

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la segunda causa de cáncer más frecuente en el mundo y la quinta causa de mortalidad, si tenemos en cuenta los dos sexos. En el mundo la incidencia de cáncer de mama continúa en aumento y la mortalidad ha permanecido casi inalterada durante las últimas 5 décadas. Por lo tanto el cáncer de mama representa un problema serio de salud a nivel mundial (Parkin *et al* 2001).

A pesar del notable progreso en el conocimiento de las bases biológicas y bioquímicas del cáncer de mama, poco se ha concluido acerca del papel de la respuesta inmune en dicha neoplasia (Miller 1991). Sin embargo, es de gran importancia que los mecanismos inmunológicos puedan ser utilizados en el diseño de estrategias para el diagnóstico, evaluación pronóstica y terapéutica, en esta neoplasia (Rostein 1985).

El crecimiento progresivo del tumor se asocia con una inmunosupresión. 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. Sin embargo, los mecanismos que median la inmunosupresión en los pacientes con cáncer no son completamente conocidos.

En diferentes neoplasias se han descrito alteraciones en el receptor de antígenos de las células T (TCR) y en la vía de transducción de señales en estas células, específicamente disminución o ausencia de las cadenas ζ y ϵ de CD3 y alteración en la expresión y funciones de varias tirosinas quinasas de la vía. Estas alteraciones se han observado fundamentalmente en los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) y en los linfocitos tumor asociados (TAL) (Reichert *et al.* 1998).

Las citocinas participan en la regulación de la respuesta inmune; *in vivo*, son transcientes y se producen localmente, controlando la amplitud y duración de la

respuesta inmune (Rojas *et al.* 1999). La producción de citocinas también puede ser afectada en los pacientes con cáncer (James H *et al* 1993). Varios autores han reportado la presencia de IL-10 en el sitio del tumor en una variedad de cánceres humanos. IL-10 es una citocina inhibitoria 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.

Los marcadores tumorales se expresan o sobre-expresan debido al metabolismo alterado de las células tumorales, sus principales aplicaciones consisten en la detección, diagnóstico, monitoreo, clasificación, localización, pronóstico y seguimiento. Los marcadores tumorales también pueden estar relacionados con elementos del sistema inmune.

En este trabajo estudiamos el fenotipo de las células T de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama con el objetivo de tener una idea de su estado inmunológico general, también analizamos el estado inmunológico local a través del estudio del patrón de citocinas en el microambiente del tumor el cual se comparó con el patrón de citocinas que se obtuvo al estudiar los ganglios linfáticos regionales no metastáticos de las pacientes. Otro aspecto mediante el cual se evaluó el comportamiento inmunológico local en las pacientes fue el estudio de algunas de las proteínas de activación linfocitarias, cuya expresión resulta importante tanto para el ensamblaje del receptor de células T y por tanto para el reconocimiento antigénico, como para la activación de las células T, también se comparó con el comportamiento de este mismo parámetro en los ganglios linfáticos regionales no metastáticos. Finalmente se estudió la expresión de algunos marcadores tumorales y su relación con la expresión de la interleucina IL-10 por ser esta la citocina mayormente encontrada en el microambiente tumoral y ser básicamente supresora de la respuesta inmune. El estudio de estos parámetros resulta importante para entender la respuesta inmune que se produce en el microambiente tumoral la cual 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 la deficiencia inmunológica específica.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estructura de la mama

La mama está formada por una serie de glándulas mamarias, que producen leche tras el parto, y a las que se les denomina lóbulos y lobulillos. Los lóbulos se encuentran conectados entre sí por los conductos mamarios, que son los que conducen la leche al pezón, durante la lactancia. Las glándulas (o lóbulos) y los conductos mamarios están inmersos en el tejido adiposo y en el tejido conjuntivo, que junto con el tejido linfático, forman el seno. 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 .

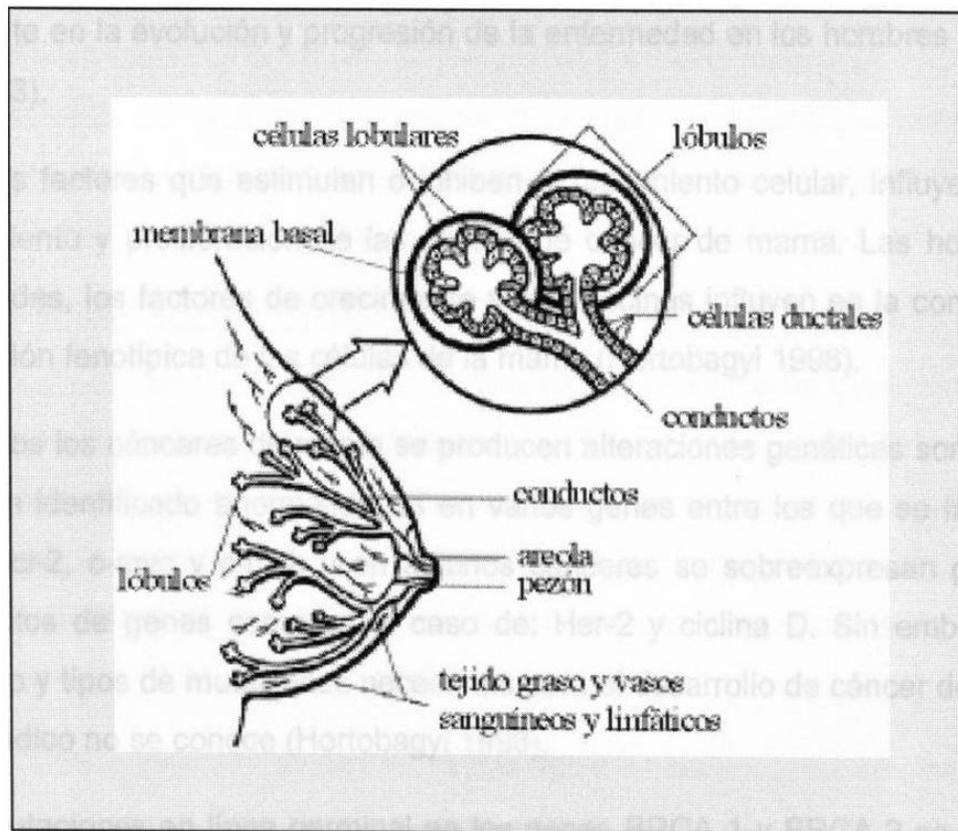


Figura 1: Estructura mamaria

2.2 El cáncer de mama

El cáncer de mama consiste en un crecimiento anormal y desordenado de las células del tejido mamario. Es un tumor de crecimiento lento que puede tomar hasta 8 años para alcanzar 1 cm de diámetro. Dentro de los tumores malignos, 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, un 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).

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 anomalías en varios genes entre los que se incluyen: p53, bcl-2, c-myc y c-myb y en algunos cánceres se sobreexpresan genes o productos de genes como es el caso de: Her-2 y ciclina D. 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 50 a un 85% del riesgo del cáncer de mama. No obstante, menos del 10% del total de los cánceres de mama son causados por mutaciones en línea germinal en los genes de susceptibilidad (Giannios y Ioannidou-Mouzaka 1997).

2.2.1 Tipos de cáncer de mama

El carcinoma 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. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas. 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) .

El carcinoma ductal infiltrante (o invasivo) es el que 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 70% de los casos de cáncer de mama. 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 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 (Elaton *et al.* 1991, Harris *et al.* 1993, Fitsgibbons *et al.* 2000).

El carcinoma lobular infiltrante (o invasivo) 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. Entre el 5% y el 10% de los tumores de mama son de este tipo (Elaton *et al.* 1991, Harris *et al.* 1993, Fitsgibbons *et al.* 2000).

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 (Harris *et al.* 1993).

El carcinoma mucinoso es un tumor de lento crecimiento, es un tipo de carcinoma ductal, el cual comprende cerca del 3% de todos los carcinomas de la mama. Se caracteriza por una alta expresión de mucinas (Gaffey *et al.* 1995).

El carcinoma inflamatorio del seno es un cáncer poco común, tan sólo se presenta en un 1% del total de los tumores cancerosos 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).

2.2.2 Clasificación en estadios del cáncer de mama

La clasificación en estadios de los tumores de mama es importante para la planificación de la estrategia terapéutica adecuada, estimar el pronóstico y permitir una comparación entre los diferentes programas de tratamiento (Harris *et al.* 1993). Existen dos tipos de clasificaciones:

2.2.2.1 TNM

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 un 0 o un 1, expresa si el cáncer se ha extendido a otros órganos distantes o a ganglios linfáticos no próximos a la mama.

2.2.2.2 Etapas clínicas

Etapa I: indica que el tumor es menor de 2cm y no hay metástasis (no se ha extendido).

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: Se produce cuando el cáncer se ha diseminado a otras estructuras del cuerpo. Los órganos en los que suele 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.

2.3 Epidemiología del cáncer de mama

Según los datos más recientes de incidencia y mortalidad disponibles, se estima que en el año 2000, se diagnosticaron aproximadamente 10 millones de casos nuevos de cáncer; fallecieron por esta enfermedad 6,2 millones de personas y se encontraban enfermas, viviendo con cáncer, alrededor de 22 millones (Parkin *et al*, 2000).

El cáncer de mama es la segunda causa de cáncer más frecuente, en el mundo, si unimos ambos sexos (10,4% del total), solo precedida por el cáncer del pulmón (12,3%). Se estima que se hayan diagnosticado 999 000 casos nuevos de cáncer de mama en el año 2000, el 22% de todos los nuevos casos de cáncer las mujeres, a escala mundial. Es a su vez la quinta causa de mortalidad por cáncer en ambos sexos, lo que representa 375 000 mujeres fallecidas, el 6% de todas las muertes por cáncer en el mundo, en ese sexo.

Por otro lado, debido a su relativo "buen pronóstico", es la localización de cáncer con la tasa de prevalencia a 5 años más alta en los países en desarrollo (77 por 100000), seguida por el cáncer de cérvix (53 por 100000) y el de estómago en los hombres (30 por 100000). El cáncer de mama y el resto de los cánceres ginecológicos representan el 52% de los casos de cáncer prevalentes tanto en países desarrollados como en desarrollo (Pisani *et al* 2000). Esto quiere decir que según estos estimados, existen en el mundo aproximadamente 3.7 millones de mujeres vivas, que han tenido en algún momento de sus vidas, un cáncer de mama; hecho importante si se compara con sólo 1,3 millones de sobrevivientes (hombres y mujeres), de cáncer del pulmón (Parkin *et al*, 2000).

