I y los restantes en etapa II, uno de ellos con ganglios metastáticos. En el microambiente tumoral se observa mayor predominancia del patrón de respuesta TH2 que se manifiesta en un 53% de los casos a consecuencia de una mayor expresión de la IL-10; para el microambiente de ganglios linfáticos regionales se observa contrariamente una predominancia del patrón TH1 (40 % de los sujetos), a consecuencia de la expresión de IL-2 e IFN-

γ. La cadena CD3-ζ se expresó en 27/30 pacientes en los ganglios linfáticos regionales no metastáticos, 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. En los tejidos tumorales encontramos una relación directa entre IL-10 y los marcadores Bcl-2 y Bax, con este último, la asociación resultó estadísticamente significativa ($p < 0.05$). De los 22 sujetos que marcan IL-10 y para los que fue posible tener el marcaje con Bax, este último resultó ser también positivo en todos los casos y de los 23 sujetos que marcan IL-10 hay 18 (78%) que también marcan Bcl-2. Sin embargo, la relación de IL-10 con p53 resultó ser inversa, de los 23 sujetos que marcan IL-10 hay 17 (74%) que resultan negativos a p53. La presencia del RNAm de IL-10 en los tumores puede reflejar un papel inhibitorio en la función de las células T y su relación con los marcadores de apoptosis puede sugerir un incremento en la agresividad del tumor. La pérdida de expresión de los polipéptidos de CD3 (ζ y ε) pudiera estar relacionado 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 inmunoterapéuticas dirigidas contra una deficiencia específica.

ÍNDICE

LOCALIZACIÓN.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Estructura de la mama.....	4
2.2 El cáncer de mama.....	5
2.2.1 Tipos de cáncer de mama.....	6
2.2.2 Clasificación en estadios del cáncer de mama.....	7
2.2.2.1 TNM.....	7
2.2.2.2 Etapas clínicas.....	8
2.3 Epidemiología del cáncer de mama.....	9
2.3.1 Factores de riesgo para el cáncer de mama.....	13
2.3.2 Métodos de pesquisaje de cáncer de mama.....	15
2.4 Eventos genéticos y moleculares en la transformación neoplásica.....	15
2.4.1 Tipos de alteraciones genéticas que pueden ocurrir en las células de cáncer.....	17
2.5 Respuesta inmune anti-tumoral humana.....	19
2.5.1 Mecanismo de activación de células T en la respuesta inmune anti-tumoral.....	19
2.5.2 Molécula CD3, estructura y función.....	22
2.5.3 Expresión de las cadenas CD3-ε y CD3-ζ en diferentes tipos de cánceres humanos.....	24
2.5.4 Subpoblaciones Th1/Th2 y el papel regulatorio de su patrón de citocinas en cáncer.....	25
2.5.5 Las citocinas en la respuesta inmune antitumoral.....	29
2.5.5.1 Papel de IL-10 en cáncer.....	30
2.6 Inmunología del cáncer de mama.....	33
2.6.1 Infiltración de linfocitos.....	33
2.6.2 Ganglios linfáticos involucrados.....	34
2.6.3 Antigenicidad del tumor de mama.....	35

2.7 Alteraciones de la respuesta inmune en cáncer de mama.....	37
2.8 Evasión de la respuesta inmune del cáncer de mama.....	38
2.9 Apoptosis.....	40
2.9.1 Regulación de la apoptosis.....	40
2.9.2 Papel de p53.....	41
2.9.3 Familia de proteínas Bcl-2.....	44
2.9.4 Regulación de la apoptosis en cáncer de mama.....	45
2.9.4.1 Papel de p53 en la regulación de la apoptosis en cáncer de mama.....	46
2.9.4.2 Papel de la familia de Bcl-2 en la regulación de la apoptosis en cáncer de mama.....	47
2.10 Marcadores tumorales en cáncer de mama.....	49
3. HIPÓTESIS.....	54
4. OBJETIVOS.....	54
4.1 Objetivo general.....	54
4.2 Objetivos específicos.....	54
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
5.1 Pacientes y obtención de muestras.....	55
5.2 Citometría de Flujo.....	55
5.3 Extracción de RNA.....	56
5.4 RT-PCR.....	57
5.5 Extracción de proteínas.....	58
5.6 Método Bradford.....	59
5.7 Western Blot.....	59
5.8 Inmunohistoquímica.....	60
5.8.1 Receptor de Estrógenos.....	61
5.8.2 Her2/Neu.....	61
5.8.3 p53, Bax, Bcl-2 e IL-10.....	62
5.9 Análisis Estadístico.....	62
6. RESULTADOS.....	64
6.1 Características fenotípicas de las poblaciones de células T en sangre periférica.....	66
6.2 Expresión de citocinas en microambiente tumoral y de ganglios linfáticos regionales.....	68

6.2.1 Determinación del patrón Th1 o Th2 predominante en cada microambiente.....	73
6.2.2 Relación entre IL2 e IL10 dentro del mismo microambiente.....	75
6.2.3 Relación entre microambientes en cuanto a IL-10 e IL-2.....	77
6.2.4 Relación de la expresión de citocinas en el microambiente tumoral y en ganglios linfáticos con la presencia de ganglios metastasicos en las pacientes.....	78
6.3 Expresión de proteínas relacionadas con la activación de las células T en el microambiente tumoral y de ganglios linfáticos regionales.....	80
6.3.1 Determinación de la relación de CD3- ζ y CD3- ϵ con IL-10.....	83
6.3.2 Relación de la cadena CD3- ζ con los patrones Th1 y Th2 en tumor y en ganglio linfáticos regionales.....	86
6.3.3 Asociación de las diferentes formas de expresión de la cadena CD3- ζ con la expresión de IL-10.....	87
6.3.4 Asociación de la expresión de CD3- ϵ y CD3- ζ en las muestras de tumor, con el estado del marcador linfocitario CD3 en sangre periférica.....	91
6.4 Marcadores tumorales.....	92
6.4.1 Relación entre la expresión de algunos marcadores tumorales con el resto de los parámetros inmunológicos estudiados en las pacientes con cáncer de mama.....	103
6.5 Estimación de la supervivencia, el intervalo libre de enfermedad y posibles factores pronósticos.....	104
7. DISCUSIÓN.....	108
8. CONCLUSIONES.....	117
9. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	118
10. APÉNDICE.....	134