



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE
HUMORAL DEL CARCINOMA DUCTAL DE LA MAMA EN UN
MODELO EXPERIMENTAL MURINO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. MARIANA DÍAZ ZARAGOZA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. PEDRO ULISES OSTOA SALOMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DR. KARÉN MANUCHARYAN AIRAPETIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE
HUMORAL DEL CARCINOMA DUCTAL DE LA MAMA EN UN
MODELO EXPERIMENTAL MURINO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. MARIANA DÍAZ ZARAGOZA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. PEDRO ULISES OSTOA SALOMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DR. KARÉN MANUCHARYAN AYRAPETIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2015



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de junio del 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MARIANA DÍAZ ZARAGOZA** con número de cuenta **40301276-1** con la tesis titulada **"Análisis de la variabilidad de la respuesta inmune humoral del carcinoma ductal de la mama en un modelo experimental murino"**, realizada bajo la dirección del **DR. PEDRO ULISES OSTOA SALOMA**:

- Presidente: Dr. Julio César Carrero Sánchez
- Vocal: Dra. Marcela Lizano Soberón
- Secretaria: Dra. Vilma Maldonado Lagunas
- Suplente: Dr. Hector de Jesús Mayani Viveros
- Suplente: Dr. Karen Manucharyan Airapetian

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de agosto del 2015.


DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

A las Instituciones

Al **Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México** por la administración, orientación e información de este Doctorado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca con número de registro **215429**, que me otorgó para la realización de esta tesis de Doctorado.

A las Personas

A mi tutor Principal:

Al **Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma** por incorporarme a su proyecto de investigación por dirigir y revisar esta tesis de Doctorado, y apoyarme para su realización con la tecnología, equipo y materiales necesarios; y al laboratorio de **Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas**, UNAM.

A los integrantes de mi Comité Tutorial:

A la **Dra. Vilma Maldonado Lagunas** y al **Dr. Karén Manucharyan** por las sugerencias acertadas, revisión cuidadosa de mi proyecto de investigación y tesis, y por su apoyo.



Por su apoyo y enseñanza:

Al Dr. Karén Manucharyan por la donación de la línea celular 4T1.

Al Dr. Francisco Gallardo por enseñarme el manejo y propagación de la línea celular 4T1 y la inoculación de estas células en los ratones.

Al Maestro en Ciencias Ricardo Hernández por ayudarme con el sangrado y manejo de los ratones durante los experimentos.

A la Dra. Marcela Esquivel por enseñarme como hacer los análisis de las imágenes de inmunoblot-2D.

A la Maestra en Ciencias Tzipe Govezensky por su apoyo con el análisis estadístico.

Al Dr. Luis Mendoza por desarrollar el script en Python para elaborar los dendogramas.

Al Sr. Osvaldo Martínez Garay por su ayuda en la preparación del material del laboratorio.

Al Dr. Julio César Carrero por la revisión exhaustiva de esta tesis, por sus comentarios y excelentes observaciones.



DEDICATORIA

Con mucho amor y cariño a mis padres...

Mariano y Beatriz

Nunca terminaré de agradecer el apoyo y comprensión que me han brindado. Siempre tengan presente que los objetivos cumplidos a lo largo de mi vida, son un trofeo que les dedico con todo el corazón, porque ustedes son el principal motor para lograrlo...

...**Los adoro y amo.**

A los amores de mi vida: **Adrián, Daniel, Hiroshi, Jeremy y Midori.**

Por su apoyo, compañía y consejos, a:

Verónica, gracias compañera por ser mi amiga y estar en los momentos fáciles y difíciles del Doctorado.

Luisa, gracias amiga por darme ánimos y por estar siempre a mi lado.

Rosa, gracias amiga por estar ahí en momentos fáciles y difíciles.

A las personas que conocí durante esta etapa de mi vida, quienes han compartido su amistad conmigo y a los cuales aprecio demasiado:

Marce, Ricardo, Eréndira, María, Karla, César, Sr. Osvaldo y al Dr. Ostoa.

A **Lucio y Sabina** que ahora son parte de mi familia.

A **Jorge**, quien ha estado conmigo en los momentos felices y difíciles.
Gracias por apoyarme siempre. Gracias por tu amistad, sonrisa y alegría.
¡TE AMO!

A mi **tía Lety** y a **Belén**, y a mi **tío Emilio, Male** y **Evelyn**, para los que soy importante y han creído en mí y en mis metas... Los quiero.

A mi **mejor amigo**, el que está conmigo y me acompaña cada minuto de la vida, al que nunca renunciaré así envejezca...

Por tercera vez, al hombre que me inculcó que el valor del razonamiento y de la humildad son armas muy importantes para triunfar en la vida... Al **Dr. Elías Piedra Ibarra.**

“En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida”...

...**Lee Smolin.**



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Cáncer de mama.	1
I.1.1. La importancia del cáncer de mama en el mundo.	1
I.1.2. La importancia de estudiar el cáncer de mama en México.	1
I.1.3. Tipos de cáncer de mama (American Cancer Society, 2015, National Breast Cancer Foundation, 2015).	3
I.1.4. Clasificación del cáncer de mama.	4
I.1.5. Factores de riesgo que contribuyen al desarrollo del cáncer de mama.	6
I.1.6. Prevención y control del cáncer de mama.	6
I.1.7. El cáncer de mama en hombres.	8
I.2. La inmunología del cáncer de mama.	9
I.2.1. Aspectos generales.	9
I.2.2. Inmuno-vigilancia e inmunidad innata en el Cáncer de mama.....	10
I.2.3. Auto-anticuerpos y antígenos asociados a tumores de cáncer de mama.	12
I.2.3.1. Anticuerpos IgM dirigidos contra antígenos tumorales asociados al cáncer de mama.	13
I.2.4. Anticuerpos IgM.	15
I.2.4.1. Anticuerpos IgM naturales.	17
I.2.4.2. Anticuerpos IgM adaptativos.....	19
I.2.4.3. Papeles de IgM natural e IgM adaptativa contra células cancerosas.....	20
I.3. Modelos murinos para el estudio del cáncer de mama.	22
I.3.1. Modelo murino BALB/c y células tumorales 4T1.....	22
I.3.2.1. Desventajas del Modelo murino BALB/c y células tumorales 4T1. ...	24
II. JUSTIFICACIÓN	25
III. HIPÓTESIS	26



IV.	OBJETIVOS	27
IV.1.	General.....	27
IV.2.	Específicos.....	27
V.1.	Cultivo Celular.....	28
V.1.2.	Ratones y Línea Celular.....	28
V.1.3.	Implante de las células tumorales.....	28
V.1.4.	Obtención del suero.....	29
V. 2.	Electroforesis e inmunoblots de 2 Dimensiones (Inmunoblot-2D).	29
V.2.1.	Extracción de proteínas del cultivo celular 4T1.....	29
V.2.2.	Hidratación de las tiras IPG.....	30
V.2.3.	Isoelectroenfoque.....	30
V.2.4.	Equilibrio de la Tiras IPG.....	30
V.2.5.	Electroforesis 2D.....	31
V.2.6.	Transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	31
V.2.7.	Western Blot.....	31
V.3.	Análisis de las imágenes de Inmunoblot-2D.	32
V.3.1.	Procesamiento de las imágenes.....	32
V.3.2.	Clustering.....	32
V.3.3.	Análisis estadístico.....	33
VI.	RESULTADOS	34
VI.1	Cultivo de la línea celular 4T1	34
VI.1.1.	Implante de las células tumorales.....	34
VI.2.	Electroforesis e inmunoblots de 2 Dimensiones (Inmunoblot-2D).	36
VI.2.1.	Cuantificación de las proteínas de la línea celular tumoral 4T1.....	36
VI.2.2.	Electroforesis 2 Dimensiones (2D).....	36
VI.2.3.	Inmunoblot de 2 Dimensiones (inmunoblot-2D).....	37
VI.2.3.1.	Coordenadas y número de Spots en los inmunoblot-2D.....	44
VI.2.3.1.	Frecuencia de Spots en los inmunoblot-2D de ratones hembra.	52
VI.3.	Patrones de reconocimiento y distribución de los spots (reconocimiento de antígenos por IgG e IgM).	53
VI.3.1.	Firmas inmunológicas.....	53
VI.3.2.	Dendogramas.....	54
VII.	DISCUSIÓN	60
VIII.	CONCLUSIONES	68
X.	LITERATURA CITADA	70
XI.	ANEXOS	85



XI.1. Artículos publicados.	85
XI.1.1. 2D immunoblots show differential response of mouse IgG and IgM antibodies to antigens of mammary carcinoma 4 T1 cells.	85
XI.1.2. Comparison patterns of 4 T1 antigens recognized by humoral immune response mediated by IgG and IgM antibodies in female and male mice with breast cancer using 2D-immunoblots.	93
XI.1.3. Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer (Review).	102



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Número de defunciones por cáncer cervical y cáncer de mama, México, 1979 a 2006. Estadísticas vitales de mortalidad 1979 a 2006 INEGI/SSA (Palacio-Mejía et al., 2009).2
- Figura 2.** Tipos de cáncer de mama. a) Carcinoma ductal in situ e invasivo. b) Carcinoma lobular in situ e invasivo. c) Cáncer de mama inflamatorio. (American Cancer Society, 2015, National Breast Cancer Foundation, 2015).4
- Figura 3.** Representación esquemática de IgM unida a membrana y de IgM secretora. Los linfocitos B presentan IgM (mIgM) unida a la membrana en su superficie como parte central del BCR (A). Una vez en la etapa de células plasmáticas, éstas producen IgM secretora (sIgM) en forma "pentamérica" (B). Las cadenas pesadas y las cadenas ligeras consisten en diversos dominios dentro de la inmunoglobulina VH, CH1-4; VL, CL se muestran en colores. Los glicanos y enlaces disulfuro intra- e inter-subunidades entre cadenas pesadas, cadenas ligeras y cadena J también se muestran. La cadena pesada en mIgM difiere de la cadena pesada en sIgM en su C-terminal, una tiene un dominio transmembranal (TMD) y la otra una región rica en cisteína (TP), respectivamente (Anelli and van Anken, 2013).16
- Figura 4.** Ambos tipos de IgM presentan varios papeles en la respuesta inmune, cuando las células comienzan a transformarse (IgM natural) y cuando un tumor ya está creciendo (adaptativo IgM). IgM natural es producida por células B1 y células de la zona marginal, e IgM adaptativa es producida por células B2. Estos papeles llevan a la eliminación de la célula tumoral, pero cuando se establece tumor, componentes del sistema inmune como las células B y las células B reguladoras adaptativas (Breg) secretan factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e IL-10, respectivamente, lo que promueve la angiogénesis, se inhiben las respuestas de células T y promueven la progresión, lo que facilita la propagación de las células neoplásicas. IgG está presente en las primeras etapas del cáncer de mama, pero es inmunosuprimida con el tiempo, mientras que IgM natural se presenta antes de que las células tumorales se detecten, e IgM adaptativa es constante a través del desarrollo del tumor (Díaz-Zaragoza et al., 2015).21



- Figura 5.** Características in vivo de tumores 4T1 primarios. (A) Tumores 4T1 son altamente vascularizados. (B) Ulceraciones en piel pueden aparecer donde el tumor primario 4T1 está creciendo. (C) Tumor 4T1 puede extenderse al revestimiento peritoneal. (Imágenes tomadas de (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001)).....23
- Figura 6.** Fotografía de células 4T1 cultivadas en el laboratorio de inmunología. 100X.....34
- Figura 7.** Tamaño del tumor de ratones hembra y machos. A) Gráfica de los volúmenes en milímetros cúbicos así como su clasificación de acuerdo a la categoría de ausente, pequeño, mediano y grande. Se muestra la desviación estándar entre el promedio del volumen de ratones hembras y machos, donde no se observan diferencias significativas. B) Fotografías que muestran un ejemplo de cada categoría en la que se clasificaron los tumores.....35
- Figura 8.** Fotografía de un ratón (A) hembra y (B) macho con su tumor en la mama a los 35 días de haber implantado las células 4T1.....35
- Figura 9.** Curva patrón para la medición de proteína de las células 4T1 por espectrofotometría. Coeficiente de correlación de 0.9986.36
- Figura 10.** Proteínas de células 4T1 se paradas por punto isoelectrico y peso molecular. (a) Electroforesis-2D (tinción Zinc-Imidazol), y (b) transferidas a una membrana de nitrocelulosa (tinción CPTS).37
- Figura 11.** Imágenes de los inmunoblots-2D de la respuesta inmune mediada por IgG e IgM de los ratones hembra. Análisis hechos con el programa PdQuest. A) Imagen de los inmunoblots-2D del ratón hembra 2 de la respuesta mediada por IgG e IgM. B) Total de las imágenes de los inmunoblots-2D de cada ratón hembra. Las cruces de color rojo indican el centro de cada spot y la circunferencia amarilla corresponde a su área.....41
- Figura 12.** Imágenes de los inmunoblots-2D de la respuesta inmune mediada por IgG e IgM de los ratones macho. Imágenes analizadas con el programa PdQuest. A) Imagen de los inmunoblots-2D del ratón macho 5 de la respuesta mediada por IgG e IgM. B) Total de las imágenes de los inmunoblots-2D de cada ratón macho. Las cruces de color rojo indican el centro de cada spot y la circunferencia amarilla corresponde a su área.....44
- Figura 13.** Imágenes de referencia para calcular las coordenadas de los spots dentro de cada inmunoblot-2D. a) marcador de Punto isoelectrico separado por Electroforesis-2D. b) Imagen del



marcador de Punto Isoeléctrico analizada con el Programa PdQuest.	44
Figura 14. Número total de spots en ratones hembra y macho en el reconocimiento de antígenos de las células 4T1 por IgG e IgM.	49
Figura 15. Número promedio de spots en las diferentes semanas de crecimiento tumoral (semanas 1-5) en ratones hembra y macho para IgM (a) e IgG (b).	50
Figura 16. Tamaño del tumor y su relación con el número de spots en cada ratón hembra en la semana 1 (a) y en la semana 5 (b), y en ratones macho en las semanas 1 (c) y 4 (d).	51
Figura 17. Frecuencia de spots de las imágenes de inmunoblot-2D de ratones hembra en la semana 0 y semana 1 de la respuesta mediada por IgG y IgM. La figura muestra el Punto isoeléctrico y Peso molecular de los spots que se comparten no sólo entre las imágenes de cada tiempo (S0 y S1), sino también entre todos los ratones hembras. Los spots de color rojo son reconocidos "Medianamente" y los spots de color azul intenso son reconocidos "ampliamente" por los ratones. Los spots son reconocidos por 0-1 ratones fueron categorizados como "raros", de 2 a 5 ratones como "Medio" y por 6 a 10 ratones como "Ampliamente". Ags = antígenos.	53
Figura 18. Desarrollo de una firma multibinominal basada en la disposición de spots de una imagen de inmunoblot-2D, que se dividió en las celdas. Un "1" se colocó en las celdas que tenían uno o más puntos, mientras que un "0" se colocó, cuando no había spots. Las flechas verdes indican el patrón de lectura de los 0s y 1s para la obtención de la firma inmunológica, de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo.	54
Figura 20. Dendogramas de patrones de reconocimiento de antígenos de las imágenes de inmunoblots-2D por isotipo de inmunoglobulina, elaborado a partir de las firmas inmunológicas de 0s y 1s de las semanas 0 a la 5, en el que la IgG (G= cajas azules) e IgM (M= cajas rojas) de la respuesta humoral de ratones hembra (A) y macho (B). w: Semana, F: ratones hembra, M: ratones machos.	59



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos IgM usados en el estudio de antígenos tumorales de cáncer de mama.....	14
Tabla 2. Número de spots, suma, promedio, desviación estándar y número total de spots en imágenes de inmunoblot-2D de ratones hembras, de las respuestas de IgM e IgG a través del desarrollo de cáncer de mama con células tumorales 4T1. (T=tiempo; S=semana).	46
Tabla 3. Número de spots, suma, promedio, desviación estándar y número total de spots en imágenes de inmunoblot-2D de ratones machos, de las respuestas de IgM e IgG a través del desarrollo de cáncer de mama con células tumorales 4T1. (T=tiempo; S=semana).	48



RESUMEN

La detección temprana del cáncer es uno de los enfoques más prometedores para reducir su creciente carga y desarrollar un tratamiento curativo antes de que se establezca el tumor. El diagnóstico temprano del cáncer de mama es el más importante de todos los tumores, ya que es el cáncer más común en las mujeres de todo el mundo. El entorno inmunosupresor reportado en mujeres con cáncer de mama, principalmente de IgG, complica el uso de la respuesta inmune humoral contra el tumor como una herramienta de inmunodiagnóstico. Sin embargo, las respuestas antitumorales de IgM natural y adaptativa no han sido estudiadas previamente en función del desarrollo del cáncer de mama, por lo que IgM no se ha utilizado como una herramienta de inmunodiagnóstico.