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, como México, Argentina, Uruguay y Chile, 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 2 y 3 realizadas mediante el sistema GLOBOCAN³

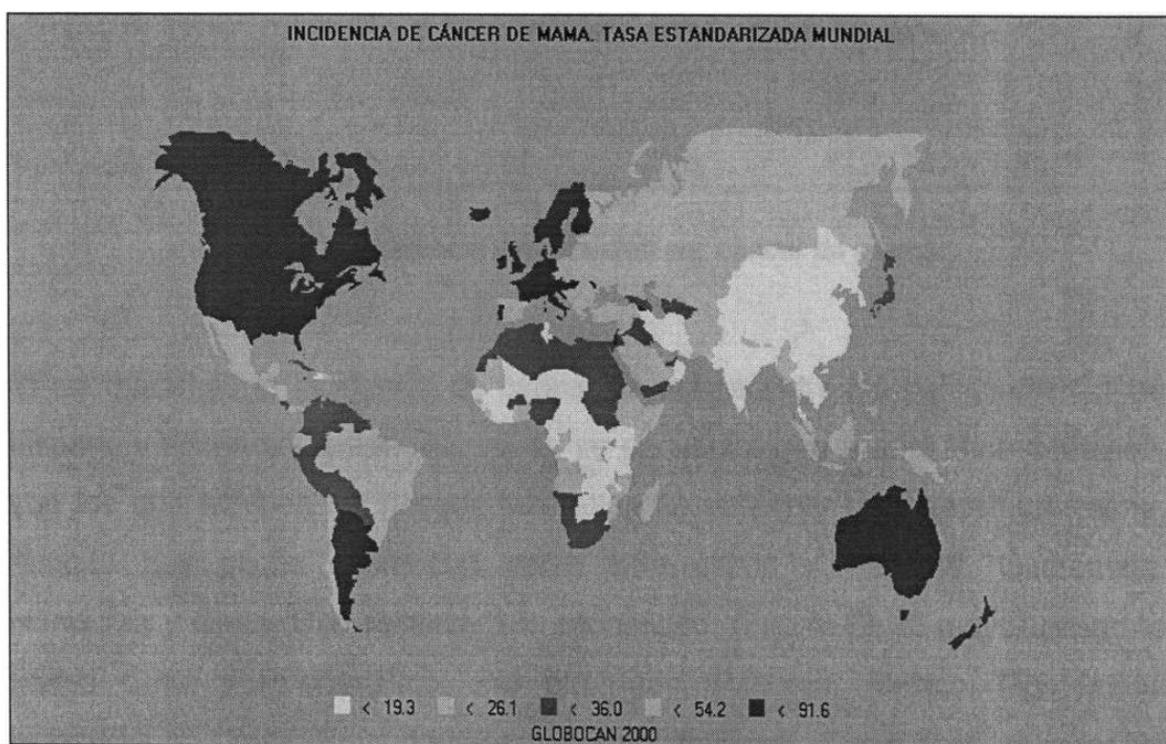


Figura 2: Incidencia mundial del cáncer de mama.

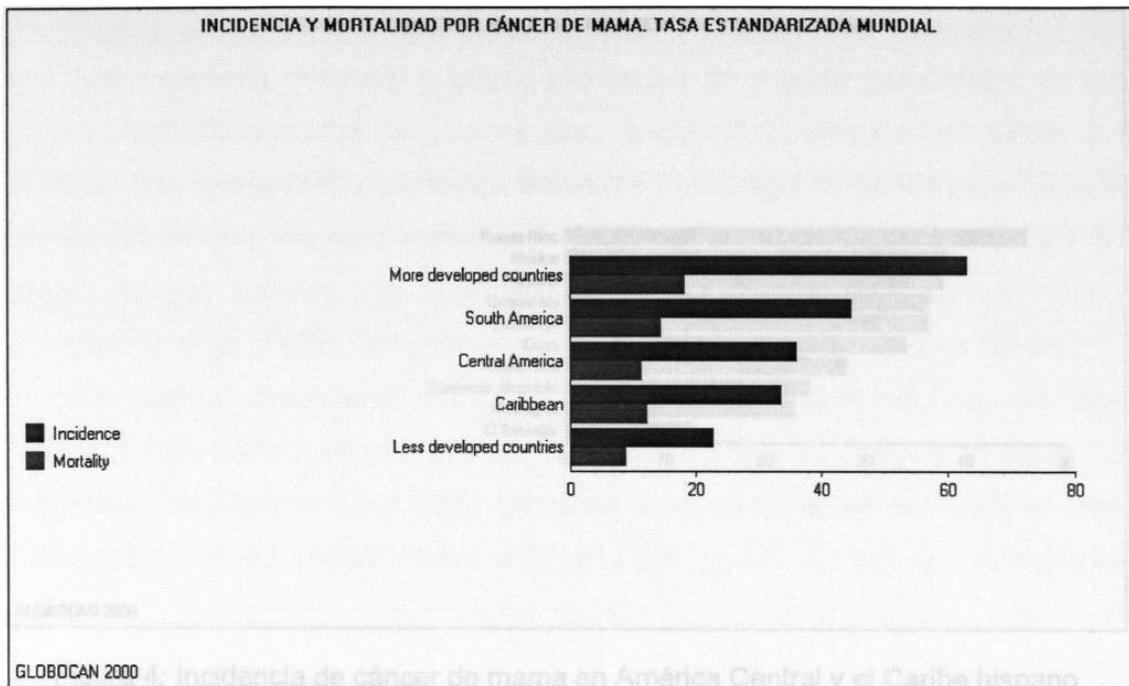


Figura 3: Incidencia y mortalidad por cáncer de mama.

Si comparamos la incidencia de cáncer de mama entre los países del Caribe hispano y América Central (Figura 4), se encuentra que Puerto Rico y México, son los que exhiben los riesgos más altos de enfermarse por cáncer de mama, aunque hay pocas diferencias entre este último y Panamá, Guatemala, Honduras y Cuba. Con relación a la mortalidad, (Figura 5), el mayor riesgo lo tienen Cuba y Puerto Rico. Por otro lado, Panamá, México, Guatemala, Honduras y Costa Rica presentan tasas similares. Cabe resaltar que las diferencias en cuanto a la mortalidad pueden estar influenciadas 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.

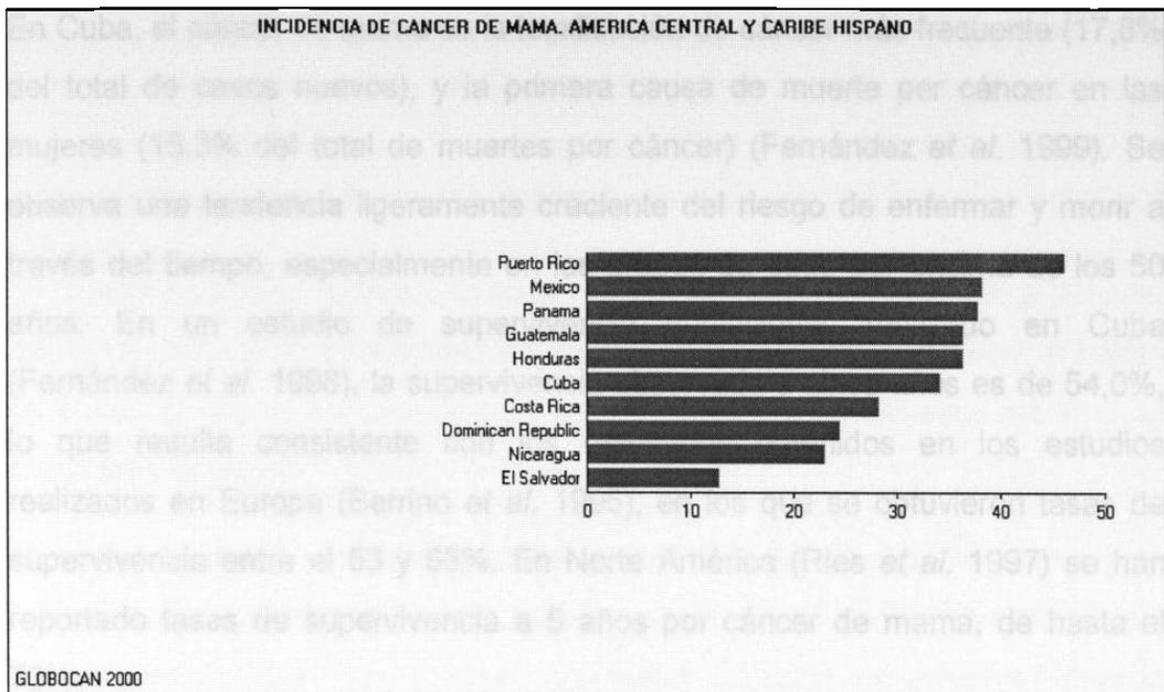


Figura 4: Incidencia de cáncer de mama en América Central y el Caribe hispano

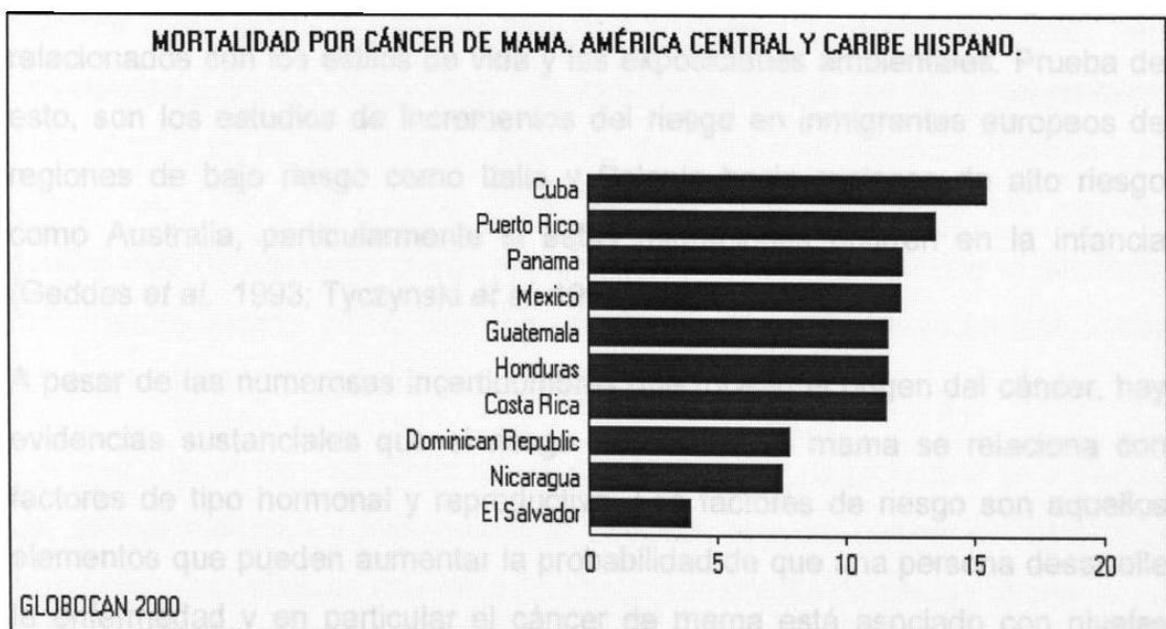


Figura 5: Mortalidad por cáncer de mama en América Central y el Caribe hispano

En Cuba, el cáncer de mama es la localización de cáncer más frecuente (17,8% del total de casos nuevos), y la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres (15,3% del total de muertes por cáncer) (Fernández *et al.* 1999). Se observa una tendencia ligeramente creciente del riesgo de enfermarse y morir a través del tiempo, especialmente en los grupos de edad por encima de los 50 años. En un estudio de supervivencia poblacional, realizado en Cuba (Fernández *et al.* 1998), la supervivencia observada a cinco años es de 54,0%, lo que resulta consistente con los resultados obtenidos en los estudios realizados en Europa (Berrino *et al.* 1995), en los que se obtuvieron tasas de supervivencia entre el 53 y 63%. En Norte América (Ries *et al.* 1997) se han reportado tasas de supervivencia a 5 años por cáncer de mama, de hasta el 73%.

2.3.1 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 Italia y Polonia hacia regiones de alto riesgo como Australia, particularmente si estas migraciones ocurren en la infancia (Geddes *et al.* 1993; Tyczynski *et al.* 1994).

A pesar de las numerosas incertidumbres que rodean el origen 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 *et al.* 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 (Parkin *et al.* 2000).

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.

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 entre 5% y 10% de todos los casos de cáncer de mama.

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 para evaluar si la

ingestión alta de productos lácteos, calcio, o vitamina D está asociado con el riesgo reducido de cáncer de mama. Los resultados arrojaron que la ingestión de productos lácteos, calcio, o vitamina D no se presentó asociado significativamente con el riesgo de cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas. En mujeres premenopáusicas sin embargo, el consumo de producto lácteos, sobre todo de leches de baja grasa, se presentó inversamente asociado al riesgo de cáncer de mama (Shin *et al.* 2002).

2.3.2 Métodos de pesquiasaje 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 pesquiasaje 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 *et al.* 2000).

2.4 Eventos genéticos y moleculares en la transformación neoplásica.

Las células normales se reproducen solamente cuando son inducidas a hacerlo por otras células en su vecindad, esta colaboración asegura que cada tejido mantenga un tamaño y una arquitectura apropiada a las necesidades del cuerpo. Las células de cáncer, por el contrario violan este esquema, escapan a los controles normales de la proliferación y siguen su propio ciclo de reproducción, ellas poseen la capacidad para migrar del sitio donde comienzan

a desarrollarse e invaden tejidos cercanos formando masas en sitios distantes. Los tumores formados por las células malignas, se hacen más agresivos en el tiempo y son letales, destruyen los tejidos y órganos necesarios para la supervivencia del organismo (Weinberg 1996, Rouslahti 1996).

Las células de cáncer tienen un grupo de características morfológicas y funcionales comunes. Dentro de las características morfológicas se encuentran: un gran núcleo, nucleolo prominente, apariencia indiferenciada y alto índice mitótico comparado con su contraparte de tejido normal. Tienen en común propiedades celulares como son: la proliferación celular no regulada, la invasividad y el potencial metastático (Raimond y Ruddon 1996).

La transformación maligna de las células de los mamíferos se acompaña por múltiples cambios o alteraciones en la membrana plasmática de las células, de naturaleza morfológica, funcional e inmunológica. Por ejemplo, cambios en la fluidez de la membrana, en la carga iónica de la superficie celular, la afinidad de unión a lectinas, permeabilidad celular y mecanismos de transporte, comunicación intercelular, enzimas asociadas a la superficie celular y receptores, movimientos de los componentes de la superficie celular, actividad de las proteasas asociadas a la superficie celular, adhesión celular a la matriz extracelular y reactividad con antibióticos (Raimond y Ruddon 1996). Muchos de estos cambios se producen en los carbohidratos de la superficie celular, los cuales se han asociado a una disminución en la adhesión de las células de cáncer, a la matriz celular y con el incremento de la invasividad y el potencial metastático de las células tumorales (Ruoslahti 1996).

Las células de un tumor descienden de un ancestral común, que en un punto, décadas antes de que el tumor se haga palpable, inicia un programa de reproducción inapropiada. La transformación maligna de una célula se produce por la acumulación de alteraciones en su aparato genético. Solamente en los últimos 25 años se han encontrado evidencias definitivas que caracterizan al cáncer como una enfermedad genética, esta se produce a través de un proceso multietapa en el cual la herencia, las mutaciones somáticas de los genes

celulares y la selección clonal de variantes de progenie con propiedades de crecimiento agresivo tienen la principal contribución. Se han descrito varios mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la alteración de la expresión genética observada en las células de cáncer (Weinberg 1996).

Existen dos clases de genes que juegan un importante papel en el cáncer: los proto-oncogenes los cuales favorecen su crecimiento mientras que los genes supresores de tumor lo inhiben (Vogelstein *et al.* 2000). Cuando los proto-oncogenes son mutados pueden convertirse en onco-genes carcinogénicos que conducen a la multiplicación excesiva (Raimond y Ruddon 1996). Las mutaciones pueden causar que los proto-oncogenes produzcan, en exceso, proteínas estimuladoras del crecimiento, o formas demasiado activa de estas. Los genes supresores, por el contrario, contribuyen al cáncer cuando son inactivados por mutaciones, resultando en la pérdida de proteínas supresoras funcionales e impidiendo a las células el freno que previene el crecimiento inapropiado (Macleod 2000). Las formas alteradas de otra clase de genes pueden también participar en la creación de una malignidad, específicamente permitiendo o capacitando a una célula proliferante a hacerse invasiva o capaz de metastizar a través del cuerpo (Vogelstein *et al.* 2000).

2.4.1 Tipos de alteraciones genéticas que pueden ocurrir en las células de cáncer

La mayoría de las características fenotípicas y funcionales que caracterizan a las células malignas son el resultado de alteraciones genéticas, las cuales incluyen alteraciones cromosómicas que se manifiestan por cambios en la ploidía, eventos de translocación y deleciones; cambios en el número de copias de un gen (amplificación) y alteraciones en la transcripción genética debido a mutaciones en las regiones promotoras o enhancer, además de reordenamientos e inserciones de secuencias reguladoras que alteran la transcripción de genes estructurales (Giannios y Ioannidov-Mouzaka 1997).

Anormalidades cromosomales: Se han observado en diferentes tipos de cánceres humanos, numerosas rupturas cromosómicas y reordenamientos, que involucran un número limitado de puntos de ruptura sugiriendo que ciertas regiones de los cromosomas humanos son más susceptibles que otras a daños por agentes carcinogénicos. La localización y fragilidad de esos sitios parece ser heredable y varios de ellos corresponden a puntos de ruptura observados frecuentemente en reordenamientos cromosómicos vistos en células de cáncer (Raymond y Ruddon 1996).

Translocaciones e inversiones: La multiplicidad de eventos de translocación en varios tipos de cánceres ha sugerido que tienen una relación crucial en la inducción del fenotipo de cáncer. Sin embargo algunas pueden ocurrir como eventos secundarios en la evolución de cambios fenotípicos más agresivos. La inestabilidad genética de las células malignas conduce a futuras anomalías cariotípicas según progresa la enfermedad. Reflejando alteraciones genéticas adicionales que incrementan el potencial de crecimiento (Raymond y Ruddon 1996).

El gen Bcl-2 es un oncogen identificado por la translocación t (14;18) observada en el linfoma folicular. Este gen está involucrado en la regulación de la proliferación y diferenciación de los linfocitos y actúa prolongando la supervivencia de las células (Osorio *et al.* 1997)

Deleciones cromosómicas: La mayoría de los defectos comunes observados en los tumores sólidos son deleciones en secuencias de genes específicos, pérdidas de una parte de una región de banda o la pérdida de la heterocigocidad de un alelo de un gen específico. Muchos de estos cambios genéticos vistos en los tumores sólidos resultan en activación de oncogenes celulares (Wenberg 1996). En algunos tumores con deleciones genéticas se puede perder un gen supresor de tumor. El gen p53 es un ejemplo de gen supresor de tumor que es mutado por deleción en una gran variedad de cánceres humanos, como es el caso del cáncer de mama (Lukas *et al.* 2000).

Amplificación genética: Un gen que usualmente está presente en una simple copia en las células normales puede ser hasta duplicado o sufrir un pequeño incremento en el número de copias. El gen HER-2 es un ejemplo de amplificación genética en cáncer de mama (Roos y Fletcher 1998).

2.5 Respuesta inmune anti-tumoral humana

2.5.1 Mecanismo de activación de células T en la respuesta inmune anti-tumoral

Existen fuertes evidencias que fundamentan el papel decisivo de los mecanismos celulares específicos en la respuesta efectora antitumoral humana. Estos mecanismos están representados fundamentalmente por los linfocitos T citotóxicos (Tc) con fenotipo CD8+ y los linfocitos T cooperadores (Th) con fenotipo CD4+ (Abbas *et al.* 2000).

El inicio de la respuesta inmune antitumoral requiere de la activación de las células T y en este proceso debe ocurrir el reconocimiento del péptido antigénico debidamente presentado por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), por medio del receptor de células T (TCR) y la molécula CD3 (complejo TCR/CD3); sin embargo, la señal liberada por la interacción del TCR con el antígeno tumor asociado, no es suficiente para producir proliferación y expansión clonal de células T específicas, se necesitan de otras señales de activación mediadas por varios miembros de la familia de moléculas de adhesión localizadas en las células T, entre las que figuran CD28, CTL4, CD80, CD11a/CD18, CD2, CD8, CD4, CD43, CD5, CD40L y CD6 (Greenberg y Zieyler 1991, Guckel *et al.* 1995, Osorio *et al.* 1995).

La posibilidad de que las moléculas coestimuladoras sirvan como una vía alternativa de la activación de las células T es de gran importancia para la inmunología tumoral ya que la incapacidad de una respuesta inmune protectora contra el tumor puede ser consecuencia de trastornos en la expresión de estas moléculas. Una de las razones de la pobre inmunoestimulación provocada por

las células tumorales puede deberse a un trastorno en las señales coestimuladoras (Guckel *et al.* 1995).

El reconocimiento por el complejo TCR/CD3 del péptido antigénico procesado y presentado adecuadamente en el contexto de las moléculas MHC y la segunda señal dada por las moléculas coestimuladoras, desencadenan una secuencia de eventos bioquímicos que comprende la fosforilación y desfosforilación de varias proteínas. Se han descrito dos familias de proteínas tirosina kinasas (PTK) involucradas en estos eventos; por ejemplo, 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) (figura 6).

Diversas evidencias experimentales actuales sustentan la hipótesis de que el compromiso de la función de linfocitos T en pacientes con cáncer, puede explicarse por anomalías en la transducción de las señales durante los eventos de activación. Puede existir disminución de los niveles de la p56^{lck}, de la p59^{fyn}, y de la cadena ζ del complejo TCR/CD3, lo que se ha evidenciado en los linfocitos que infiltran tumor (TIL) de algunas neoplasias (Zier *et al.* 1996)

La cascada de eventos bioquímicos que se desencadenan en el interior del linfocito, conduce finalmente a la generación de factores transcripcionales en el núcleo, causando la expresión de nuevos genes, incluyendo los de IL-2 y otras citocinas, lo que conduce a la proliferación linfocitaria y a la posterior diferenciación en linfocitos efectores (Janeway y Travers 1996) (figura 6).