En esta tesis se muestra un nuevo enfoque para el análisis de la respuesta inmune humoral contra antígenos de células 4T1. El estudio se basó en la detección por medio de inmunoblots de 2 dimensiones de antígenos tumorales de células 4T1 con los anticuerpos IgG e IgM del suero de ratones hembra y macho implantados con células 4T1 en el pezón de la glándula mamaria y que desarrollaron cáncer. Se caracterizó la variabilidad de las respuestas de IgM e IgG en ratones hembra y macho con cáncer de mama en diversas etapas de desarrollo de la enfermedad, y las propiedades con respecto al reconocimiento de antígenos se correlacionó estadísticamente con las variables asociadas con los individuos y su tumor. Se observó que las respuestas de IgG e IgM fueron diferentes a través del tiempo y entre los individuos, hubo una alta variabilidad en la respuesta intra-e inter-ratón. Diferentes cantidades de spots se encontraron en las respuestas de IgG e IgM de las semanas 1 a la 5. En promedio, la respuesta de IgM tuvo más spots, y la respuesta de IgG disminuyó con el tiempo en ratones hembra, pero no en ratones machos. IgM natural de la semana 0 responde más fuerte que la semana 1. Los antígenos que son reconocidos por IgM de algunos ratones hembra y macho en la primera semana también son reconocidos por otros ratones en la semana 0. La respuesta adaptativa de IgM e IgG se presentó, no obstante, la respuesta de IgM fue mayor y mejor que la respuesta de IgG. La respuesta de IgM se mantuvo durante el desarrollo de tumores en ambos sexos. La IgM de los sueros de la primera semana de ratones hembra compartieron el reconocimiento temprano de 8 antígenos, lo que convierte a estos antígenos en proteínas notables, los cuales podrían, en trabajos futuros, secuenciarse e identificarse, y asentar las bases para desarrollar una herramienta de diagnóstico temprano.

Cada ratón presentó un patrón específico de reconocimiento del antígeno, es decir, una firma inmunológica representada por un conjunto único de antígenos que fueron reconocidos por IgM o IgG. La firma binomial abre el camino para correlacionar un patrón particular con resistencia o susceptibilidad. Los datos descritos apoyan la idea de que IgM es una mejor herramienta para el diagnóstico temprano, ya que no está sujeta a la inmunosupresión como IgG en ratones hembra con cáncer de mama. La posibilidad de diferenciar entre los anticuerpos IgM adaptativos de los naturales, permitirá la investigación de IgM adaptativa para inmunodiagnóstico temprano.



ABSTRACT

The early detection of cancer is one of the most promising approaches to reduce its growing burden and develop a curative treatment before the tumor is established. The early diagnosis of breast cancer is the most demanding of all tumors, because it is the most common cancer in women worldwide. The immunosuppressive environment reported in women with breast cancer, mainly IgG, complicates the use of the humoral response against the tumor as an immunodiagnostic tool. Nevertheless, antitumor responses of natural and adaptive IgM have not been previously studied in terms of development of breast cancer, so IgM has not been used as an immunodiagnostic tool.

This thesis presents a new approach to the analysis of the humoral immune response against 4T1 cell antigens. The study was based on detection of 4T1 cells tumor antigens with IgG and IgM antibodies from serum of female and male mice implanted with 4T1 cells in the nipple of the breast cancer, using 2-dimensional immunoblots.

The variability in IgM and IgG responses in female and male mice with breast cancer at various stages of disease was characterized, and the properties with regard to antigen recognition were correlated statistically with variables that were associated with the individuals and tumors. It was noted that the responses of IgG and IgM were different over time and between individuals, there was a high variability in the intra-and inter-mouse response. Different numbers of spots was found in the IgG and IgM responses from week 1 to 5. On average, the IgM response had more spots, and the IgG response decreased over time in female mice, but not in male mice. Natural IgM of week 0 replies stronger than week 1. The antigens that are recognized by IgM of some male and female mice in the first week are also recognized by other mice at week 0. The adaptive responses of IgM and IgG were presented; however, the IgM response was higher and better than IgG response. The IgM response was maintained during the development of tumors in both sexes. IgM sera from the first week of female mice shared the early recognition of 8 antigens, making these remarkable protein antigens, which could, in future, be sequenced and identified, and the groundwork to develop a tool for early diagnosis can be established.

Each mouse had a specific pattern of antigen recognition -ie, an immunological signature- represented by a unique set of antigens that were recognized by IgM or IgG. A binomial signature opens up the way to correlate a particular pattern with resistance or susceptibility. These data would support that rationale IgM is a better tool for early diagnosis, because it is not subject to immunosuppression like IgG in female mice with breast cancer. The possibility to differentiate between adaptive IgM antibodies from the natural IgM will allow investigation of the adaptive IgM for early immunodiagnostic.



I. INTRODUCCIÓN

I.1. Cáncer de mama.

I.1.1. La importancia del cáncer de mama en el mundo.

El cáncer de mama (CaMa) es el cáncer más común en las mujeres a nivel mundial, con cerca de 1.67 millones de nuevos diagnósticos al año (Globocan, 2012), correspondientes al 25% de todos los tipos de cáncer femeninos (Mcperson et al., 2000; Panieri, 2012).

En el 2008 se registraron 460 mil muertes, de los cuales 269 mil (58%) se presentaron en países y poblaciones de ingresos económicos bajos y medianos; y 68 mil (15%) fueron personas de 15 a 49 años de países de bajos ingresos (Mathers et al., 2006; Knaul et al., 2008; Panieri, 2012). Las tendencias mundiales de 1980 al 2010, muestran que la incidencia y la mortalidad han aumentado, sin embargo, las tasas han aumentado más rápido en los países en vías de desarrollo, empeorando así la carga de morbilidad y muerte en individuos pobres (Chávarri-Guerra et al., 2012; Porter, 2008; Globocan, 2012).

En los países en vías de desarrollo, el CaMa excede las cifras reportadas para el cáncer cérvico-uterino (Panieri, 2012) y de próstata (Knaul et al., 2008).

I.1.2. La importancia de estudiar el cáncer de mama en México.

Las diferencias socioeconómicas existentes entre los 31 estados y el Distrito Federal que componen a México, probablemente afectan la incidencia y mortalidad del CaMa (Palacio-Mejía et al., 2009). Al igual que en otros países en vías de desarrollo, en México la mortalidad por CaMa ha aumentado en las últimas cinco décadas, de cuatro cada 100 mil habitantes entre 1955 y 1960, a nueve cada 100 mil habitantes de 1990 al 2008 (Knaul et al., 2008; Bright et al., 2011). A partir del 2006, el CaMa se convirtió en la primera causa de muerte entre mexicanas, con el 14% de las muertes producidas por cáncer (Chávarri-Guerra et al., 2012).

En México en el 2006, el cáncer cérvico-uterino pasó a ser la segunda causa de muerte después del CaMa. A principios de 1990, su mortalidad bajó debido a las pruebas de Papanicolaou y a la disminución de la natalidad (Lazcano-



Ponce and Allen-Leigh, 2009; Palacio-Mejía et al., 2009). Por el contrario, el número de muertes por CaMa incrementó de manera anual de tal forma que para 1979 existieron 1,144 muertes, y en el 2006 se registraron 4,497 casos (**Figura 1**) (Palacio-Mejía et al., 2009).

En el 2006, el CaMa ocasionó el 60% de las muertes en mujeres de 30 a 59 años, además de convertirse en la segunda causa de muerte más común entre mujeres de 30 a 54 años de edad, y la tercera más común entre mujeres de 30 a 59 años de edad (después de la diabetes y las enfermedades cardiovasculares) (Knaul et al., 2008).

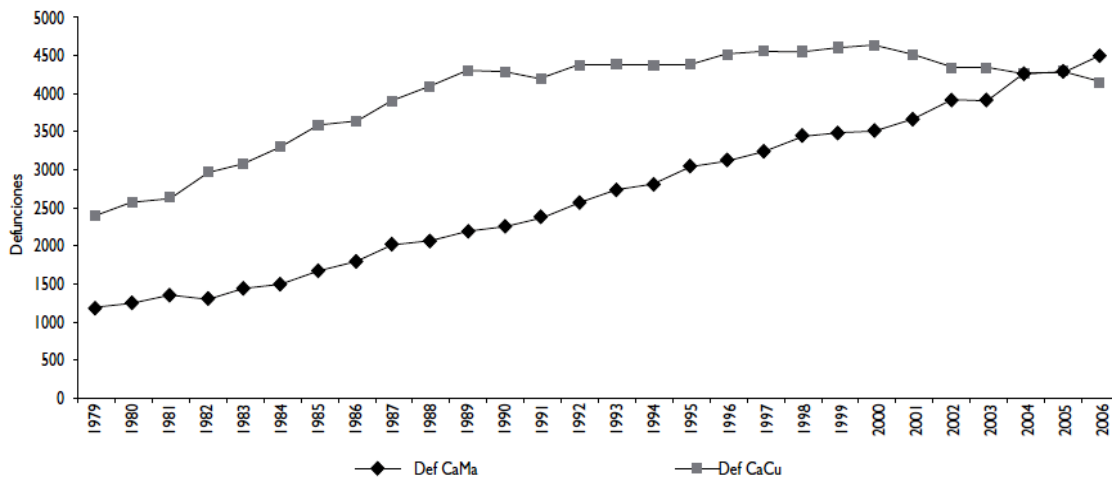


Figura 1. Número de defunciones por cáncer cervical y cáncer de mama, México, 1979 a 2006. Estadísticas vitales de mortalidad 1979 a 2006 INEGI/SSA (Palacio-Mejía et al., 2009).

A nivel regional, el CaMa se presenta en mayor incidencia en estados del norte (11.8 cada 100 000 mujeres) y en el Distrito Federal (13.2 cada 100 000 mujeres). No obstante, el riesgo de las mujeres de morir por CaMa en zonas urbanas ha ido disminuyendo, mientras el riesgo aumenta en mujeres de áreas rurales. Esta tendencia general ascendente de la mortalidad por CaMa se debe a la ausencia de infraestructura en el tamizaje y a la falta de una herramienta de diagnóstico temprano en México (Palacio-Mejía et al., 2009; Chávarri-Guerra et al., 2012).



I.1.3. Tipos de cáncer de mama (American Cancer Society, 2015, National Breast Cancer Foundation, 2015).

Existen diferentes tipos de CaMa de acuerdo a la forma en que las células cancerosas se observan histológicamente. La mayoría de los casos de cáncer mamario son carcinomas, un tipo de cáncer que comienza en las células epiteliales. A su vez, el CaMa es un carcinoma llamado adenocarcinoma, el cual se presenta en tejido glandular. Hay diversos tipos de cáncer de mama, y algunos son muy raros.

El carcinoma ductal *in situ* es el tipo de CaMa no invasivo más común y se desarrolla en los ductos que transportan la leche de los lóbulos al pezón. El carcinoma ductal invasivo es el CaMa invasivo más común, se produce en los ductos y se esparce hacia los tejidos adiposos de la mama y hace metástasis a otros órganos. El carcinoma ductal *in situ* y el invasivo representan el 90% de los casos (**Figura 2a**). El carcinoma lobular *in situ* se presenta en las glándulas que producen la leche y es un CaMa no invasivo, aunque también puede haber carcinoma lobular invasivo (**Figura 2b**). Estos tipos de cáncer se presentan en sólo el 10% de los casos.

Hay un tipo mucho menos común de CaMa que es el inflamatorio (**Figura 2c**).



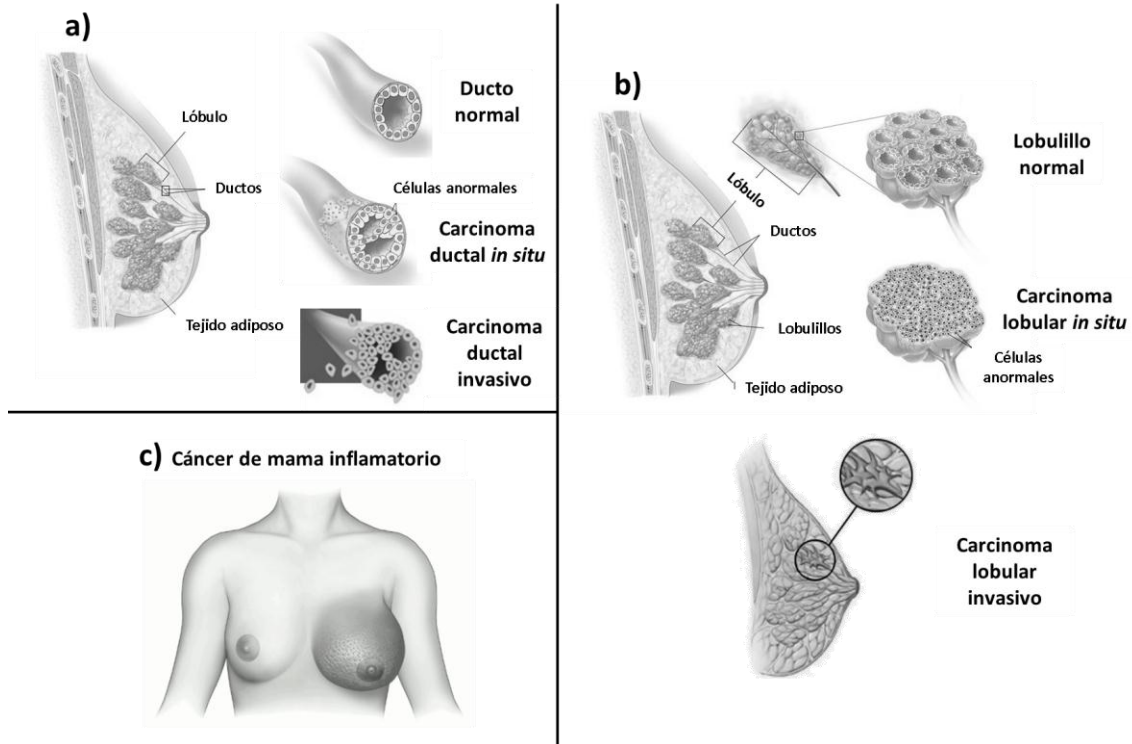


Figura 2. Tipos de cáncer de mama. a) Carcinoma ductal *in situ* e invasivo. b) Carcinoma lobular *in situ* e invasivo. c) Cáncer de mama inflamatorio. (American Cancer Society, 2015, National Breast Cancer Foundation, 2015).