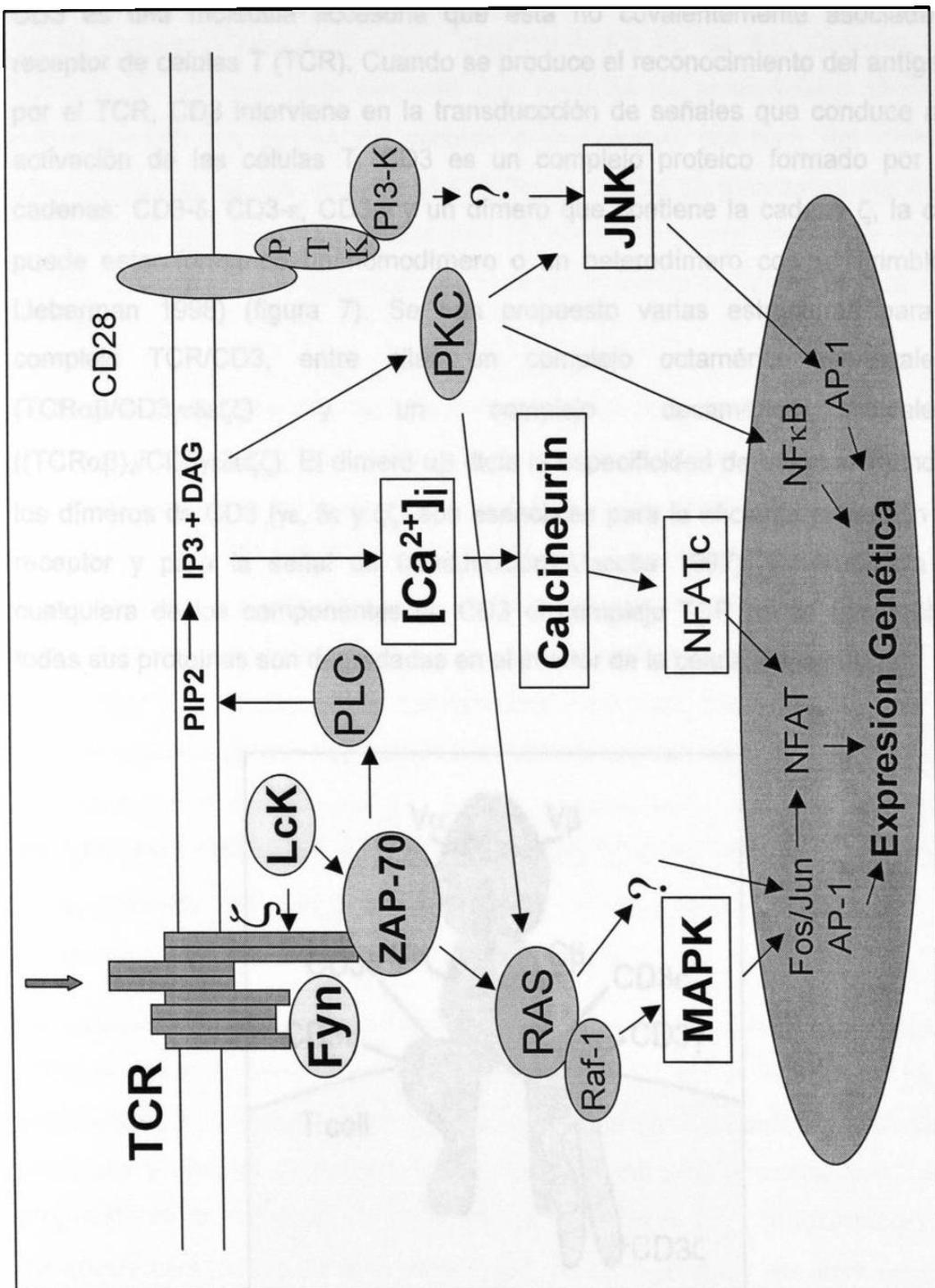


Figura 6: Vías de transducción de señales activadas por el TCR. (Adaptado de Osorio 1998).

2.5.2 Molécula CD3, estructura y función

CD3 es una molécula accesoria que está no covalentemente asociada al receptor de células T (TCR). Cuando se produce el reconocimiento del antígeno por el TCR, CD3 interviene en la transducción de señales que conduce a la activación de las células T. CD3 es un complejo proteico formado por las cadenas: CD3- δ , CD3- ϵ , CD3- γ y un dímero que contiene la cadena ζ , la cual puede estar formando un homodímero o un heterodímero con η (Trimble y Lieberman 1998) (figura 7). Se han propuesto varias estructuras para el complejo TCR/CD3, entre ellas un complejo octamérico monovalente ($\text{TCR}\alpha\beta/\text{CD3}\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$) y un complejo decamérico divalente ($(\text{TCR}\alpha\beta)_2/\text{CD3}\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$). El dímero $\alpha\beta$ dicta la especificidad de unión al ligando y los dímeros de CD3 ($\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ y $\zeta\zeta$) son esenciales para la eficiente expresión del receptor y para la señal de transducción (Jacobs 1997). 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).

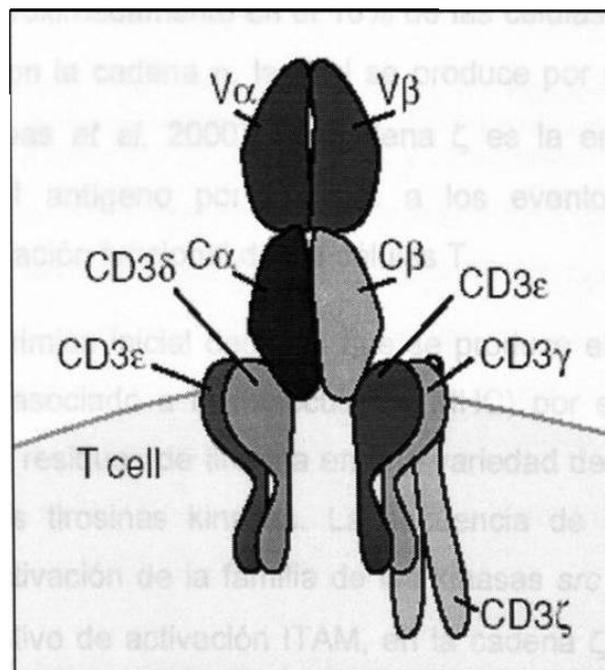


Figura 7: Estructura del complejo TCR/CD3

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 contienen un dominio de una secuencia motivo (ITAM) conservada que es importante 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 (ITAM), 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 ϵ y ζ son suficientes para la transducción de señales necesaria para la activación de las células T. La cadena ζ es normalmente expresada como un homodímero, pero en ratones aproximadamente en el 10% de las células T se expresa como un heterodímero con la cadena η , la cual se produce por un splice alternativo del gen de ζ (Abbas *et al.* 2000). 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.

La respuesta bioquímica inicial después que se produce el reconocimiento del antígeno (péptido asociado a la molécula de MHC) por el TCR es la rápida fosforilación de los residuos de tirosina en una variedad de sustratos, llevada a cabo por proteínas tirosinas kinasas. La secuencia de eventos que se ha propuesto 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).

2.5.3 Expresión de las cadenas CD3- ϵ y CD3- ζ en diferentes tipos de cánceres humanos

Se ha demostrado en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas anomalías funcionales en sus linfocitos obtenidos de células MNP y de ganglios linfáticos, 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 (Nieland *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 de ovario, renal, cervical, colorectal, cáncer de próstata y melanoma. (kuss *et al.* 1999)

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.* 1998)

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).

Existen evidencias de la asociación de la cadena CD3- ζ con el patrón de citocinas. En pacientes con carcinoma cervical y neoplasia intraepitelial cervical se observó una down regulación de la expresión de citocinas Th1 en linfocitos

deficientes de CD3- ζ al ser cultivados con anti-CD3, mientras que no se observó afectación en los niveles de citocinas Th2 (IL-10) (Nieland *et al.* 1998).

Estudios preliminares indican que la reducción en la expresión de CD3- ζ también se produce en algunas enfermedades autoinmunes y en infección por HIV (Trimble y Lieberman 1998); esto le ha sugerido a algunos investigadores que estas anomalías de CD3- ζ pueden reflejar una disregulación de la función inmune común a estados de deficiencia inmunológica (Nakagomi *et al.* 1993).

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).

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 IL-2, anti-CD3, anti-CD2 y PHA. (Matsuda *et al.* 1995, Kono *et al.* 1996). No obstante, Grujil (1999) no observó disminución en los niveles de expresión de la cadena CD3- ϵ , lo que le permitió utilizarla como control positivo para compararla con la disminución en la expresión de CD3- ζ en pacientes con carcinoma cervical (De Grujil *et al.* 1999).

2.5.4 Subpoblaciones Th1/Th2 y el papel regulatorio de su patrón de citocinas en cáncer

Los linfocitos T cooperadores (Th) pueden ser clasificados en dependencia del patrón de citocinas que producen, definiéndose 2 poblaciones fundamentales: células Th1 que producen IL-2 e IF- γ y células Th2 que producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (Mosmann and Coffman 1989). Estas poblaciones celulares pueden

diferenciarse a partir de las células Th0 (no estimulada con el antígeno), a través de vías controladas de diferenciación que involucran citocinas y moléculas co-estimuladoras (Lucey *et al.* 1996).

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 productoras de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, 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).

Recientes investigaciones han sugerido que las moléculas co-estimuladoras en la activación de células T pueden influir en la expresión de una citocina en particular. Existen evidencias que fundamentan que la interacción del CD28 con B7-1 o con B7-2 puede determinar la diferenciación a célula Th1 o Th2 (Mosmann and Sad 1996).

En general, se conoce que las citocinas producidas por las células Th2 favorecen el desarrollo a Th2 e inhiben el desarrollo de las Th1, mientras que las producidas por células Th1 dan lugar a la diferenciación a células Th1 e inhiben el desarrollo a Th2 (Hainaut *et al.* 1990). Este mecanismo regulatorio puede implicar también el control de la síntesis de otras citocinas, por ejemplo, las células Th2 por la acción de la IL-10 que producen; pueden bloquear la proliferación y activación de las células Th1, actuando sobre macrófagos y bloqueando la síntesis de TGF- β y de IL-12, que son potentes inductores de células Th1 (Sher *et al.* 1992, Manetti *et al.* 1993).

Sin duda, existe un complejo mecanismo regulatorio entre las subpoblaciones celulares y el predominio de una sobre la otra deriva la respuesta a

mecanismos inmunes celulares o humorales, en dependencia de los patrones de citocinas que predominen. Esta interconexión entre las citocinas y la polarización de la respuesta a Th1 o Th2 juega un importante papel en diferentes patologías humanas; entre las que figuran enfermedades infecciosas, autoinmunes, SIDA y diferentes neoplasias (Modlin and Nutman 1993).

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). Cáncer de cérvix, carcinoma cutáneo de célula basal, síndrome de Sezary, enfermedad de Hodgkin's, mieloma múltiple, carcinoma de pulmón y carcinoma renal, son ejemplos de neoplasias en donde se han reportado un predominio de citocinas Th2 con efectos supresores sobre la respuesta inmunitaria (Chen *et al.* 1994, Smith *et al.* 1994, Bost *et al.* 1995, Huettnner *et al.* 1995, Kim *et al.* 1995, Nakagomi *et al.* 1995, Lucey *et al.* 1996). 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 sobre las células tumorales (figura 8).