I.1.4. Clasificación del cáncer de mama.

El CaMa se estratifica en cinco estadíos, el 0 que corresponde a pacientes con un crecimiento canceroso *in situ*; el I, que generalmente involucra un tumor menor a 2 cm de diámetro en etapas tempranas de vascularización, no presente en los ganglios y sin metástasis; en el II, los pacientes presentan un tumor vascularizado, con un diámetro mayor de 2 cm y menor a 5 cm, ya se difuminó a los ganglios, pero que aún no presenta metástasis; en el estadío III, los pacientes presentan un tumor con un diámetro mayor a 5 cm y ya se extendió a los nódulos supraclaviculares; y el IV, donde los pacientes ya presentan focos de crecimiento metastásico. La mayoría de las pacientes en México llegan a los servicios de oncología entre los estadíos II y IV (Dehesa et al., 2007).

La clasificación del CaMa, que se estableció por estudios de expresión génica, se da de acuerdo a la presencia de receptores hormonales en la célula



tumoral, así como de la presencia o no de la proteína HER2 (The human epidermal growth factor receptor 2) (Perou et al., 2000).

La mayoría de los casos de cáncer de mama son de receptores de hormonas positivos. Aproximadamente el 80% de los casos de CaMa son de receptores de estrógeno positivos (**RE+**). Alrededor del 65% de los casos de CaMa son receptores de estrógeno positivos y tienen también receptores de progesterona positivos (**RE+/RP+**), lo que significa que las células tienen receptores para ambas hormonas, que podrían estimular el crecimiento del cáncer de mama. El 13% de los casos son de receptores de estrógeno positivos y de receptores de progesterona negativos. Esto significa que el estrógeno (pero no la progesterona) puede estar estimulando el crecimiento y la propagación de las células cancerígenas (**RE+/RP-**). Sólo el 2% de los casos son de receptores de estrógeno negativos y de receptores de progesterona positivos. Esto significa que la hormona progesterona probablemente está estimulando el crecimiento de este cáncer. Solamente una pequeña cantidad de casos de cáncer de mama dan resultados negativos para receptores de estrógeno y positivos para receptores de progesterona (**RE-/RP+**). Si las células del CaMa no tienen receptores para ninguna de las dos hormonas, se considera cáncer de receptores de hormonas negativos. Aproximadamente el 25% de los casos entran en esta categoría (**RE-/RP-**) (BreastCancer.org, 2015), y si tampoco presentan receptores para HER2, entonces se denominan **Triple negativos** (Lee et al., 2015).

Los tumores con receptores hormonales positivos para estrógenos y progesterona, llamados también hormono-dependientes, son los tumores con mejor pronóstico. En los tumores HER2 positivos, la célula tumoral tiene la proteína HER2 sobre-expresada y no contiene receptores para estrógenos o progesterona. En los tumores triples negativos la célula tumoral no posee receptores para estrógenos o progesterona, y tampoco sobre-expresan la proteína HER2. Por último están los tumores con receptores positivos para estrógenos y/o progesterona, y también sobre-expresan la proteína HER2 (Irvin and Carey, 2008; Eiermann et al., 2012; Reis-Filho and Pusztai, 2011; Sotiriou et al., 2003).



De un total de 2074 mujeres latinas con CaMa atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México, entre 1998 y 2008, el 57% tuvieron tumores hormonales receptores-positivos, 20% tuvieron HER2-positivos, y 23% tuvieron tumores triple-negativos (Lara-Medina et al., 2011). La prevalencia de estas mujeres con tumores triple negativos fue más alta que lo reportado en pacientes caucásicas (10-13%) y similar a lo presentado en diversos estudios de pacientes latinas realizados en Estados Unidos, en las cuales la proporción de tumores con receptor de estrógenos-negativo está entre 17 y 30%, mientras la distribución de tumores HER2-positivos fue uniforme (Patel et al., 2010).

I.1.5. Factores de riesgo que contribuyen al desarrollo del cáncer de mama.

Los factores de riesgo que se relacionan con el desarrollo de CaMa son tener una historia de cáncer familiar o personal, menarca temprana; nuliparidad, pocos embarazos y a una edad tardía; menos lactancia materna, menopausia tardía, terapia de reemplazamiento hormonal y/o la toma de anticonceptivos orales, factores de riesgo ambiental, estilo de vida como nutrición (altos niveles de lípidos y colesterol en sangre, y gran consumo de grasas), fumar, consumir alcohol; exposición a radiación ionizante, factores psicosomáticos; y presencia de enfermedades benignas en las mamas (Moore and Moore, 1983; Mcpherson et al., 2000; Dupont and Page, 1985; Pappo et al., 2007).

I.1.6. Prevención y control del cáncer de mama.

La detección del cáncer en etapas tempranas, proporciona un mejor diagnóstico y requiere de menor tratamiento (Etzioni et al., 2003; Panieri, 2012), los pacientes viven más tiempo y les va mucho mejor que a pacientes con cáncer avanzado (Levenson, 2007; Panieri, 2012). El reto consiste en la detección de tumores en las primeras etapas en la población de alto riesgo, donde la incidencia de la enfermedad se incrementa significativamente (Etzioni et al., 2003; Desmetz et al., 2011). Los principales factores para la detección temprana del cáncer son la educación y un diagnóstico certero, por lo que el desarrollo de herramientas de dictamen temprano es importante. Las herramientas que reconocen posibles señales de advertencia de cáncer conllevan a un diagnóstico temprano a través de



pruebas sencillas en una población sana con el fin de identificar a las personas que tienen la enfermedad, pero que aún no tienen síntomas (WHO, 2015a). Los diagnósticos basados en los síntomas son inaceptables para el CaMa porque los síntomas suelen aparecer cuando los tumores son grandes (Lu et al., 2008). En la mayoría de los casos el CaMa es diagnosticado cuando las mujeres ya necesitan intervención quirúrgica (Anderson et al., 2003).

Las mujeres que se auto exploran las mamas son capaces de detectar lesiones de al menos 1 cm, y de 0.5 cm si son lesiones superficiales (Brandan and Navarro, 2006). A pesar de que la autoexploración no refleja una disminución en la mortalidad, podría considerarse que ayuda a un mejor pronóstico, ya que se detectan lesiones en etapas clínicas I y II (Miller, 1993). No obstante, en el 90% de los casos de cáncer de mama en México son detectados porque la propia paciente detecta un abultamiento, y en estos casos ya se trata de un estadio avanzado de la patología (López-Carrillo et al.).

En 2003, el Ministerio de Salud dio a conocer regulaciones oficiales de salud y legislación referente al manejo del CaMa a través de la Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2002, para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama, cuyo finalidad es promover la detección temprana por medio cuatro métodos de monitoreo: la autoexploración, la exploración clínica, y ultrasonido Doppler y la mamografía (Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2.2002, 2003; Knaul et al., 2009; Panieri, 2012).

Las mujeres de 26 años o más deben de someterse a una examinación clínica anual por personal calificado, y ultrasonido doppler. La mamografía se recomienda una o dos veces al año a mujeres de 40 a 49 años de edad con factores específicos de riesgo, y anualmente para mujeres de 50 años y mayores (American Cancer Society, 2015, Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2.2002, 2003). Estudios han establecido que la mamografía reduce la mortalidad del CaMa en mujeres entre el 7 a 23% (Berry et al., 2005).

En México es importante mejorar y ampliar el tamizaje para la detección temprana del cáncer de mama: sólo del 5 al 10% de los casos en México se



detecta en las fases iniciales de la enfermedad, en comparación al 50% que se detectan en Estados Unidos.

I.1.7. El cáncer de mama en hombres.

El CaMa en hombres es una enfermedad rara que se presenta en menos del 1% de todos los cánceres de mama de los países desarrollados (Anderson et al., 2004). Por la rareza del CaMa en hombres, el tratamiento viene de lo sabido del CaMa en mujeres (Korde et al., 2010).

La etiología de este tipo de cáncer es poco entendida, pero están implicadas variaciones en los índices de testosterona y estrógeno (Sasco et al., 1993). Los hombres que tuvieron orquitis por el virus de las paperas, testículos sin descender, o daño testicular tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, quizá por una deficiencia en los niveles de andrógenos o un exceso en los niveles de estrógenos (Thomas et al., 1992). La obesidad es un riesgo porque los niveles de estrógenos se ven afectados por la aromatización periférica de andrógenos (Ravandi-Kashani and Hayes, 1998). Los factores ambientales también son un riesgo, ya que los hombres que laboran en fábricas de acero sufren de supresión de la función testicular por exposición a calor, radiación (Crichlow, 1972) y a campos electromagnéticos (Demers et al., 1991). Otros factores de riesgo de cáncer son el uso de drogas, trauma de pecho, fumar, usar anfetaminas y una historia familiar de CaMa tanto en hombres y mujeres (Demeter et al., 1990).

La edad reportada de presencia de CaMa en hombres es de los 60 a 65 años, es decir, 10 años más que en la media que se presentan en mujeres con CaMa (Ravandi-Kashani and Hayes, 1998). El hallazgo clínico del 75 al 90% de los pacientes es una masa sin dolor de un diámetro de 3.0 a 3.5 cm, pero pueden haber dentro del rango de 0.5 a 12.5 cm. Además de que la enfermedad tiene predilección por la mama izquierda (Scheike, 1973).

El carcinoma ductal con infiltración es el subtipo más común, con el 70% de los casos. El 15% de los pacientes con enfermedad localizada tienen sólo carcinoma ductal *in situ*. No existe el carcinoma lobular porque la mama de los hombres es rudimentaria y no posee lóbulos (Ravandi-Kashani and Hayes, 1998). El CaMa en hombres tiene una mayor preponderancia de la enfermedad en etapa



III con un 22% en comparación del 6% en mujeres; al mismo tiempo, hay una mayor incidencia de nódulos linfáticos positivos (60%) en hombres que en mujeres (38%), lo que se ha ligado a un pobre pronóstico (Borgen et al., 1992).

El tamaño del tumor en hombres es más pequeño que los tumores palpables de mujeres, lo que los hace más propensos a sufrir metástasis. En hombres, la enfermedad avanza más rápido y posee mayor infiltración en la piel; es más común que los nódulos axilares estén involucrados, y que haya más metástasis hacia estos. Todas las características mencionadas convierten al CaMa de hombres en un tumor biológicamente más agresivo (Crichlow and Galt, 1990).

I.2. La inmunología del cáncer de mama.

I.2.1. Aspectos generales.

La participación efectiva del sistema inmune en los tumores mamarios fue observada desde 1949 cuando se reportó la presencia de infiltrado linfoide (Moore and Foote, 1949). El CaMa es una enfermedad que se mantiene latente por un período largo de tiempo, en el cual el sistema inmune puede inhibir el desarrollo de células tumorales o aceptarlas como “propias”. Las células tumorales exhiben gran variabilidad antigénica durante su desarrollo, lo que no permite una respuesta favorable y muchos tumores escapan al sistema inmune (Hadden, 1999; Dunn et al., 2004; Huang et al., 2000; Cimino-Mathews et al., 2015).

Mutaciones secuenciales en el DNA de la célula tumoral inducen cambios en las concentraciones hormonales, en la producción de enzimas y citocinas, así como en la expresión de nuevos antígenos (Ags), lo que posibilita que las células transformadas escapen del control homeostático y resistan a la eliminación por los mecanismos de la respuesta inmune (Hadden, 1999; Dunn et al., 2004).

Las alteraciones del sistema inmune tienen relación con la etapa clínica de la enfermedad. En etapas iniciales del cáncer de mama, la respuesta de hipersensibilidad retardada cutánea a Ags de memoria se encuentra conservada, hay niveles normales en el número total de linfocitos T, y sin alteraciones de la relación CD4:CD8 en sangre periférica. Asimismo, se mantienen los valores normales de células B y de las inmunoglobulinas G (IgG), IgA e IgM en periferia.



Las células NK (del inglés Natural Killer) se conservan en número y función. Sin embargo, en estadíos avanzados del CaMa los parámetros anteriores están alterados cuantitativa y cualitativamente (Kim et al., 2006; Faxas et al., 1987; Arango et al., 1999, 2002).

I.2.2. Inmuno-vigilancia e inmunidad innata en el Cáncer de mama.

Paul Ehrlich en 1909 postuló que el sistema inmune no sólo elimina las bacterias patógenas, sino que también suprime el crecimiento de carcinomas con gran frecuencia, proporcionando Acs contra células malignas (Vollmers and Brändlein, 2006b).

Cincuenta años más tarde, Macfarlane Burnet y Lewis Thomas revisaron el tema de la protección inmunológica natural contra el cáncer. Burnet consideró la tolerancia inmune, con respecto a que los neo-Ags específicos de las células tumorales podrían causar una reacción inmunológica efectiva que elimine el desarrollo de células cancerígenas, y definió el concepto de inmunovigilancia (Burnet, 1971; Dunn et al., 2004). Las células transformadas se eliminan mediante el proceso de la inmunovigilancia que consiste en una respuesta inmune inmediata que proporciona Acs contra células malignas, y una respuesta inmune secundaria heredada derivada de las células B (Milner et al., 2005; Karin et al., 2006; Vollmers and Brändlein, 2006b; a).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa y estimula la respuesta inmune adaptativa (Hoebe et al., 2004). La inmunidad innata se distingue por utilizar receptores de la línea germinal no reordenados, como los receptores tipo-Toll (TLR), que no reconocen estructuras específicas individuales, pero si patrones moleculares específicos asociados a patógenos, y por lo tanto carece del reconocimiento específico con restricción del complejo principal de histocompatibilidad (MHC del inglés Major Histocompatibility Complex). Estos patrones específicos son estructuras conservadas y repetitivas tales como carbohidratos en glicoproteínas y glicolípidos (por ejemplo, lipopolisacáridos), que se expresan de forma independiente a eventos mutacionales (Janeway, 2013) y son detectados de forma independiente de células T (Vollmers and Brändlein, 2006b). Entre las células representativas de este tipo de inmunidad se encuentran



las células NK CD3-, las células T asesinas naturales (NKT) CD3+, y los macrófagos (Rodríguez and Padilla, 2008).

En cuanto a la participación de la respuesta inmune innata para la eliminación de las células tumorales del CaMa, se ha reportado que las células NKs poseen capacidad efectora citotóxica mediada por exocitosis de gránulos y apoptosis mediada por Fas (Molling et al., 2005; Moretta et al., 2002), además de producir moléculas asociadas a efectos anti-tumorales (Roda et al., 2006), y que su actividad citotóxica está regulada por receptores de inhibición y de activación. Los receptores de inhibición de citotoxicidad KIR (del inglés Killer Inhibition Receptors) reconocen al MHC Clase I, por lo que las NKs son capaces de identificar a los tumores mamarios que pierden moléculas MHC clase I durante la carcinogénesis (Moretta, M. and Ciccone, 1994; Moretta et al., 2002; Stein et al., 2006).

Otro receptor importante de las NKs es el NKG2D, que reconoce células tumorales de CaMa. Los ligandos de NKG2D censan el daño al ADN en las lesiones pre-neoplásicas o tumores invasivos, lo que explica por qué las células tumorales son reconocidas por el sistema inmune innato y como consecuencia activan la respuesta adaptativa. Los ligandos del NKG2D son inducibles por la transformación maligna, y se denominan MIC, que se expresan como TAA (Antígenos Asociados a Tumor) en CaMa, se liberan a la circulación como MIC solubles e inducen la modulación negativa de NKG2D (Spies, 2005). Las células NK también son reguladas por citocinas del microambiente tisular, entre ellas IL-2, IL-12 e IL-21, que median gran parte de su actividad anti-tumoral a través de la vía NKG2D (Gasser et al., 2005). En pacientes en los que no progresó el CaMa, se observó un incremento de la actividad de las células NK (Carson et al., 2004), por lo que la función natural se ha asociado a una respuesta anti-tumoral (Hadden, 1999; Dunn et al., 2004; Faxas et al., 1987).

En cuanto a las células dendríticas (DC del inglés Dendritic Cells), éstas son las células presentadoras de Ags más eficientes en la activación de células T y pueden presentar Ags relacionados con el CaMa por tres vías diferentes: a través de moléculas MHC clase I, clase II (presentación clásica) y a través de CD1



(presentación no clásica) (Cho and Bhardwaj, 2003; Allison, 2005). Las DCs pueden ser activadas por señales inflamatorias o —de peligro” provenientes de las células tumorales mamarias y así activar a los linfocitos T CD4 y CD8. Las DC en pacientes con CaMa en etapa temprana exhiben morfología de tipo inmadura, mientras pacientes con CaMa avanzado exhiben un alto grado de apoptosis. En pacientes con metástasis se aprecia una mayor expresión de moléculas co-estimuladoras de DCs (CD83) en el ganglio centinela y por consiguiente un aumento de RNAm del IFN- γ (Interferon gamma), IL-12p40 (Subunit beta of interleukin 12) e IL-10 (Matsuura et al., 2006).

I.2.3. Auto-anticuerpos y antígenos asociados a tumores de cáncer de mama.

El CaMa es una enfermedad heterogénea con tumores que expresan una variedad de proteínas aberrantes (Molina et al., 2005). Tanto IgM natural como adaptativa pueden reconocer como extraños a los TAA que han sufrido modificaciones post-traduccionales. IgM natural también media la destrucción del tejido tumoral al reconocer Ags de carbohidratos asociados a tumor (TACA por sus siglas en inglés) (Monzavi-Karbassi et al., 2007). La presencia de modificaciones post-traduccionales tales como glicosilación, fosforilación, oxidación y proteólisis pueden inducir una respuesta inmune mediante la generación de un nuevo epítotope, al estimular la presentación al MHC o al receptor de células T (Anderson et al., 2008; Tan et al., 2009). Las proteínas de las células modificadas están mal localizadas, mutadas, mal plegadas o la expresión es aberrante, y se asocian con procesos cancerígenos (como progresión del ciclo celular, transducción de señales, proliferación y apoptosis) (Tan et al., 2009; Anderson et al., 2008). Los glicanos de superficie celular que son secretados en el suero por células malignas proporcionan un mecanismo para el seguimiento de la carga tumoral. Muchas células malignas, pero no células normales, sobre-expresan CD20, ECFR, y HER2, lo que permite que estas proteínas sean utilizadas como una herramienta de diagnóstico, pero no diagnóstico temprano (Shishido et al., 2012; Kobata and Amano, 2005).



Los auto-Acs contra TAA que se encuentran en el suero de pacientes con cáncer de mama, se pueden detectar fácilmente, además de ser inherentemente estables y persistentes en el suero durante un período relativamente largo al no sufrir proteólisis, como otros polipéptidos (Tan et al., 2009).

I.2.3.1. Anticuerpos IgM dirigidos contra antígenos tumorales asociados al cáncer de mama.

Es importante considerar ambos tipos de IgM con el fin de desarrollar una herramienta para el diagnóstico temprano, antes que el tumor se haya establecido, ya que IgM natural e IgM adaptativa ejercen un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales.

En la actualidad, hay pruebas de sangre que identifican Acs tumorales en altos niveles en pacientes con enfermedad metastásica, pero son poco sensibles para su uso en el diagnóstico temprano del CaMa (Molina et al., 2005). Los TAA modulan la señalización transmembranal que se requiere para la proliferación, invasión y metástasis de células tumorales (Shishido et al., 2012). IgM natural e IgM adaptativa producidas contra TAA se puede utilizar como una señal temprana del CaMa *in vivo* y permitir una detección más temprana que los métodos actuales no permiten. Además, IgM natural se detecta en la etapa asintomática de cáncer, hasta 5 años antes de la aparición de la enfermedad (Fernández Madrid, 2005). Existen biomarcadores de diagnóstico de CaMa basados en IgG que están en fase de desarrollo, y cientos de auto-Acs o TAA reconocidos por auto-Acs que se han identificado, no obstante, no existen marcadores serológicos definitivos basados en Acs para el diagnóstico temprano del cáncer.

Algunos Acs IgM monoclonales se han aislado de los tumores de los pacientes, ya que este último elimina al tumor mediante apoptosis inducida *in vivo* (Vollmers and Brändlein, 2005a) por la vía independiente del dominio de la muerte celular debido a la unión a receptores de superficie específicos que inducen estrés celular (Vollmers and Brändlein, 2009).

En la **Tabla 1** se muestran ejemplos de Acs IgM usados en el estudio de Acs tumorales de cáncer de mama.



Tabla 1. Anticuerpos IgM usados en el estudio de antígenos tumorales de cáncer de mama.

Anticuerpo IgM	Blanco/Receptor	Descripción	Referencia
FC-2.15	Motivos de carbohidratos de diferentes glicoproteínas	Anticuerpo monoclonal murino. Reconoce células de cáncer de mama en específico los motivos de diferentes glicoproteínas y es capaz de mediar la lisis <i>in vitro</i> de células antígeno-2.15+ por complemento. Induce respuesta anti-tumor.	(Capurro et al., 1998)
SC-1	Epítotope de carbohidrato específico del Decay Acceleration Factor-B (DAF o CD55).	Anticuerpo natural. Induce apoptosis por cross-linking del receptor, tanto <i>in vitro</i> como en sistemas experimentales <i>in vivo</i> .	(Liu et al., 2013)
PAM-1	CFR-1 (Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos rico en cisteína).	Anticuerpo monoclonal. Bloquea los receptores de factores de crecimiento, tales como EGFR o FGFR sobre-expresados en las células malignas, conduce a la inanición y muerte celular.	(Brändlein et al., 2004)
SAM-6	Variante de GRP78 con peso molecular de 82 kDa sobre expresadas en células tumorales.	Anticuerpo natural. Es internalizado a través de endocitosis a la célula tumoral y es responsable de una acumulación letal de lipoproteínas oxidadas seguida de apoptosis.	(Brändlein et al., 2007; Pohle et al., 2004)
3EL.2	Antígeno sérico mamario (MSA)	Anticuerpo monoclonal murino. La identificación de MSA en sangre podría utilizarse como diagnóstico, al encontrarse anormalmente elevada en pacientes con cáncer de mama.	(Verring et al., 2011)
IgM anti-P10s	P10s reconoce Glico-esfingolípidos (GSL), como GD2, GM2, y el antígeno Lewis ^y (LeY).	Media la citotoxicidad dependiente de complemento. Es más citotóxica para las células tumorales que anticuerpos que reconocen proteínas, los cuales matan células tumorales por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.	(Ragupathi et al., 2005; Wondimu et al., 2008; Pashov et al., 2009)
IgM anti-MUC1	Mucina epitelial polimórfica (PEM o MUC1 en los epítotoes CA 15.3 y CA 27.29) y MUC16 (CA 125)	Anti-MUC1 puede controlar la diseminación tumoral hematogena y el crecimiento, ayudando a la destrucción de las células tumorales que expresan MUC1, ya sea que circulen o que estén establecidas.	(von Mensdorff-Pouilly et al., 2000; Gilewski et al., 2000)
IgM anti-CEA	Antígeno Carcinoembriogénico (CEA)	CEA se ha encontrado en pacientes con carcinoma ductal <i>in situ</i> , por lo que puede ser un marcador temprano del proceso tumorogénico.	(Conry et al., 2000; Albanopoulos et al., 2000)



I.2.4. Anticuerpos IgM.

IgM, que tiene cadenas pesadas μ , es siempre la primera clase de anticuerpo (Ac) producido por una célula B en desarrollo, aunque muchas células B eventualmente hacen "switch" a otras clases de anticuerpos (Acs) (Racine et al., 2011); además, es la primera en ser secretada a la sangre en las primeras etapas de la respuesta hacia la exposición a un Ag. IgM natural es parte de la primera línea de defensa del organismo, al no requerir estímulo antigénico para su producción. En su forma secretada, IgM es un pentámero compuesto de cinco unidades de cuatro cadenas, dando un total de 10 sitios de unión a Ag, que ofrece una valencia superior a las estructuras de otras inmunoglobulinas, permitiendo así una alta avidéz de unión a Ags (Bendtsen et al., 1998). Cada pentámero contiene una copia de otra cadena de polipéptidos llamada cadena J (joining) (**Figura 3**) (Alberts et al., 2002).

Se ha demostrado que IgM regula el desarrollo de células B (Lim et al., 2005), para facilitar la eliminación de células apoptóticas (Shaw et al., 2000), modula las respuestas inflamatorias (Zhang et al., 2004) y enfermedades autoinmunes (Ray et al., 1996), y la eliminación de las células cancerosas (Vollmers and Brändlein, 2009).

La unión de un Ag a una sola molécula de IgM pentamérica secretada puede activar el sistema del complemento. Cuando el Ag se encuentra sobre la superficie de un patógeno invasor, de células senescentes, restos celulares, célula pre-cancerosa o cancerosa, y se da la activación del complemento, éste puede marcar cualquiera de los patógenos o células transformadas para fagocitosis o matarlo directamente (Alberts et al., 2002).



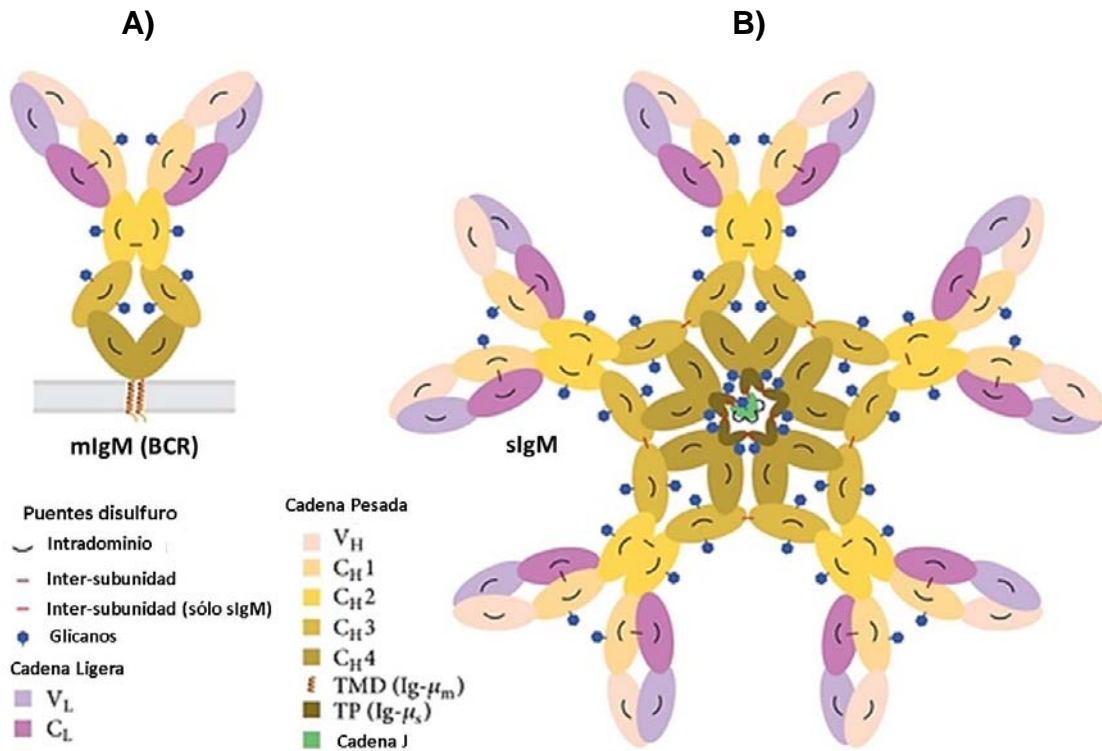


Figura 3. Representación esquemática de IgM unida a membrana y de IgM secretora. Los linfocitos B presentan IgM (mIgM) unida a la membrana en su superficie como parte central del BCR (A). Una vez en la etapa de células plasmáticas, éstas producen IgM secretora (sIgM) en forma "pentamérica" (B). Las cadenas pesadas y las cadenas ligeras consisten en diversos dominios dentro de la inmunoglobulina VH, CH1-4; VL, CL se muestran en colores. Los glicanos y enlaces disulfuro intra- e inter-subunidades entre cadenas pesadas, cadenas ligeras y cadena J también se muestran. La cadena pesada en mIgM difiere de la cadena pesada en sIgM en su C-terminal, una tiene un dominio transmembranaral (TMD) y la otra una región rica en cisteína (TP), respectivamente (Anelli and van Anken, 2013).



I.2.4.1. Anticuerpos IgM naturales.

Los Acs naturales son predominantemente IgM, aunque también existen IgA e IgG (Casali, P. and Schettino, 1996; Coutinho et al., 1995; Panda and Ding, 2014), son poli-reactivos y de baja afinidad (Lopes-Carvalho and Kearney, 2004).

IgM natural circula en individuos sanos aún en ausencia de estimulación antigénica exógena o selección impulsada por Ags (Madi et al., 2009; Merbl et al., 2007). El nivel de IgM natural en el suero de los recién nacidos y en animales que crecen bajo condiciones estériles y con una dieta libre de Ags no difiere de la de animales normales (Klimovich, 2011); también se encuentran en los seres humanos (Schettino et al., 1997).

IgM natural juega un papel importante en los mecanismos de defensa primario (Bohn, 1999; Boes, 2000; Brändlein et al., 2003). Están involucrados en el reconocimiento temprano y la eliminación de invasores bacterianos y virales, y de materiales propios alterados del organismo, ya que reaccionan con receptores de la superficie celular, y reconocen y eliminan células apoptóticas y senescentes, restos celulares, y Ags "propios" (Vollmers and Brändlein, 2006b, 2009; Baumgarth, 2011; Nagele et al., 2013; Bohn, 1999). Los auto-Acs naturales IgM pueden ayudar a suprimir las respuestas patogénicas de auto-Acs IgG (Boes et al., 2000).