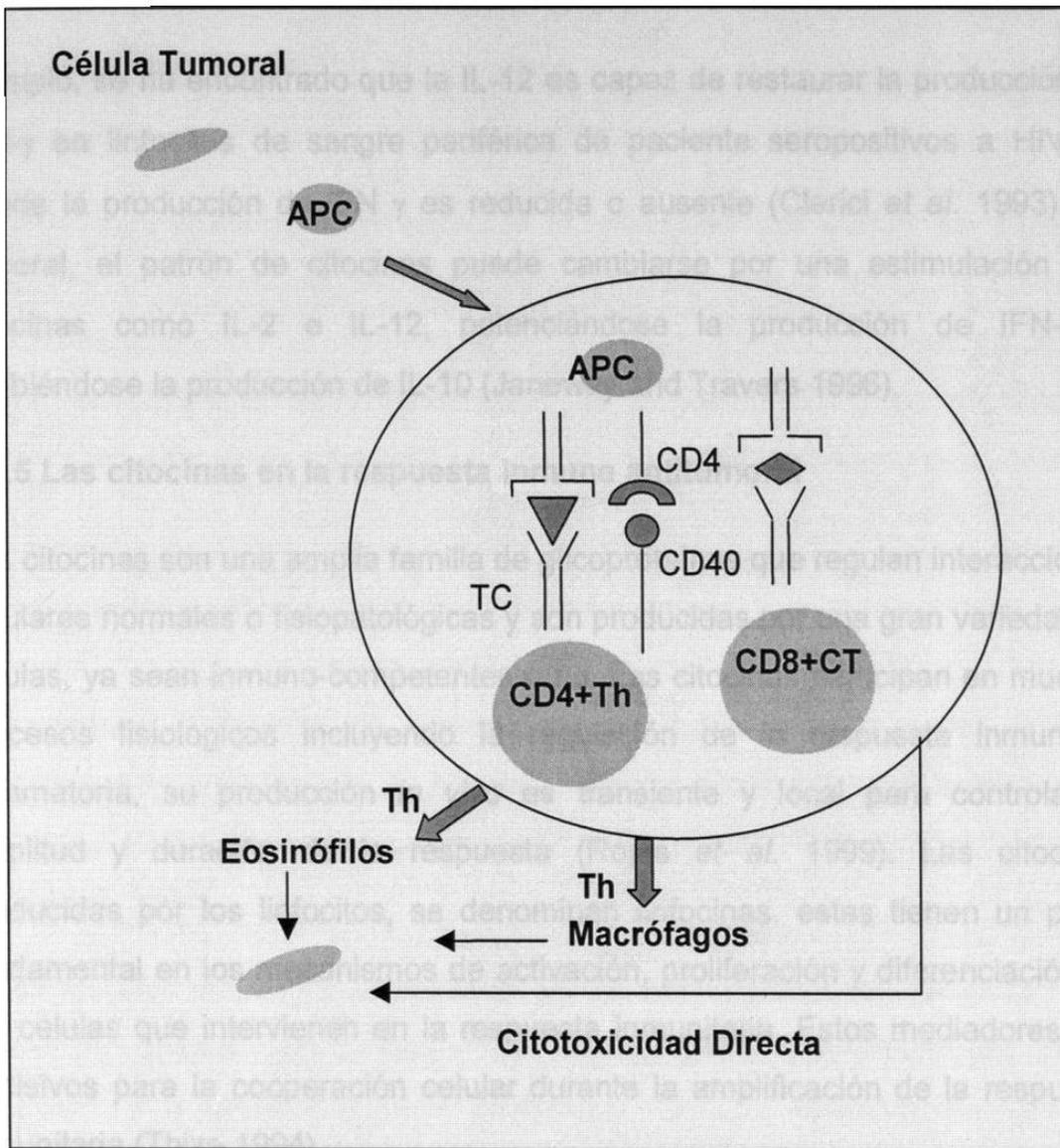


Figura 8: Respuesta inmune antitumoral (Adaptado de Pardoll y Topalian 1998).

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.

Tomando en cuenta que la inmunidad celular es activada por citocinas Th1 y que las citocinas Th2 tienen una acción supresora es necesario buscar alternativas que puedan modificar los perfiles de estos mediadores en el microambiente del tumor y a nivel sistémico. Existen varias evidencias que indican que es factible modificar un patrón pre-existente de citocinas Th2, por

ejemplo, se ha encontrado que la IL-12 es 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). En general, el patrón de citocinas puede cambiarse por una estimulación con citocinas como IL-2 e IL-12, potenciándose la producción de IFN- γ e inhibiéndose la producción de IL-10 (Janeway and Travers 1996).

2.5.5 Las citocinas en la respuesta inmune antitumoral

Las citocinas son una amplia familia de glicoproteínas que regulan interacciones celulares normales o fisiopatológicas y son producidas por una gran variedad de células, ya sean inmuno-competentes o no. Las citocinas participan en muchos procesos fisiológicos incluyendo la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria, su producción *in vivo* es transiente y local para controlar la amplitud y duración de la respuesta (Rojas *et al.* 1999). Las citocinas producidas por los linfocitos, se denominan linfocinas, estas tienen un papel fundamental en los mecanismos de activación, proliferación y diferenciación de las células que intervienen en la respuesta inmunitaria. Estos mediadores son decisivos para la cooperación celular durante la amplificación de la respuesta inmunitaria (Thize 1994).

Recientemente se han clasificado en diferentes grupos: citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , TNF- α e IFN- α ; citocinas tipo 1, como, IL-12, IFN- γ , IL-2 y TNF- β ; citocinas tipo 2, como, 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 y los factores de crecimiento son importantes moduladores de la respuesta inmune, su expresión por los linfocitos infiltrantes de tumor puede conferir ventaja al tumor para crecer y suprimir la actividad citotóxica de estos linfocitos. El análisis de los factores solubles en el microambiente del tumor

puede ayudarnos en la comprensión de la conducta del tumor y pudieran resultar útiles como factores pronósticos (Marrogui *et al.* 1997).

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 cánceres como es el caso de melanomas, leucemias y carcinomas gástrico y de ovarios (Huang *et al.* 1999).

La secreción de ciertas citocinas, particularmente IL-6, IL-10 y TNF- α , provocan resistencia a los efectos de citotóxicos de las drogas quimioterapéuticas. 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).

La producción de citocinas también se ha documentado en pacientes con cáncer de mama. 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 ha sido observada en los linfocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama (Rosen *et al.* 1998). La expresión de las citocinas: IL-8, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α y TGF- β también ha sido observada en pacientes que padecen esta neoplasia (Green *et al.* 1997, Marrogi *et al.* 1997, Kurtzman *et al.* 1999).

2.5.5.1 Papel de IL-10 en cáncer

Varios autores han reportado la presencia de IL-10 en el sitio de tumores en una variedad de cánceres humanos incluyendo melanoma, cáncer de mama, carcinoma de pulmón de células no pequeñas y carcinoma renal (Huang *et al.* 1995).

A través de una variedad de mecanismos la IL-10 puede prevenir la generación de una respuesta inmune celular productiva. La activación de células T antígeno específicas en presencia de IL-10 se diferencian a fenotipo T-cooperador capaz de bloquear la proliferación de las células T tanto *in vitro* como *in vivo*. Suprime la actividad tumoricida de los macrófagos, inhibe la citotoxicidad y la producción de citocinas por las células específicas de tumor (Gastman *et al.* 1999).

La 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 down 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). 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 down regula el IFN- γ constitutivo y la 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 H₂O₂ y de NO₂⁻ por los macrófagos (Castro *et al.* 2000, Hashimoto *et al.* 2001). Beker (1993) demostró la asociación de la 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). Esos resultados indican que la IL-10 es una citocina inhibitoria de la función inmune celular.

Teniendo en cuenta los datos que apoyan la capacidad de la IL-10 para suprimir la respuesta inmune celular se puede especular que la IL-10 permite el crecimiento progresivo del tumor previniendo la generación de una respuesta inmune celular específica contra el tumor.

No obstante los efectos supresores de IL-10, se han obtenido resultados contradictorios con relación a las funciones de esta citocina; se ha observado que incrementa varias funciones celulares como es el caso de la inducción de Fc γ RI y Fc γ RIII, lo cual está relacionado con la clarificación de complejos inmunes y la actividad citotóxica de monocitos humanos. También estimula el crecimiento de células B y sirve como un cofactor con IL-2, IL-4 e IL-7 para promover el crecimiento de timocitos murinos y células T maduras y junto con IL-3 o IL-4 en estimular la proliferación de células cebadas. IL-10 se ha reportado que previene la apoptosis de células T y de células B en los centros germinales (Hashimoto *et al.* 2001).

Previamente se reportó a IL-10 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. Se ha observado que el tratamiento de macrófagos murinos con anti-IL-10 disminuyó la viabilidad celular y la expresión de Bcl-2, mientras incrementó la activación de la caspasa 1, la expresión de p53 y el número de células productoras de TNF- α . Estos resultados muestran que IL-10 es capaz de rescatar a las células de la apoptosis down regulando la cascada de proteasas (Rojas *et al.* 1999).

La producción de IL-10 en el sitio del tumor puede ser utilizado por el tumor para impedir su destrucción por el sistema inmune. 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. La capacidad de la IL-10 para inhibir la generación de respuesta inmune en el sitio del tumor tiene importantes implicaciones con respecto a la inmunoterapia local del cáncer (Gastman *et al.* 1999).

2.6 Inmunología del cáncer de mama

2.6.1 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; se han encontrado también pocos linfocitos B, células NK y macrófagos. La expresión de HLA-DR, CD25 y CD71 (receptor de transferrina) en la mayoría de los TIL obtenidos en cáncer de mama sugiere que las células T han sido activadas *in vivo*. Sin embargo el hecho de que no se detenga el crecimiento del tumor sugiere deficiencias en la función o el número de los TIL. Existen evidencias que apoyan esta observación, por ejemplo, TIL frescamente aislados muestran pobre citotoxicidad contra células tumorales autólogas o alogénicas y pobre respuesta proliferativa frente a mitógenos y estimulación alogénica; aunque los niveles de citotoxicidad de los TIL pueden ser aumentados por estimulación con IL-2 recombinante. La expresión selectiva de citocinas por los TIL se ha reportado en melanoma y tumores de ovario y cerebro. La producción local de citocinas por los TIL en el microambiente del tumor es crucial en el desarrollo de una respuesta inmune frente a las células tumorales y la presencia de las citocinas supresoras puede impedir esta respuesta efectora. Por lo tanto el hecho de que no se pueda estimular la producción de determinada citocina puede inhibir la función de los TIL dirigidos contra las células tumorales y esto puede conferir ventaja al tumor para crecer y suprimir la actividad citotóxica de los linfocitos infiltrantes (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 se ha obtenido que la infiltración predijo una supervivencia libre de recurrencia para los tumores de mama de rápida proliferación. (Hadden 1995)

2.6.2 Ganglios linfáticos involucrados

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

Es conocido que el estado de los ganglios linfáticos regionales es el factor pronóstico más importante en cáncer de mama (Kuter 2001). La presencia de ganglios linfáticos positivos incrementa el riesgo de metástasis a distancia. El pronóstico está muy relacionado al tamaño del tumor y al estado de los ganglios linfáticos axilares; por ejemplo, el pronóstico de pacientes con tumores pequeños y ganglios negativos es excepcionalmente bueno, no siendo así en el caso de tumores mayores de 2 cm. Los pacientes con ganglios negativos tienen una mayor probabilidad de supervivencia que los pacientes con ganglios involucrados (Harris *et al.* 1993).

Black y colaboradores habían sido los primeros en observar una correlación entre la supervivencia de pacientes con cáncer de mama y ciertas características de sus ganglios linfáticos axilares. Encontró que 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 implican la presencia de mecanismos inmunes celulares relacionados al cáncer de mama, los cuales pudieran significar una respuesta inmune a los antígenos tumor asociados (Black y Speer 1960).

2.6.3 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. No obstante, existe una variedad de antígenos que han sido identificados en los cánceres humanos, los cuales pueden ser reconocidos por los linfocitos T y B, tales antígenos se clasificaron inicialmente de acuerdo a su patrón de expresión (Boon y 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 desregulada.

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 (Vogelstein *et al.* 1996).