IgM natural se asocia con el reconocimiento y la eliminación de células precancerosas y cancerosas (Vollmers and Brändlein, 2009; Brändlein et al., 2003; Vollmers and Brändlein, 2005a; Brändlein et al., 2004; Vollmers and Brändlein, 2005b; Manson et al., 2005). Se une preferentemente a Ags modificados post-transcripcionalmente de la superficie celular que son específicos de tumor, debido a que IgM natural reconoce estructuras conservadas de epítopes de carbohidratos (Hensel et al., 2001; Brändlein et al., 2003; Hensel et al., 1999; Rauschert et al., 2008; Kobata and Amano, 2005). Los epítopes de carbohidratos reconocidos por IgM natural se expresan de forma estable en una variedad de tumores y en diversas etapas precursoras. A diferencia de los epítopes basados en péptidos de cadena simple, los glico-epítopes comparten homologías estructurales más allá de los límites de las familias de proteínas. Los glico-epítopes reaccionan de forma



cruzada y son preferidos como objetivos para los Acs IgM natural (Vollmers and Brändlein, 2006b).

Los Acs IgM natural son producidos por un pequeño sub-set de células B1 o CD5+ y células B de la zona marginal (MZ), las cuales no requieren maduración de la afinidad para proporcionar protección temprana (Milner et al., 2005). Las células B-1 poseen el fenotipo B220^{low}IgM^{hi}CD23^{low}/CD43⁺IgD^{low}. Estas células exhiben características de las células activadas y son más grandes en tamaño y complejidad citoplasmática que las células B2 (Merino and Gruppi, 2006).

Los Acs IgM natural son codificados por la línea germinal y no madurados por afinidad. Más del 80% de las IgM naturales son expresadas por los genes VH de la familia de genes VH3 (Notkins, 2004) y tienen relativamente baja afinidad ($K_d=10^{-4}-10^{-7} \text{ mol}^{-1}$) (Zhou et al., 2007). La eficacia de la interacción Ag-Ac se ve reforzada por la potencia relativa de IgM en la participación de la ruta del complemento; a diferencia de IgG, una sola molécula de IgM puede unirse a C1q y activar el complemento (Manson et al., 2005). IgM natural está equipada con cadenas ligeras lambda, a diferencia de los Acs pertenecientes al sistema inmune adaptativo, que poseen cadenas ligeras kappa. Para comprobarlo, se estudió el origen genético de las regiones variables de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de las IgM naturales que fueron producidas por células del bazo de pacientes con CaMa. Se amplificaron, clonaron y secuenciaron los genes de las cadenas VH y VL, y las secuencias fueron comparadas con los genes de la línea germinal correspondientes para detectar mutaciones somáticas. La identidad de las secuencias de nucleótidos entre los segmentos VH de IgM y los genes VH de la línea germinal fue del 92.3 a 100%. En cuanto al grado de identidad de las secuencias de nucleótidos de los segmentos VL, con respecto a los genes VL de la línea germinal, fue de 94 al 100%, además de coincidir con cadenas ligeras de tipo lambda. La homología tan cercana de las regiones VH y VL a los genes de la línea germinal y los respectivos índices R:S (indicador de la maduración de la afinidad de los Acs) indicaron que ninguno de las IgM naturales presentaban maduración de la afinidad por mutación somática debida al contacto con Acs (Brändlein et al., 2003).



I.2.4.2. Anticuerpos IgM adaptativos.

La IgM adaptativa es la primera en aparecer después de un desafío inmunológico, pero su producción disminuye normalmente durante el desarrollo de la respuesta de IgG. En consecuencia, generalmente no se considera que IgM desempeñe un papel importante en la inmunidad a largo plazo, aunque es muy eficaz en la defensa del huésped (Manz et al., 2005; Racine et al., 2011).

La inmunidad humoral de larga duración se asocia típicamente con la presencia de Acs de alta afinidad y cambio de isotipo (de IgM a IgG) (Manz et al., 2005). IgM inducida por inmunización difiere de IgM natural por su estructura en los centros de unión de Ags, ya que reconoce epítopes de proteínas, en la especificidad del repertorio al ser Acs mono-reactivos, y el espectro de sus funciones al ser secretadas después de un reto inmunológico (Klimovich, 2011; Baumgarth et al., 2000a). Los Acs IgM adaptativos comprenden una fracción relativamente pequeña de moléculas circulantes, son mono-reactivas, tienen mayor afinidad ($K_d=10^{-7}$ - 10^{-11} mol⁻¹), y sus regiones variables contienen mutaciones puntuales que evidencian un proceso de hiper-mutación somática. La vida media de IgM mono-reactiva es de 35 h (Zhou et al., 2007; Notkins, 2004).

IgM adaptativa es producida por células B2 o células B foliculares, que son arquetípicas del sistema inmune adaptativo. Las células B2 están implicadas en reacciones T-dependientes del centro germinal y conducen a las células de memoria y a las plasmáticas de alta afinidad (Lopes-Carvalho and Kearney, 2004). Las células B2 maduras producen Acs después de haber sido estimuladas, expandidas, y seleccionadas en los centros germinales (GC) en presencia de células Th (células T helper); son importantes en la respuesta inmune adaptativa porque representan la primera línea de defensa contra la mayoría de las infecciones. La respuesta inmune adaptativa requiere al menos una semana para producir Acs mono-específicos de alta afinidad, IgM primero, y después del cambio de isotipo, IgG (Carsetti et al., 2004). Las células B2 presentan el fenotipo B220^{hi}IgM^{int}CD23^{hi}IgD^{hi} (Merino and Gruppi, 2006).



I.2.4.3. Papeles de IgM natural e IgM adaptativa contra células cancerosas.

La **Figura 4** muestra las diferentes funciones de IgM natural y adaptativa contra células transformadas, identificadas en experimentos con modelos murinos. También se muestra el comportamiento de IgM e IgG mediante el desarrollo de un tumor de cáncer de mama. IgM natural y adaptativa se mantiene constante desde que se inicia la transformación celular hasta que se establece el tumor. IgG está presente sólo en la primera etapa de la inmunidad adaptativa, pero cuando se establece el tumor, IgG es inmunodeficiente.

En la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, IgM natural e IgM adaptativa, respectivamente, protegen al organismo de una infección patógena, restos celulares, senescencia y células transformadas, utilizando diferentes estrategias como la activación del complemento vía clásica en colaboración con C1q (Ogden et al., 2005). IgM se une fuertemente al factor del complemento C1q y activa la cascada de la vía clásica (Quartier et al., 2005), la neutralización directa (Ochsenbein et al., 1999; Baumgarth et al., 2000b; Jayasekera et al., 2007), y la eliminación de células apoptóticas por fagocitosis (Chen et al., 2009), debido a la unión de IgM a lectina unida a manosa (MBL), que a su vez se une a células apoptóticas (Nauta et al., 2003), y dirige la eliminación de complejos inmunes mediante la unión al receptor Fcα/mR putativo en los fagocitos.



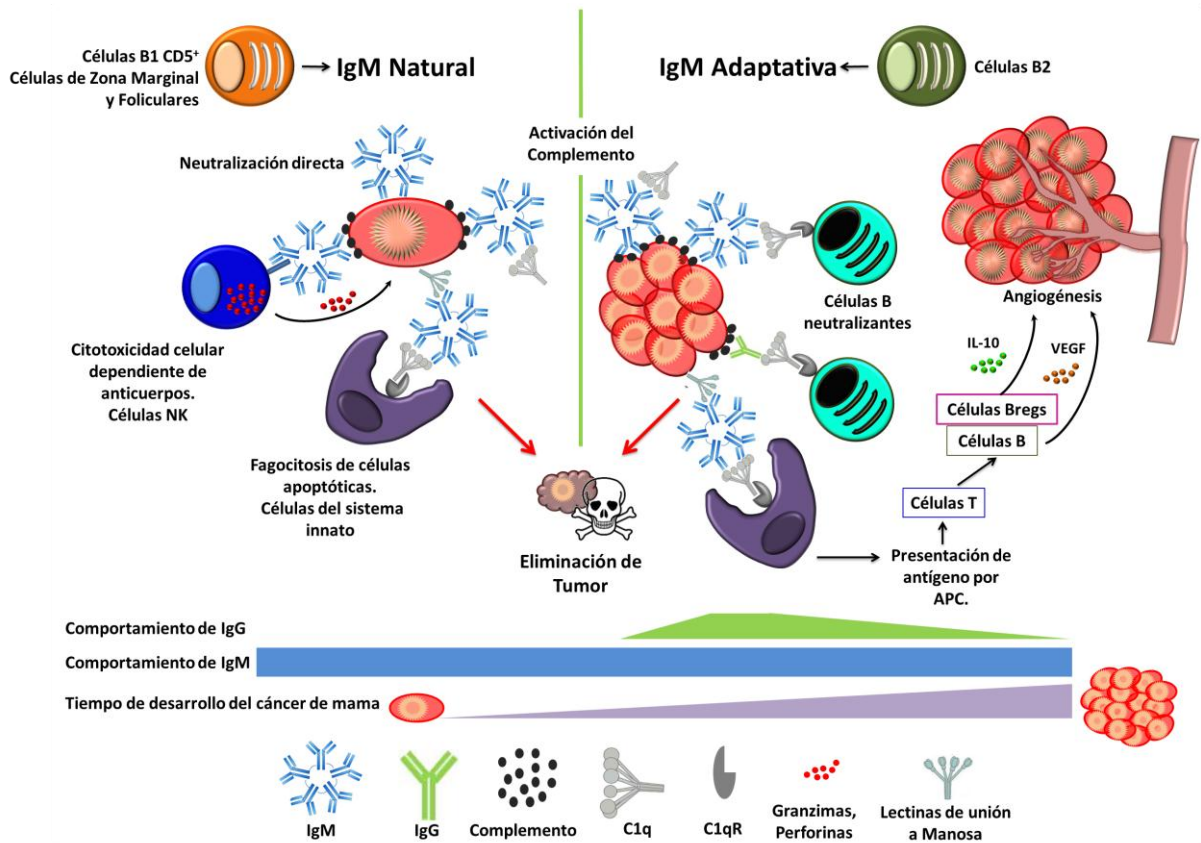


Figura 4. Ambos tipos de IgM presentan varios papeles en la respuesta inmune, cuando las células comienzan a transformarse (IgM natural) y cuando un tumor ya está creciendo (adaptativo IgM). IgM natural es producida por células B1 y células de la zona marginal, e IgM adaptativa es producida por células B2. Estos papeles llevan a la eliminación de la célula tumoral, pero cuando se establece tumor, componentes del sistema inmune como las células B y las células B reguladoras adaptativas (Breg) secretan factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e IL-10, respectivamente, lo que promueve la angiogénesis, se inhiben las respuestas de células T y promueven la progresión, lo que facilita la propagación de las células neoplásicas. IgG está presente en las primeras etapas del cáncer de mama, pero es inmunosuprimida con el tiempo, mientras que IgM natural se presenta antes de que las células tumorales se detecten, e IgM adaptativa es constante a través del desarrollo del tumor (Díaz-Zaragoza et al., 2015).

Ambas, IgM natural y adaptativa participan en el mecanismo para reclutar Ags dentro de los órganos linfoides secundarios, estimulando así la subsiguiente respuesta inmune adaptativa (Boes et al., 1998; Baumgarth et al., 2000a). Este es el enlace entre los sistemas inmune innato y adaptativo. En el brazo de la inmunidad adaptativa, después de que aparece IgM y se da la activación de células T y B y de células B reguladoras adaptativas (Bregs), los mecanismos



inmunológicos se dañan y la relación tumor-inmunidad puede prevalecer en un estado de inmunosupresión (Rodríguez and Padilla, 2008; Zhang, 2013), lo que provoca que la respuesta inmune en las últimas etapas no pueda desarrollar estrategias que eliminen a las células tumorales. Además, las células B del infiltrado inflamatorio inducen la liberación de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueve la angiogénesis y facilita la propagación de las células neoplásicas a través vía linfática a los ganglios linfáticos regionales (Coronella et al., 2002).

Las células Bregs producen IL-10, lo que puede condicionar efectos supresores sobre la inmunidad sistémica al inhibir la respuesta de células T y promover la progresión tumoral al favorecer la inducción de factores pro-inflamatorios e inductores de la angiogénesis (Llanes-Fernández et al., 2006; Rodríguez and Padilla, 2008).

I.3. Modelos murinos para el estudio del cáncer de mama.

En el estudio de estrategias para el tratamiento y prevención del cáncer de mama, se utilizan varios modelos murinos que ayuden a desarrollar herramientas de detección temprana. De ellos los más utilizados son dos, en el primer modelo se utilizan ratones transgénicos PyVT que desarrollan cáncer metastásico espontáneamente al expresar el oncogen viral —middle T” de polyomavirus (Guy et al., 1992). En segundo modelo consiste en células tumorales de mama de ratón (4T1) cultivadas *in vitro* e implantadas en las glándulas mamarias de ratones BALB/c (**Figura 5**) (Dexter et al., 1978).

1.3.1. Modelo murino BALB/c y células tumorales 4T1.

El carcinoma de mama 4T1 es una línea celular de tumor trasplantable aislado originalmente por Fred Miller y colaboradores, proveniente del tejido epitelial de la glándula mamaria del ratón. El tumor crece en ratones BALB/c y en cultivo de tejidos. Es uno de los cuatro sub-líneas derivadas del tumor 410.4, que se aisló a partir de un solo tumor mamario espontáneo derivado de un ratón BALB/c MMTV+ alimentado y criado por una nodriza C3H (BALB/BfC3H) (Dexter et al., 1978; Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001).



La línea celular 4T1 fue seleccionada por su resistencia al medicamento 6-tioguanina, lo que permite la cuantificación precisa de las células metastásicas, incluso cuando su difusión es a nivel sub-microscópico a órganos distantes. El carcinoma de mama 4T1 es un tumor poco inmunogénico y altamente maligno, que rápida y espontáneamente hace metástasis de la glándula mamaria a múltiples sitios distantes, incluyendo ganglios linfáticos, sangre, hígado, pulmones, cerebro y huesos (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 1998; Lelekakis et al.). R ratones BALB/c inoculados con 7×10^3 células 4T1 en la glándula mamaria desarrollaron tumores primarios palpables dentro de la segunda y tercera semana, y hubo metástasis a los ganglios linfáticos, los pulmones y el hígado en 86%, 79% y 20% de los ratones, respectivamente (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 1998).

El tumor 4T1 tiene varias características que lo convierten en un modelo experimental animal adecuado para el CaMa humano. En primer lugar, las células tumorales son fácilmente trasplantadas en la glándula mamaria de forma que el tumor primario crece en el sitio anatómico correcto. En segundo lugar, como en el CaMa humano, la enfermedad metastásica 4T1 se desarrolla de forma espontánea del tumor primario. También, la propagación progresiva de metástasis 4T1 a los ganglios linfáticos y otros órganos es muy similar al del CaMa humano. El tumor primario fácilmente puede extirparse quirúrgicamente, por lo que la enfermedad metastásica se puede estudiar en un ambiente animal comparable a la situación clínica en la que se extirpa quirúrgicamente el tumor primario, y los focos metastásicos permanecen intactos (Pulaski et al., 2000).



Figura 5. Características in vivo de tumores 4T1 primarios. (A) Tumores 4T1 son altamente vascularizados. (B) Ulceraciones en piel pueden aparecer donde el tumor primario 4T1 está creciendo. (C) Tumor 4T1 puede extenderse al revestimiento peritoneal. (Imágenes tomadas de (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001).