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 desregulan a 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 encontraron anticuerpos circulantes y CTL específicos para MAGE-1 (Strong 1999, Abbas *et al.* 2000).

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, Strong 1999, Abbas *et al.* 2000).

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, esos epítopes peptídicos inducen respuestas de células T y anticuerpos en los pacientes y son considerados como candidatos vacunales (Hadden 1995, Strong 1999, Abbas *et al.* 2000).

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).

2.7 Alteraciones de la respuesta inmune en cáncer de mama

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

La mayoría de los autores plantea que los mecanismos de respuesta inmune celular son los más importantes en el control de la progresión del tumor de mama (Breitmeyer 1991), siendo los linfocitos T los protagonistas de dicha respuesta (Greenberg y Zieyler 1991). Diversos investigadores han reportado alteraciones de las subpoblaciones T, con inversión de la relación CD4:CD8 tanto en linfocitos periféricos, linfocitos que drenan de ganglios (DLN) y en

linfocitos que infiltran el tumor (TIL) (Mantovani *et al.* 1989, Dadmarz *et al.* 1995; Whiteside y Parmiani 1994).

Estudios celulares han revelado diversas alteraciones funcionales en pacientes con cáncer de mama como: la depresión de la respuesta cutánea a antígenos de memoria (Faxas *et al.* 1987), el deterioro de la respuesta proliferativa frente a mitógenos (Rostein *et al.* 1985, Fernández *et al.* 1986), un incremento en la actividad supresora con presencia de factores séricos supresores (Rostein *et al.* 1985), disminución de los efectos líticos de los CTL (Schwartzentrubart *et al.* 1992), una disminución de la actividad NK (Beitsch *et al.* 1994) y de las células asesinas activadas por linfocinas (LAK) (Schwartzentrubart *et al.* 1992) alteraciones celulares debidas a factores supresores como las prostaglandinas y la IL-10 (Hadden 1995). Se ha descrito en éstas pacientes una disminución de la expresión en superficie de la molécula CD6 de linfocitos T de sangre periférica y ganglios (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).

2.8 Evasión de la respuesta inmune del 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 (Donegan 1992, Volpi *et al.* 2000), MAGE-1 y MUC-1(Hadden 1995), además las células T CD4⁺ y CD8⁺ se han identificado como componentes de los TIL en los tumores de mama. 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 la detección y/o destrucción (Strong 1999).

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 downregulación de antígenos específicos o de moléculas de 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. Un mecanismo alternativo de los tumores puede ser la secreción de moléculas inmunosupresoras como la IL-10 y el TGF- β o directamente destruyendo 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).

El microambiente es crítico para la estimulación de una respuesta inmune antitumoral efectiva mediada por células T (Baruch 2003). La presentación de los antígenos a las células T por las células presentadoras debe incluir la participación de moléculas coestimuladoras tales como B7 en las células APC con CD28 en las células T. La detección del antígeno en ausencia de esta señal puede resultar en tolerancia. La liberación de citocinas como IL-12, GM-CSF (por las APC), IL-2, 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. Finalmente para que los linfocitos T citotóxicos sean capaces de reconocer sus blancos, las células del tumor tienen un complejo MHC clase I para la presentación de los antígenos tumorales (Strong 1999).

2.9 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 parcial, se produce agregación de la cromatina y desorganización del citoesqueleto, la célula se encoge y se fragmenta en los llamados cuerpos apoptóticos 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 apoptóticos no inducen cantidad significativa de citocinas (Israels e Israels 1999, Nomura *et al.* 1999).

2.9.1 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).

2.9.2 Papel 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 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 (figura 9) (Hall 1998).

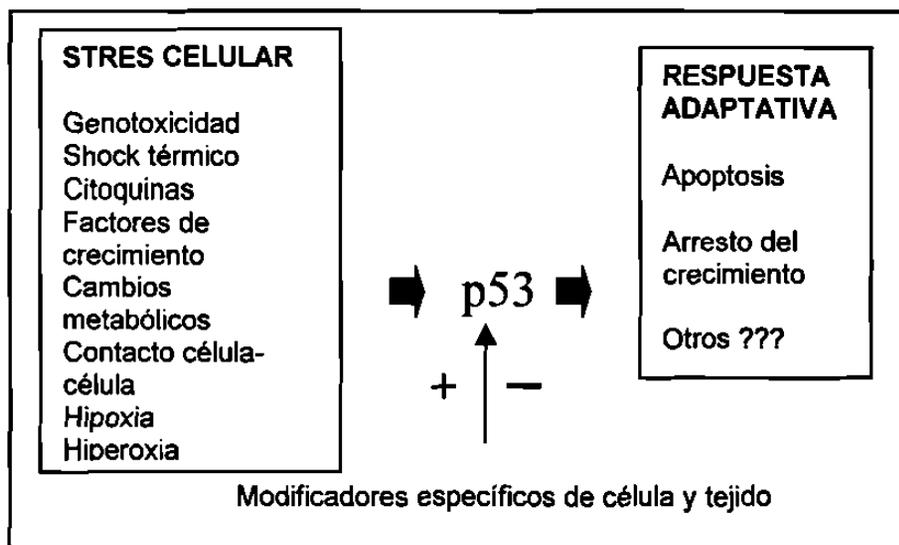


Figura 9: Respuesta de p53 frente al stress celular (Adaptado de Hall 1998).

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 quimioterapéuticas, 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 covalente 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 es no reparable, p53 lleva a cabo su papel de conducir a la célula a apoptosis (Israels e Israels 1999) (figura 10).

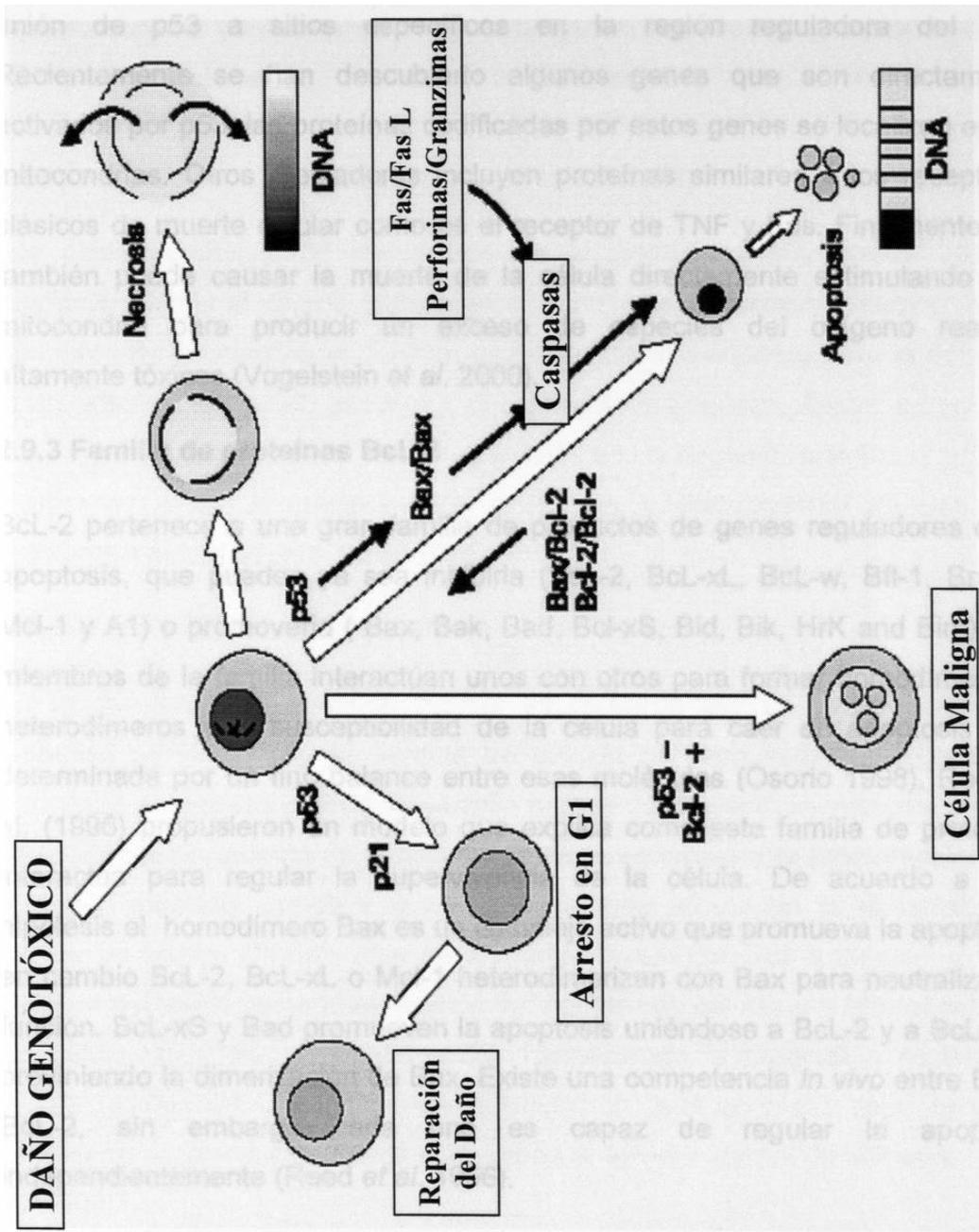


Figura 10: Vías que conducen a la apoptosis cuando se produce un daño no reparable.
 (Adaptado de *Israels e Israels 1999*)

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).

2.9.3 Familia de proteínas Bcl-2

Bcl-2 pertenece a una gran familia de productos de genes reguladores de la apoptosis, que pueden ya sea inhibirla (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1, Bcl-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, uniéndose al factor Apaf-1 y activándolo, este a su vez activa la caspasa-9 y esta a las casapasas downstream incluyendo la caspasa-3, responsable de los cambios citosolicos característicos de la apoptosis (Israels e 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. También se ha sugerido que Bcl-2 pudiera ejercer su actividad antiapoptotica inhibiendo la translocación de Bax a la membrana mitocondrial (Osorio 1998).

2.9.4 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 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 sobreexpresión de Her-2 sobrerregula los genes anti-apoptóticos 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, anomalías 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 quimioterapéuticos 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 upregulación de p53. Los inhibidores de la apoptosis que sobrerregula a Bcl-2 o inhiben las caspasas pueden jugar un papel en el crecimiento del tumor y la resistencia a drogas (Israels e Israels 1999).

2.9.4.1 Papel 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.* 2002). 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 apoptótica 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 frecuencia de mutaciones de p53 en cáncer de mama, estas son 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 upstream y en proteínas downstream inducidas por p53 que comprometen la función normal de la proteína (Gasco *et al.* 2002).

2.9.4.2 Papel de la familia de Bcl-2 en la regulación de la apoptosis en cáncer de mama

La sobreexpresión 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 desregulan 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 el cual 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).

Bcl-2 juega un papel 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 en cáncer de mama con un incremento de la muerte celular por necrosis y por apoptosis, con una alta velocidad de proliferación y un alto grado de tumor. 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). Antiestrogénos como el tamoxifen inducen la apoptosis en células de cáncer de mama downregulando 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 antiapoptótica, el RNAm y la concentración de esta proteína se han encontrado sobreexpresados en líneas celulares humanas de cáncer de mama (Kumar *et al.* 2000).

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).