1.3.2.1. Desventajas del Modelo murino BALB/c y células tumorales 4T1.

Entre algunos de los problemas que pueden presentarse durante el uso de este modelo murino, son un pobre crecimiento del tumor primario *in vivo* y como consecuencia poco desarrollo de metástasis, debido a un crecimiento tumoral lento. Se debe asegurar que las células tumorales 4T1 estén sanas, no permitir que éstas proliferen con una confluencia mayor al 80% *in vitro*, y no cultivarlas durante un periodo de tiempo prolongado. Es aconsejable descongelar células frescas cada 2 a 3 meses y si es posible, sólo inocular el ratón con células que han crecido en cultivo celular menos de 4 semanas. Al inocular al ratón en la glándula mamaria, no mantener a las células en hielo por más de una hora, y no inyectar grandes grupos de ratones al mismo tiempo, ya que como consecuencia puede disminuir la viabilidad de las células. Cada vez que la jeringa se carga, la solución con células debe de mezclarse, porque las células se sedimentan mientras están en el hielo. Para obtener datos estadísticamente significativos en los tamaños del tumor primario, la inoculación de las células debe hacerse en grupos de 5 a 8 ratones, mientras los grupos para aislar células metastásicas deben ser de 8 a 10 ratones (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001).



II. JUSTIFICACIÓN

Existen diferentes herramientas para el diagnóstico del cáncer de mama, como son la auto-exploración, la exploración médica, el ultrasonido y las mamografías, sin embargo, en México sólo del 5 al 10% de los casos se detectan en las fases iniciales de la enfermedad, a diferencia del 50% de los casos que son detectados en los Estados Unidos de América. Por lo cual, es importante mejorar y ampliar el tamizaje para la detección temprana de este tipo de cáncer, y buscar nuevas estrategias para el diagnóstico temprano.

La mayoría de las investigaciones sobre el cáncer de mama se han enfocado en el establecimiento de biomarcadores basados en IgG como tratamiento para etapas avanzadas. Pero se ha reportado que las mujeres que padecen cáncer de mama presentan inmunosupresión de anticuerpos IgG. Aun así, el sistema inmune humoral tiene la capacidad de detectar células tumorales en etapas tempranas de la transformación celular por medio de anticuerpos como IgM.

IgM tiene la capacidad de eliminar a las células cancerosas en las primeras etapas de la transformación celular, al reconocer cambios mínimos presentes en algunos antígenos asociados a tumor (proteínas o carbohidratos con estructuras aberrantes). Sin embargo, son pocos los estudios sobre IgM natural e IgM adaptiva y su participación en el reconocimiento temprano de antígenos asociados a tumores mamarios, por lo que es importante estudiarlas, para poder considerarlas como una posible herramienta de diagnóstico temprano del cáncer de mama.



III. HIPÓTESIS

Al caracterizar la variabilidad de la respuesta inmune humoral de IgG e IgM, las variables asociadas al ratón y al tumor influirán en el crecimiento y tamaño tumoral, por lo que la confrontación inmunológica ratón/antígenos tumorales por individuo será diferente, según la etapa del desarrollo de la enfermedad.

Además, la diversidad inmunológica de la relación ratón/antígenos tumorales será diferente entre individuos, y entre sexos.



IV. OBJETIVOS

IV.1. General.

Describir la respuesta inmune humoral (IgG e IgM) hacia el cáncer de mama ductal (CaMa) murino en las diferentes etapas de desarrollo de la enfermedad para obtener antígenos-anticuerpos candidatos a ser una posible herramienta para el diagnóstico temprano.

IV.2. Específicos.

- Caracterizar la variabilidad de la respuesta inmune humoral IgM e IgG de ratones con CaMa implantados con células tumorales 4T1.
- Detectar las diferencias en el reconocimiento de los antígenos derivados del CaMa por los Ac del suero de cada ratón.
- Correlacionar estadísticamente las reacciones antígenos-anticuerpos con variables asociadas al individuo (sexo, edad e inmunoglobulina) y al tumor (tamaño y etapa de desarrollo del tumor).



V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

V.1. Cultivo Celular.

La línea celular tumoral 4T1 (ATCC® CRL-2539) fue donada por el Dr. Karen Manucharyan del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino y 1X de la mezcla antibiótico-antimicótico (estreptomicina-ampicilina), en cajas de cultivo de 25 cm² (Corning), e incubadas a una temperatura de 37°C más 5% de CO₂. Después de alcanzar una confluencia del 80%, las células fueron lavadas tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a pH 7.4; colectadas y usadas para la implantación en ratones y para la extracción de proteínas.

V.1.2. Ratones y Línea Celular.

Se utilizaron 9 ratones BALB/c AnN hembras y 9 machos de 8 semanas de edad adquiridos y mantenidos en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, con agua y alimento *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo al Código de Ética para el personal académico del Instituto:

http://www.biomedicas.unam.mx/_administracion/_unidades_apoyo_inst/bioterio.html

V.1.3. Implante de las células tumorales.

Para desarrollo tumoral, cada ratón BALB/c se afeitó en el abdomen y 10⁴ células tumorales 4T1 en 50 µL de solución inyectable fueron inyectadas vía subcutánea en el pezón de la glándula mamaria derecha. Los tumores se dejaron crecer durante 35 días. Ya extraído, el tumor fue medido en dos dimensiones perpendiculares con un calibrador Vernier, y el tamaño del tumor se calculó de acuerdo a la fórmula $V \text{ (mm}^3\text{)} = a \text{ (eje mayor)} \times b^2 \text{ (eje menor)} / 2$ (Carlsson et al., 1983).



V.1.4. Obtención del suero.

Los ratones se sangraron por la arteria coccígea media de la cola una vez por semana durante 6 semanas. El primer sangrado se hizo antes de la implantación de las células tumorales 4T1 (Semana 0) y se denominó Suero pre-immune. Después del implante de las células tumorales, los ratones se sangraron semanalmente (Tiempo 1, 2, 3, 4 y 5). La sangre se refrigeró a 4°C por 30 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. El suero se almacenó a -20°C hasta su uso.

V. 2. Electroforesis e inmunoblots de 2 Dimensiones (Inmunoblot-2D).

Para generar las imágenes de inmunoblot de 2 dimensiones (Inmunoblot-2D), se confrontó la proteína (Ag) de las células tumorales 4T1 contra los Ac del suero de cada ratón obtenido antes del implante de células (Semana 0) y durante las diferentes semanas de desarrollo del tumor (Semanas 1, 2, 3, 4 y 5), tanto para IgG como IgM, con un duplicado por cada inmunoblot-2D.

V.2.1. Extracción de proteínas del cultivo celular 4T1.

Para obtener las proteínas totales (Ag) de las células tumorales 4T1, una vez que los cultivos habían alcanzado una confluencia del 80%, las células se lavaron tres veces con PBS pH 7.4, y después se lisaron al colocar directamente sobre el cultivo 1 mL de Buffer 2D (Urea 6M, DTT 50mM, 2% CHAPS, 2% de Anfollinas pH 3-10 (Bio-Lyte) y H₂O MilliQ). El lisado se recuperó en un tubo de 1.5 mL (Eppendorf), se agitó a 4°C durante 30 minutos, después se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min a 4°C y al final el sobrenadante se recuperó.

Para cuantificar la concentración de proteínas, se elaboró una curva de calibración con concentraciones conocidas de la proteína albúmina de suero bovino (BSA), que se midieron por el método de Bradford en un espectrofotómetro (DU® 730 Life Science UV/Vis, Beckman Coulter). La absorbancia de cada concentración se graficó y se hizo una regresión lineal en el programa Excel 2010, con la ecuación resultante de la regresión lineal se calculó la cantidad de proteína



en $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de la solución de las células 4T1 lisadas. Las proteínas de las células 4T1 se congelaron a -80°C hasta su uso.

V.2.2. Hidratación de las tiras IPG.

Para la hidratación de las tiras IPG de 7 cm de gradiente de pH inmovilizado (pHi de 3-10, GE HEALTHCARE) se mezclaron por tira 100 μg de proteínas de células tumorales 4T1 con una solución de Urea 6M, DTT 50mM, 2% CHAPS, 2% de Anfollinas pH 3-10 (Bio-Lyte), 0.001% azul de bromofenol, y llevar a 125 μL con H_2O MilliQ.

Los 125 μL de la solución se pusieron a lo largo de uno de los carriles de la bandeja de hidratación, la tira IPG se colocó cuidadosamente sobre la solución sin formar burbujas. Se dejó que la tira absorbiera la solución durante 1 hr y después se cubrió con 900 μL de aceite mineral. Se dejó hidratar toda la noche.

V.2.3. Isoelectroenfoque.

Cada tira hidratada se colocó en uno de los carriles de la bandeja de separación del equipo de Isoelectroenfoque (Protean IEF Cell, BioRad) para separar las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (una dimensión). El programa de separación consistía en 3 pasos: 1) Aumento lineal del voltaje hasta llegar a 250 V en 20 min, 2) Aumento lineal del voltaje hasta llegar a 4000 V en 2 hrs, y 3) Aumento rápido del voltaje a 4000 V y constante hasta la acumulación de 10,000 Volts-hora. Terminada la separación, las tiras se envolvieron en papel aluminio y se guardaron a -80°C .

V.2.4. Equilibrio de la Tiras IPG.

Cada tira con las proteínas ya separadas por punto Isoeléctrico se equilibró con dos lavados, en el primero se agitó con 2 mL de urea 6M, 0.375M Tris-HCl pH8.8, 2% SDS, 20% glicerol y 2%(w/v) DTT durante 10 min; y en el segundo lavado se agitó con 2 mL de urea 6M, 0.375M Tris-HCl, pH8.8, 2% SDS, 20% glicerol y 2.5% (w/v) Iodo-Acetamida.



V.2.5. Electroforesis 2D.

La tira IPG equilibrada se colocó sobre un gel de acrilamida (Mini Protean® TGX™ Precast Gels Tris-HCl Gel, 4-20%, IPG well, Bio-Rad) para separar electroforéticamente las proteínas en dos dimensiones (peso molecular) en un buffer de Tris-glicina-Dodecil sulfato de sodio (25 mM Tris, pH 8.3, 250 mM glicina y 0.01% SDS) a una corriente constante de 100 Volts por aproximadamente 1 hr 40 min en una cámara de electroforesis (Mini-Protean, Bio-Rad).

V.2.6. Transferencia a membrana de nitrocelulosa.

Las proteínas ya separadas en dos dimensiones, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 100 Volts por 1 hr y 10 min en el buffer Tris-glicina-metanol (Tris 25 mM, pH 8.3, 250 mM glicina y 20% metanol v/v) en cámara húmeda (Trans-blot Cell, Bio-Rad).

Terminada la transferencia, la membrana se colocó en 20 mL de ácido clorhídrico (HCl) 12 mM por 5 min, después se tiñeron las proteínas agitando fuertemente en 10 mL de colorante CPTS (copper(II) phthalocyanine-3,4',4'',4'''-tetrasulfonic acid tetrasodium salt), el colorante se retiró y la membrana se enjuagó con HCl 12 mM. La membrana se digitalizó en un escáner HP (Scanjet G4050) a una resolución de 300 dpi en formato TIFF, y después se destiñó con 20 mL de solución Eracer (50 mL 0.2 M KCl + 40.8 mL 0.2 M NaOH, pH 12.5).

V.2.7. Western Blot.

La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 20 mL de leche descremada 5% (Svelty en polvo) en PBS+Tween 20 (0.03%) pH 7.4, y se agitó durante toda la noche a 4°C. Pasado la incubación, la membrana se colocó en una bolsita de celofán con 5 mL de 5% de leche descremada en PBS-Tween 20, más 20 µL del suero de una de las semanas de sangrado del ratón (Ac primario dilución 1:250). Se selló la bolsa (Selladora Uline Poly bag H-163) y la membrana se agitó toda la noche a 4°C.

Transcurrida la incubación, la membrana se lavó 4 veces durante 10 min cada una con 20 mL de PBS-Tween 20. Después fue incubada con 8 µL de Ac secundario, IgG o IgM, dependiendo de la reacción (dilución 1:2500, IgG/IgM anti-



ratón, ZYMED México) en 20 mL de PBS-Tween 20 y se agitó por 1 hr a T° ambiente. La membrana se lavó 4 veces durante 10 min cada una con 20 mL de PBS-Tween 20.

La membrana se reveló con 20 mL de 3,3'-Diaminobencidina (DAB)-PBS-Tween 20 (10 mg de DAB en 100 mL de PBS-Tween 20) y 10 µL de Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30%, se agitó por 10 min, y para detener la reacción se lavó la membrana con agua destilada.

V.3. Análisis de las imágenes de Inmunoblot-2D.

V.3.1. Procesamiento de las imágenes.

El análisis de las imágenes de inmunoblot-2D se hizo a partir de lo reportado por (Ostoa-Saloma et al., 2009).

Cada inmunoblot-2D se digitalizó en un escáner HP (Scanjet G4050) a una resolución de 300 dpi en formato TIFF con los mismos parámetros de intensidad de luz y área para minimizar errores.

Se obtuvo una imagen Master a partir de los duplicados de los inmunoblot-2D con el programa PdQuest (Bio-rad). Las imágenes Master se transfirieron al programa Adobe Photoshop para acoplarlas de acuerdo a las bandas del marcador de peso molecular y algunas —~~Pro~~teínas inmunoreactivas” específicas (denominadas de aquí en adelante como Spots o reacciones AgAc) que se compartían en la mayoría de las imágenes. Con las imágenes Master acopladas, los spots y sus coordenadas, de acuerdo a su peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (PI), se identificaron con el programa PdQuest (Bio-rad). El número de spots únicos de cada imagen de inmunoblot-2D de las semanas 1 a la 5 se obtuvo restando los spots que estaban presentes en los inmunoblots-2D de la semana 0 o suero pre-inmune. La resta de los spots se hizo de acuerdo a sus coordenadas.

V.3.2. Clustering.

Una vez que los spots de cada imagen de inmunoblot-2D se identificaron, cada imagen se cuadrículó en 100 casillas iguales, 10 columnas en el eje X (PI) y 10 líneas en el eje Y (PM). De acuerdo al número de spots dentro de cada casilla,



se le asignó el valor de 1 (si hay 1 ó más spots) y 0 (ausencia de spots) para producir una matriz de 0s y 1s, necesaria para el análisis estadístico.

La matriz se convirtió en un vector mediante la colocación de la fila n-ésima (n-th row) inmediatamente después de su predecesor. Así, en lugar de una matriz de 10x10, se generó un vector con 100 lugares que contenían los valores de 0s y 1s. Este vector fue utilizado como entrada para el script Python con el que se llevó a cabo la agrupación completa (clustering) con el paquete hcluster (<https://pypi.python.org/pypi/hcluster/0.2.0>). Para este análisis, se eligió la métrica de distancia del valor absoluto (city block metric), en el que la distancia entre 2 puntos es la suma de las diferencias absolutas en sus coordenadas cartesianas. La agrupación jerárquica resultante se presentó como un dendrograma.

V.3.3. Análisis estadístico.

Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar el número total de spots y conocer si había diferencias estadísticamente significativas en el reconocimiento de Ag con respecto a la inmunoglobulina o sexo. Se utilizó la prueba t para comparar tamaños tumorales. La relación entre el tiempo y el número promedio de spots se analizó mediante la correlación de Spearman. La regresión lineal se realizó para analizar la existencia o la falta de correlación entre el volumen del tumor y el número de spots. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SAS 9.0. El valor de p- para determinar la significancia en este estudio fue de $P = 0.1$.