2.10 Marcadores tumorales en cáncer de mama

Los parámetros clínicos tales como el tamaño del tumor y el estado de los ganglios linfáticos, han sido usados para caracterizar el fenotipo de los tumores de mama con relación al pronóstico. Sin embargo ha sido importante establecer factores pronósticos adicionales que permitan separar a los pacientes en grupos de acuerdo al riesgo de recurrencia, al tipo de terapia, entre otros parámetros. Por lo tanto la utilización de los marcadores tumorales ha sido de gran utilidad para caracterizar los tumores de mama.

Los marcadores tumorales se expresan o sobre-expresan debido al metabolismo alterado de las células tumorales, sus principales aplicaciones consisten en la detección, diagnóstico, monitoreo, clasificación, estadificación, 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). Estos factores de crecimiento no son antigénicos pero por estar localizados en la superficie de las células tumorales, algunos 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 con un factor de transcripción activado por ligando, interactúa uniéndose a elementos de respuesta a estrógenos en la región del promotor de genes específicos. Las señales extracelulares también pueden estimular la transcripción mediada por RE- α en ausencia de estrógenos (Gross y Douglas 2002).

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 porcentaje elevado de los pacientes con tumores positivos a RE- α (tumores muestran crecimiento dependiente de estrógenos) responden a la terapia con antiestrogenos, 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 y 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, este receptor muestra homología con el receptor del EGF. Es una glicoproteína transmembranal de 185 KD que tiene actividad tirosina kinasa y 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. Hasta la fecha no se ha identificado el ligando de este receptor (van der Geer 1994).

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 y consecuentemente a una sobreexpresión de esta en la superficie celular. 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 receptor se encuentra activado en un 20-30% de los cánceres de mama. 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. Her-2 se ha encontrado sobreexpresado en el 30% de los pacientes con cáncer de mama que presentan metastasis. La sobreexpresión de Her-2 también se ha asociado con un fenotipo negativo a RE. 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 pronóstico. Esta proteína receptor también se ha utilizado, con éxito, como blanco para la terapia anticancer en pacientes con cáncer de mama (Livingston y Esteva 2001).

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

Un importante marcador lo constituye también la p53, codificada por el gen supresor de tumor p53. La sobreexpresión de esta proteína resulta de la mutación génica y estabilización de la proteína, este aumento en la estabilidad de la p53 mutada propicia su efectiva localización por técnicas inmunohistoquímicas utilizando AcMs contra dicha proteína; su sobreexpresión se asocia con rápida proliferación celular y un mal pronóstico. La p53 es un antígeno nuclear pero puede formar un complejo con la Heat Shock Protein (HSP) 70 (proteína de choque térmico de 70kD) y expresarse en la superficie de la célula (Peyrat *et al.* 1995).

Las mutaciones en el gen p53 han sido observadas en el 37% de los carcinomas de mama especialmente en los tumores más avanzados y/o más

agresivos. Estos autores reportaron una correlación no significativa entre la expresión de p53 y el tamaño del tumor, los ganglios linfáticos involucrados y el tipo histológico. Otros investigadores han encontrado una asociación estadísticamente significativa entre las alteraciones de p53 y 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. Concluyendo que las anomalías de p53 pueden ser usadas como un indicador pronóstico de acortamiento de la supervivencia y la recurrencia. También se han postulado que las mutaciones de p53 localizadas en la zona que directamente contacta con el DNA predicen un mal pronóstico. En otro estudio se observó que los tumores con alteraciones en p53 tuvieron una conducta altamente agresiva y estas alteraciones fueron un marcador pronóstico de recaída temprana y muerte. 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. El papel del bcl-2 en el desarrollo y progresión del cáncer mamario esta aún sin aclarar y parece estar muy relacionado con la expresión de otros marcadores. (Binder *et al.* 1995). Leek encontró una correlación directa entre la expresión de Bcl-2 y la presencia de RE en carcinoma de mama. Otros autores han reportado fuerte expresión de Bcl-2 en tumores pequeños, de lento crecimiento, positivos a receptor de estrógenos y negativos a p53. También ha sido demostrado en líneas celulares humanas de carcinoma de mama que p53 down regula la expresión de Bcl-2 (Coppola *et al.* 1999).

La proteína Bcl-2 no se ha correlacionado con el tipo de tumor de mama. 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). Lipponen (1995) también había observado una correlación significativa entre la expresión de Bcl-2 y los ganglios linfáticos axilares (Lipponen *et al.* 1995). 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). En cambio, otros estudios han observado una correlación positiva entre la expresión de Bcl-2 y muchas características pronósticas favorables en cáncer de mama. Por otra parte, Hellemans (1995) observó un mayor intervalo libre de enfermedad y una mayor supervivencia en pacientes con tumores positivos a Bcl-2. Otros estudios han reportado que los tumores positivos a Bcl-2 tienen una mejor respuesta a la terapia hormonal (Hellemans *et al.* 1995).

3. HIPÓTESIS

Existen alteraciones en el patrón de citocinas y en las proteínas de activación de linfocitos T tumoral que se asocian con alteraciones en algunos marcadores tumorales en cáncer de mama.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la expresión de genes de citocinas, moléculas relacionadas con la activación de células T y marcadores tumorales en pacientes con cáncer de mama.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificación fenotípica de marcadores linfocitarios expresados en la superficie de los linfocitos periféricos de pacientes con cáncer de mama.
2. Determinar el patrón de citocinas en el microambiente del tumor y en ganglios linfáticos regionales no metastáticos en pacientes con cáncer de mama.
3. Determinar la expresión de proteínas relacionadas con la activación de linfocitos T en el microambiente del tumor y en ganglios linfáticos regionales no metastáticos en pacientes con cáncer de mama.
4. Determinar la expresión de marcadores tumorales en pacientes con cáncer de mama.

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 anatomopatológico 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 metastáticos de las pacientes. Las muestras se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

En el estudio se incluyó una cohorte conformada por un total de 30 sujetos 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, resultado anatomopatológico, 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

5.2 Citometría de Flujo

Los estudios de inmunofluorescencia se llevaron a cabo utilizando un analizador de células FACScan equipado con un láser de Argón (Becton Dickinson). Los

marcadores linfocitarios CD3, CD4 y CD8 se determinaron en la sangre periférica de las pacientes, mediante la técnica de inmunofluorescencia directa. Se utilizaron anticuerpos monoclonales primarios (anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8) conjugados con isotiocianato de fluoresceína (Becton Dickinson). Se trabajó con 100 μ L de sangre completa con anticoagulante (EDTA) por cada muestra obtenida antes de la cirugía. Se determinaron los tres marcadores por separado, a las muestras se les agregó 5 μ L de los anticuerpos primarios marcados, se incubaron 1 hora en la oscuridad y posteriormente se adicionaron 2 ml de solución de lisis, después de 10 minutos de incubación se centrifugaron a 1 200 rpm durante 8 minutos (min), las células se lavaron 2 veces en PBS y el paquete final de células se resuspendió en solución de formaldehído al 1% y se analizó en el FACScan.

5.3 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 e inmediatamente se les agregaron 200 μ L de cloroformo, se agitaron en vortex por 15 segundos y se incubaron de 2-3 minutos a temperatura ambiente (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 μ L 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 μ L 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.

5.4 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)₁₈ 165 μM , 3 μL de MMLV-RT (Transcriptasa Reversa) (200 U/ μL) y agua tratada con DEPC al 0.5% hasta obtener un volumen final de 20 μL . 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: 5 μL de buffer PCR 10X, 3 μL de MgCl_2 25mM, 1 μL de dNTP (10mM), 1 μL (20 μM) 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.

Las secuencias de los oligonucleótidos que se usaron fueron:

IL-2: 5'-CATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTC (sentido).

5'-CGTTGATATTGCTGATTAAGTCCCTG (antisentido).

IFN- γ : 5'-GCATAGTTTTGGGTTCTCTTGCTGTTACTGC (sentido).

5' -CTCCTTTTTCGCTTCCCTGTTTT (antisentido).

IL-10: 5'-ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA (sentido).

5' -TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA (antisentido).

G3PDH: 5'-ACCACAGTCCATGCATCAC (sentido).

5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTCA (antisentido).

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

5.5 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se llevó a cabo por el método de Trizol, 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.

5.6 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 de Bradford, 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 $\mu\text{g/ml}$ hasta 64 $\mu\text{g/ml}$.

5.7 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. 20 μg 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 en una cámara de electrotransferencia semiseca (Owl Panther Semidray Electrobloetter) 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 h 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- ϵ (UCH-T1) 1:50, anti-CD3- ζ , (6B10.2) 1:1000 o anti-actina (C-2) 1:100, este último usado como control (Santa Cruz Biotechnology). 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).

5.8 Inmunohistoquímica

Determinamos la expresión de la interleucina IL-10 y de los marcadores tumorales: Receptor de estrógenos, Her2, p53, Bcl₂ y Bax, 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 desparafinaron en xilol y se hidrataron en etanol a concentraciones decrecientes, se aclararon durante 5 min. en H₂O 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 H₂O destilada y posteriormente con solución SSTF. La peroxidasa endógena se inhibió con una solución de H₂O₂ 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 min.; posteriormente se aplicaron los anticuerpos monoclonales primarios específicos y el control negativo, en este último caso el anticuerpo primario fue omitido y se substituyó 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, clarificándose en xilol y finalmente se

montó en medio permanente Eukitt (Kinder GmbH & CO). La técnica se llevó a cabo a temperatura ambiente (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.

5.8.1 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 prediluido 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 tetrahidroclorídrica (Anacrom Diagnósticos, S.L).

5.8.2 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 prediluido 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.

5.8.3 p53, BcL₂, Bax 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 la IL-10 fue de 10 min.; para p53, 20 min. y para BcL₂ y Bax, fue de 15 min. Los anticuerpos primarios usados y su dilución de trabajo fueron: anti-p53 (Pab 1801) y BcL₂ (100) 1:200; IL-10 (E-10) 1:20 y Bax (B-9) 1:50; todos provenientes de Santa Cruz Biotechnology.

5.9 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

La muestra estuvo comprendida por un total de 30 pacientes del sexo femenino, que presentaban un diagnóstico de cáncer de mama con confirmación histológica, realizada por un médico anatomopatólogo, sin tratamiento oncológico específico previo al menos en 5 años y no tenían otra enfermedad séptica, crónica o endocrino-metabólica en el momento de inicio de su tratamiento. La edad media de las pacientes fue de alrededor de 51 años, con un rango de variación que osciló entre 26 y 85 años. Los tumores se analizaron de manera independiente y se caracterizaron mediante un examen histológico. El tipo histológico más frecuente resultó ser el carcinoma ductal infiltrante, el cual se presentó en 23 pacientes (77%), 3 pacientes presentaban carcinoma papilar intraquístico (10%), 2 pacientes carcinoma medular (6.6%) y solo 1 paciente carcinoma mucinoso y carcinoma papilar intraquístico (3.3% cada caso). 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 metastáticos (7 pacientes). Las características clínicas de las pacientes se muestran en la tabla 1, donde se recogen datos como: edad, etapa clínica, clasificación TMN post-quirúrgica y tipo histológico de los tumores.

Tabla 1: Datos Clínicos individuales de las pacientes.

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

CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante, CM: Carcinoma Medular, Cm: Carcinoma Mucinoso, CPI: Carcinoma Papilar Intraquistico, CLI: Carcinoma Lobular Invasivo.

6.1 Características fenotípicas de las poblaciones de células T en sangre periférica

Se estudiaron las características fenotípicas de la población de células T en sangre periférica, de las pacientes, mediante el análisis por citometría de flujo de los marcadores de superficie linfocitarios: CD3, CD4 y CD8. Se observaron rangos de variación para los parámetros CD3, CD4 y CD8 de (50.7-83.7), (20.5-48.3) y (17.4-52.2) respectivamente; teniendo en cuenta el rango obtenido en un grupo control de 50 pacientes analizadas en nuestro laboratorio, bajo las mismas condiciones experimentales y en un rango de edad similar a nuestro grupo problema. El rango de valores normales para los marcadores resultó: CD3 (63-76 %), CD4 (33-44 %) y CD8 (23-32 %). El 50% (15/30) de los sujetos tenían valores de CD3 fuera de su rango de referencia, mientras que un 47% (14/30) en el caso del CD8 y un 43% (13/30) para el CD4. Los resultados se muestran en la tabla 2 y están referidos al porcentaje de células positivas de la población para cada marcador.

La proporción CD4/CD8 se encuentra invertida en cuatro sujetos en los que tomó cifras que variaron de 0.58 a 0.81. 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, solo uno de ellos presentaba ganglios metastáticos. No se observó una asociación estadísticamente significativa entre el hecho de tener la proporción CD4/CD8 invertida y la etapa clínica o la presencia de ganglios metastáticos.

Tabla 2: Características fenotípicas de la población de células T en sangre periférica.

CODIGO	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
1	78.80	47.70	30.50	1.56
4	83.70	30.20	52.20	0.58
5	74.90	45.00	31.80	1.42
7	83.00	38.60	28.70	1.34
8	76.40	39.60	28.40	1.39
9	68.20	46.80	25.90	1.81
12	70.30	43.40	27.40	1.58
13	60.40	30.80	29.40	1.05
14	50.70	36.30	18.20	1.99
15	73.40	47.50	26.50	1.79
16	63.10	40.30	22.90	1.76
17	55.30	38.40	17.40	2.21
18	58.20	37.50	21.20	1.77
19	64.70	33.50	19.50	1.72
20	54.10	23.00	34.00	0.68
21	68.40	39.10	20.20	1.94
22	54.10	31.40	27.60	1.14
24	53.20	26.20	32.50	0.81
25	74.70	48.30	29.10	1.66
26	52.80	20.50	33.50	0.61
27	73.40	40.60	32.40	1.25
28	70.60	41.60	29.40	1.41
29	68.50	43.20	21.90	1.97
30	67.20	39.40	26.20	1.50
31	51.10	30.30	20.20	1.50
32	71.40	45.40	30.30	1.50
33	62.10	39.10	25.40	1.54
34	52.30	34.10	20.20	1.69
36	76.00	42.40	29.00	1.46
37	74.34	39.40	27.50	1.43

Los resultados de los marcadores CD3, CD4 y CD8 se reportan como el por ciento de células positivas en la población analizada.

6.2 Expresión de citocinas en el microambiente tumoral y en ganglios linfáticos regionales.

Para analizar la expresión del RNAm de algunas de las interleucinas representativas de la respuesta Th1 y Th2, amplificamos el RNAm de IL-2, IFN- γ e IL-10 por RT-PCR en los tumores de las 30 pacientes reclutadas y en los ganglios linfáticos axilares no metastáticos de las pacientes.

El RNAm de IL-10 se expresó en el 53% de los casos (16/30) en el microambiente de los tumores, en cambio, solo el 20% lo expresó en sus ganglios axilares no metastáticos (6/30). En el caso de la expresión del RNAm de la IL-2 resultó en el 33.3% de los sujetos (10/30) en los tumores y en el 26.7% en sus ganglios regionales (8/30). Sin embargo, el IFN- γ no se expresó en el microambiente tumoral en ninguno de los sujetos analizados y solo el 13% (4/30) lo expresó en sus ganglios linfáticos regionales no metastáticos.

La expresión del RNAm de las interleucinas estudiadas tanto en el tumor como en los ganglios axilares no metastáticos de las pacientes se resume en la tabla 3. Las figuras (11 y 12) ilustran 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, las interleucinas: IL-2, IFN- γ e IL-10, no fueron detectadas en ninguno de los tejidos normales de mama analizados (figura 13), lo cual coincide con reportes de otros autores. La amplificación de G3PDH resultó exitosa en todas las muestras de tejido analizadas.

Tabla 3: Expresión de interleucinas en los microambientes tumoral y en ganglios linfáticos regionales no metastáticos.

CÓDIGO	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	+	-	-	+	+	+

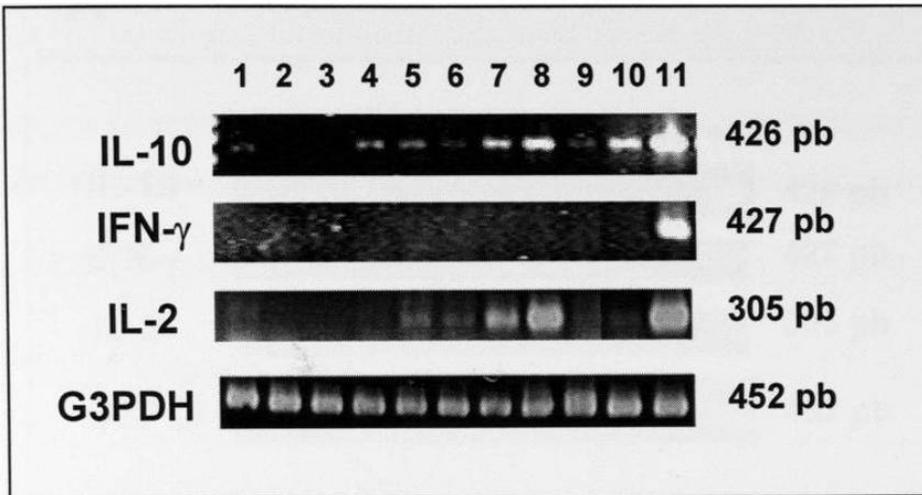
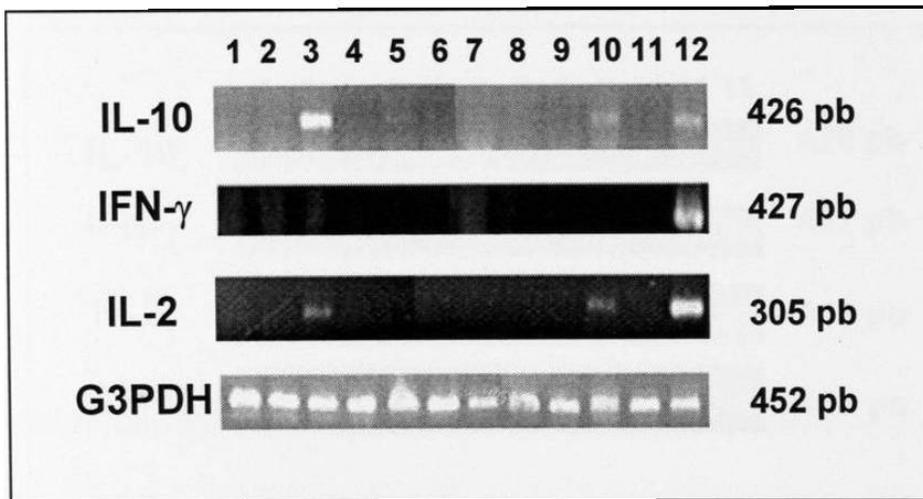
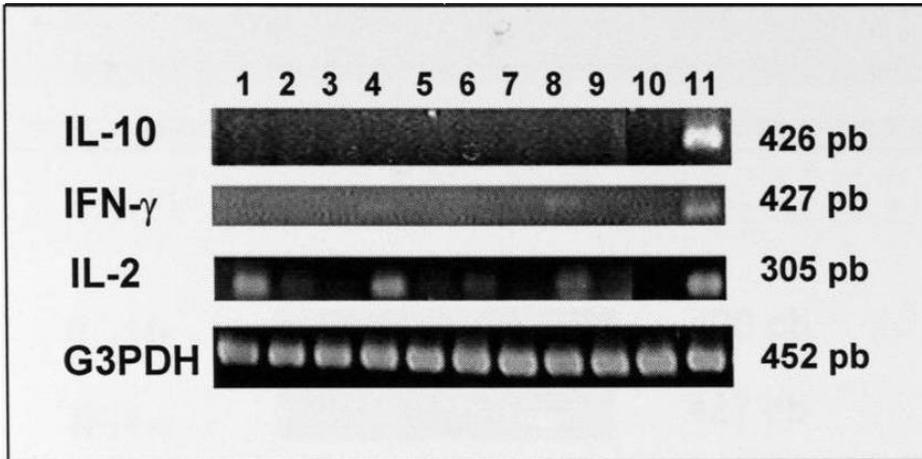
A**B**

Figura 11: Amplificación de los RNAm de citocinas en el microambiente tumoral de un grupo de pacientes representativos. La amplificación de los RNAm de IL-10, IL-2, IFN- γ y G3PDH se llevó a cabo por RT-PCR. A: La línea 1 representa células MNP no estimuladas (control negativo), las líneas 1-9, representan los pacientes 12-20 y la línea 10, células MNP estimuladas con PHA (control positivo). B: Las líneas 1-11 representan los pacientes 24-34 y la línea 12 células MNP estimuladas con PH (control positivo).

A



B

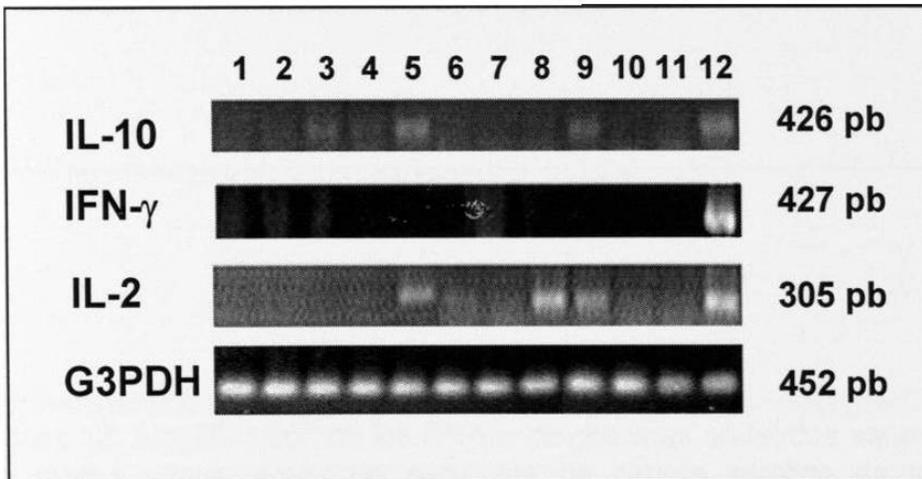


Figura 12: Amplificación de los RNAm de citocinas en el microambiente de los ganglios linfáticos de un grupo de pacientes representativos. La amplificación de los RNAm de IL-10, IL-2, IFN- γ y G3PDH se llevó a cabo por RT-PCR. A: La línea 1 representa el paciente 8, las líneas 1-9, representan los pacientes 12-20 y la línea 10, células MNP estimuladas con PHA (control positivo). B: Las líneas 1-11 representan los pacientes 24-34, la línea 12, células MNP estimuladas con PHA (control positivo).