VI. RESULTADOS

VI.1 Cultivo de la línea celular 4T1.

La línea celular 4T1 fue cultivada en el laboratorio (**Figura 6**), las células se proliferaron para tener un reservorio en nitrógeno líquido para futuros experimentos.

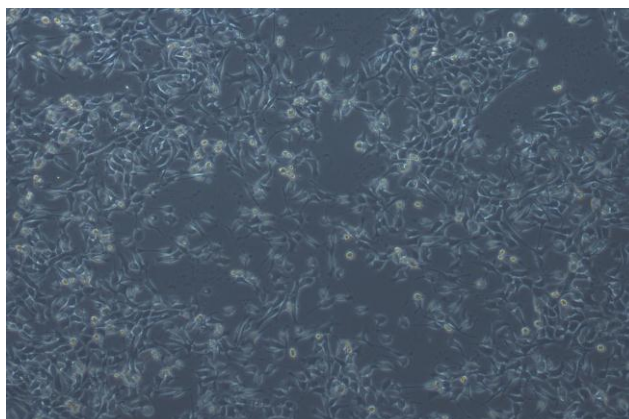


Figura 6. Fotografía de células 4T1 cultivadas en el laboratorio de inmunología. 100X.

VI.1.1. Implante de las células tumorales.

En la **Figura 7A** se muestran el volumen en mm^3 de los 9 tumores de los ratones hembra y de los 9 ratones macho BALB/c implantados con células 4T1. Los tumores se clasificaron de acuerdo a los rangos de tamaño de volumen siguiente: Ausente (0 mm^3), Pequeño ($1-1400 \text{ mm}^3$), Mediano ($1401-2800 \text{ mm}^3$) y Grande ($2801-4200 \text{ mm}^3$) (**Figura 7B**).

Al observar cada uno de los tumores, se veía que los tumores de ratones machos tenían un mayor tamaño comparados con los de hembras (**Figura 8**). Sin embargo, al aplicar la fórmula para calcular el volumen en mm^3 , el tamaño entre ambos sexos no es diferente, lo que se comprobó con la desviación estándar y el promedio del tamaño del tumor entre hembras y machos, no hubieron diferencias estadísticamente significativas.



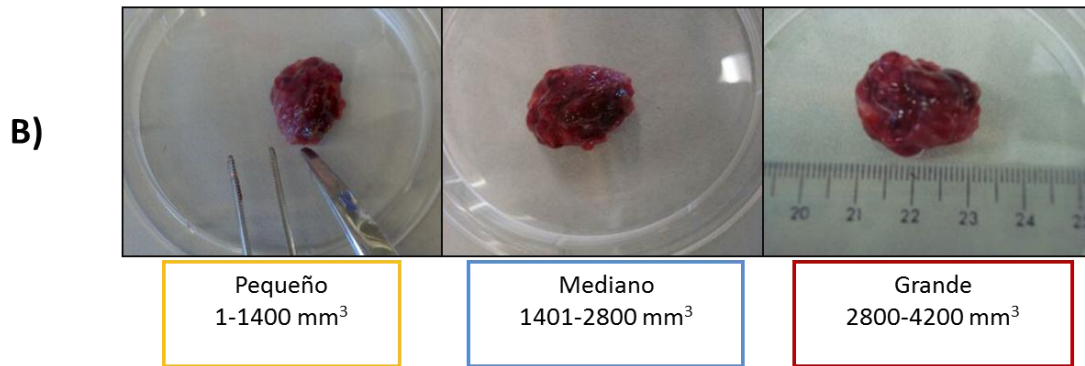
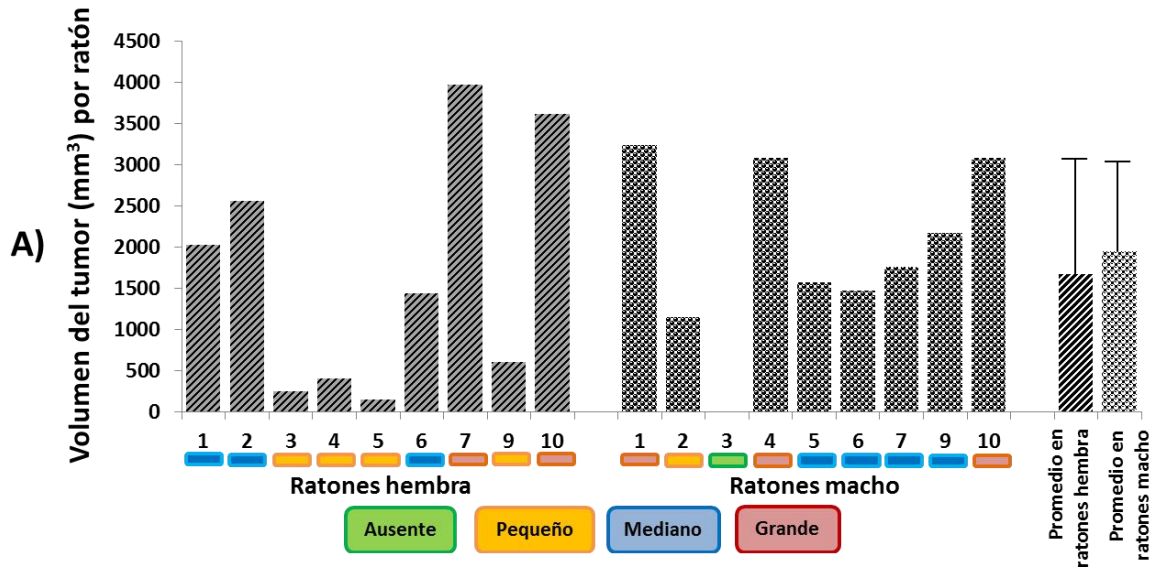


Figura 7. Tamaño del tumor de ratones hembra y machos. A) Gráfica de los volúmenes en milímetros cúbicos así como su clasificación de acuerdo a la categoría de ausente, pequeño, mediano y grande. Se muestra la desviación estándar entre el promedio del volumen de ratones hembras y machos, donde no se observan diferencias significativas. B) Fotografías que muestran un ejemplo de cada categoría en la que se clasificaron los tumores.

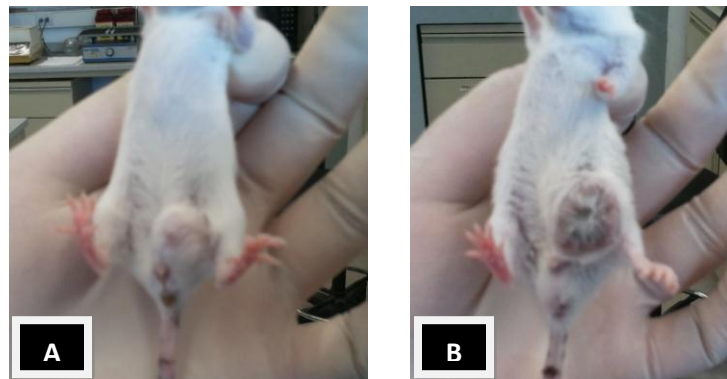


Figura 8. Fotografía de un ratón (A) hembra y (B) macho con su tumor en la mama a los 35 días de haber implantado las células 4T1.



VI.2. Electroforesis e inmunoblots de 2 Dimensiones (Inmunoblot-2D).

VI.2.1. Cuantificación de las proteínas de la línea celular tumoral 4T1.

Las células tumorales 4T1 cultivadas a gran escala, fueron lisadas para obtener las proteínas que se usaron en la elaboración de los inmunoblots-2D. Las proteínas de las células 4T1 se conjuntaron en un pool para calcular su concentración, a partir de una curva de calibración hecha con concentraciones conocidas de Albúmina de Suero Bovino (BSA), donde se obtuvo un $R^2 = 0.9986$ (Figura 9). La concentración de proteínas 4T1 en 1 μL de solución fue de $7.154 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$, a partir de las cuales se hicieron alícuotas con 100 μg de proteína.

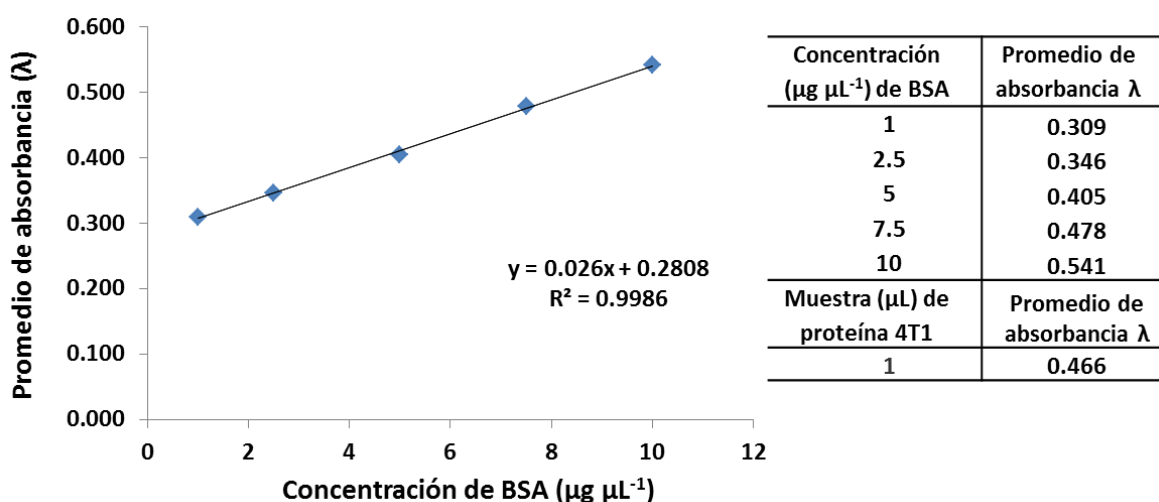


Figura 9. Curva patrón para la medición de proteína de las células 4T1 por espectrofotometría. Coeficiente de correlación de 0.9986.

VI.2.2. Electroforesis 2 Dimensiones (2D).

En la Figura 10A se muestra un gel representativo con el universo de proteínas del extracto de las células tumorales 4T1 separadas de acuerdo a su punto isoelectrico y peso molecular, por electroforesis de dos dimensiones (2D). En el gel fueron detectadas 310 proteínas del extracto completo del cultivo celular, las cuales están dentro del rango de punto Isoelectrico de 3 a 10, y en el rango de Peso Molecular de 130 a 11 kDa. La separación de las proteínas fue buena y reproducible al usar extractos de 100 μg de proteína. La Figura 10B muestra la



transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, las cuales fueron teñidas con CPTS.

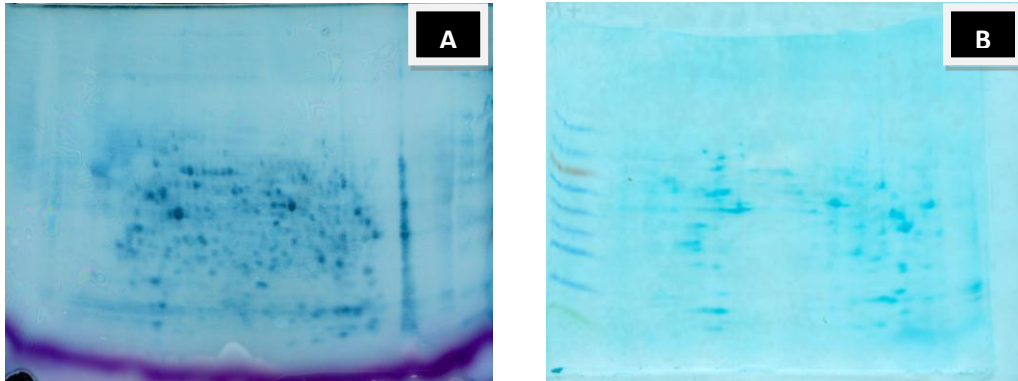


Figura 10. Proteínas de células 4T1 se paradas por punto isoelectrico y peso molecular. (a) Electroforesis-2D (tinción Zinc-Imidazol), y (b) transferidas a una membrana de nitrocelulosa (tinción CPTS).

VI.2.3. Inmunoblot de 2 Dimensiones (inmunoblot-2D).

Las proteínas de las células tumorales 4T1 se hicieron reaccionar con los Acs de los sueros de cada semana de sangrado (semana 0 a 5 / S0 a S5) de cada ratón hembra o macho, obteniendo un duplicado por inmunoblot-2D.

La **Figura 11B** muestra cada imagen promedio resultante de los duplicados de los inmunoblot-2D, es decir, se muestra cada una de las imágenes Master obtenidas del análisis de dos repeticiones de cada inmunoblot-2D. Las proteínas de las células 4T1 se confrontaron con IgG o IgM de los sueros de ratones hembra.

En la **Figura 11A** se muestran los inmunoblots-2D del ratón hembra 2, estas imágenes se agrandaron para poder hacer notar las diferencias que se observan a simple vista (diversidad) entre cada uno de los inmunoblots-2D de cada ratón hembra presentados en la **Figura 11B**. Las diferencias en la diversidad de las imágenes son más notorias entre los inmunoblots-2D_IgG con respecto a los de IgM. Existe mayor cantidad de "Proteínas inmunoreactivas" (Spots o reacciones AgAc) en las imágenes de los Inmunoblots-2D_IgM que en los de IgG. La respuesta mediada por IgG contra Ags de las células tumorales 4T1 decae con el desarrollo de la enfermedad. En los inmunoblots-2D_IgG de la hembra 1 y 3 sólo hay respuesta en los sueros de las semana 1 (S1), semana 2 (S2) y semana



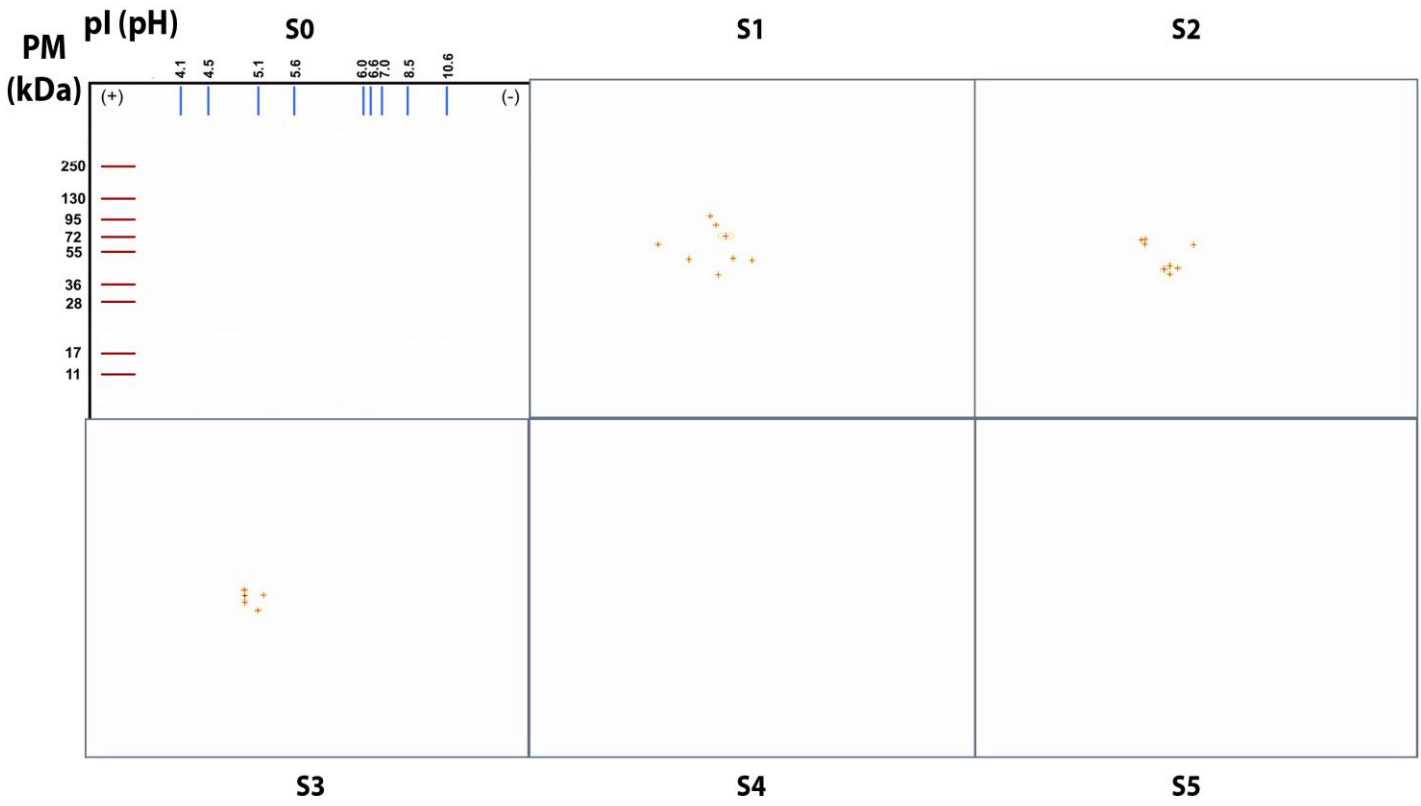
5 (S5), y semana 2 (S2) y semana 3 (S3), respectivamente, por lo que se infiere que a través del desarrollo del CaMa murino, hay inmunosupresión de IgG.

Contraria a respuesta mediada por IgG, la respuesta mediada por IgM contra Ags de las células tumorales 4T1 se presenta desde antes del implante de los ratones (S0/suero pre-inmune). La presencia de IgM se atribuye a la respuesta primaria del sistema inmune, lo que se conoce como IgM natural.

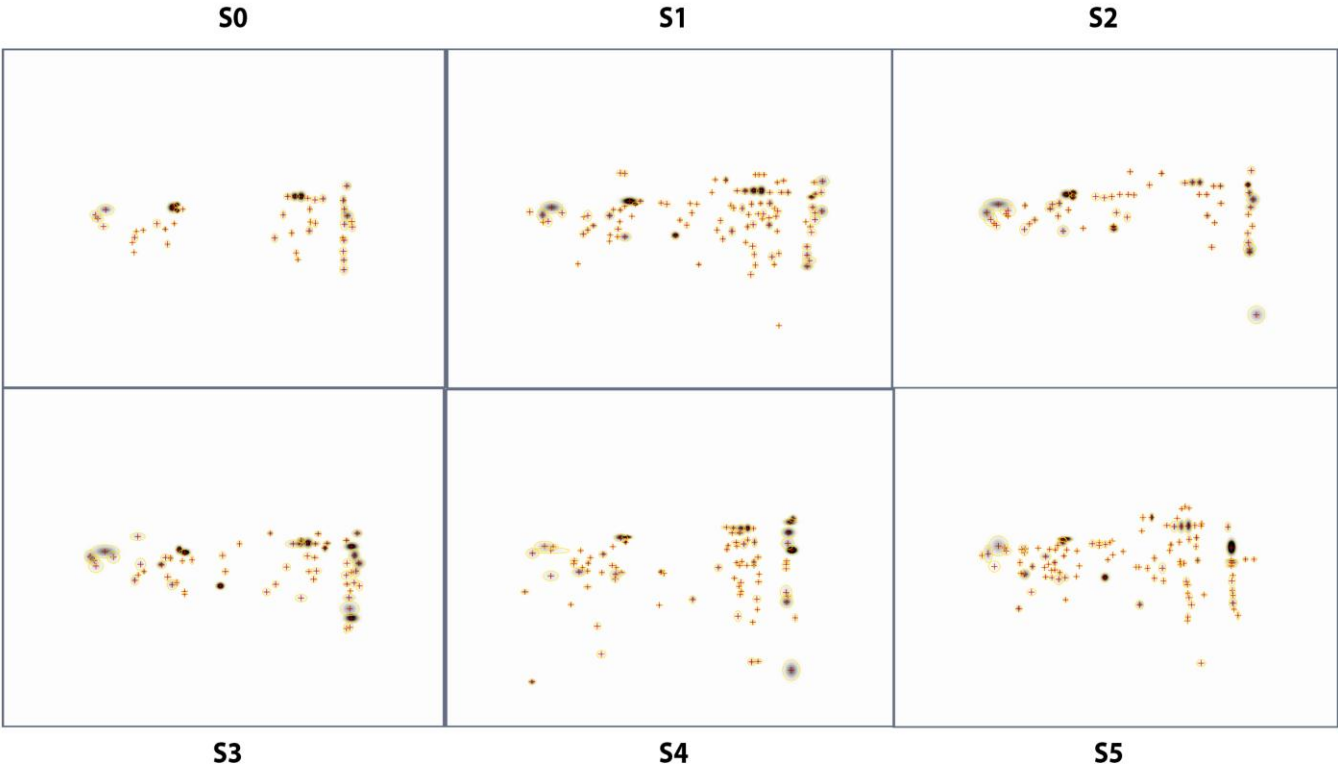


Ratón Hembra 2_IgG

A



Ratón Hembra 2_IgM



Ratones hembra

B

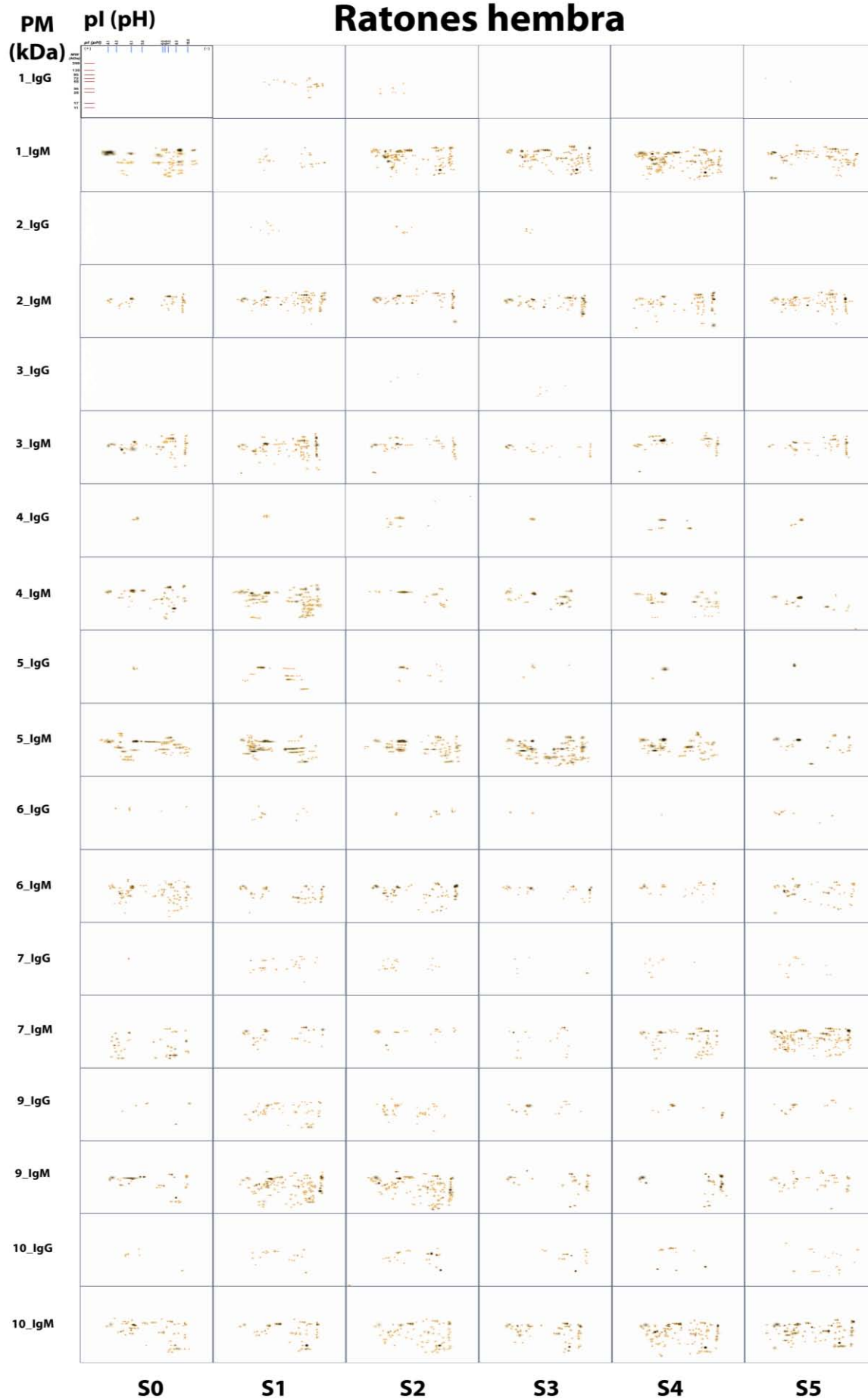


Figura 11. Imágenes de los inmunoblots-2D de la respuesta inmune mediada por IgG e IgM de los ratones hembra. Análisis hechos con el programa PdQuest. A) Imagen de los inmunoblots-2D del ratón hembra 2 de la respuesta mediada por IgG e IgM. B) Total de las imágenes de los inmunoblots-2D de cada ratón hembra. Las cruces de color rojo indican el centro de cada spot y la circunferencia amarilla corresponde a su área.

La **Figura 12A** muestra cada imagen promedio de los inmunoblots-2D, es decir, se muestra cada una de las imágenes Master obtenidas del análisis de dos repeticiones de cada inmunoblot-2D, ya sea que las proteínas de las células 4T1 se hayan confrontado con IgG o IgM de los sueros de ratones macho.

Al igual que en los ratones hembra, la diversidad entre cada uno de las imágenes de los inmunoblots-2D de cada ratón macho, y la respuesta entre IgG e IgM, son diferentes. Estas diferencias pueden observarse en la **Figura 12B** que muestran en los inmunoblots-2D del ratón macho 5, donde las imágenes se agrandaron para poder hacer notar las diferencias que se observan a simple vista (diversidad) entre cada uno de los inmunoblots-2D de cada ratón macho presentados en la **Figura 12B**. También existe mayor cantidad de spots en las imágenes de inmunoblots-2D_IgM que en los de IgG, observando una respuesta de IgM mayor desde la S0 y a lo largo del desarrollo del CaMa murino.

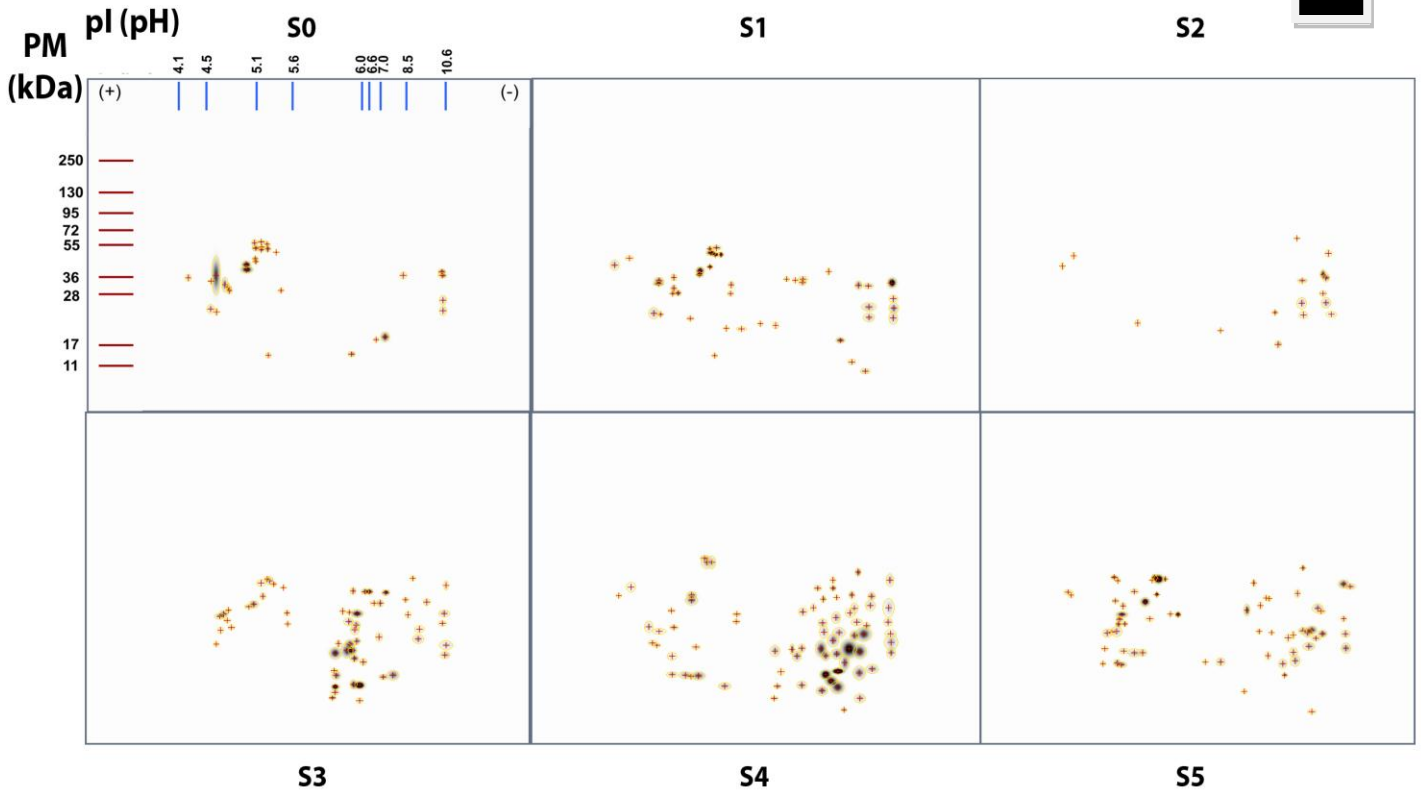
En las imágenes de inmunoblot-2D_IgM e IgG de los ratones macho, se pudo observar el reconocimiento de Ags tumorales 4T1 en los sueros pre-inmunes, al igual que en hembras. En los sueros de las semanas consecutivas (1 a 5), el reconocimiento de ambas inmunoglobulinas (IgG e IgM) fue aumentando con el paso del tiempo.

Con respecto al comportamiento de las respuestas mediadas por IgG e IgM en hembras, las respuestas de los machos son mayores (**Figura 12**). La cantidad de spots en los inmunoblots-2D es mayor que los observados en las imágenes de los ratones hembra (**Figura 11**).

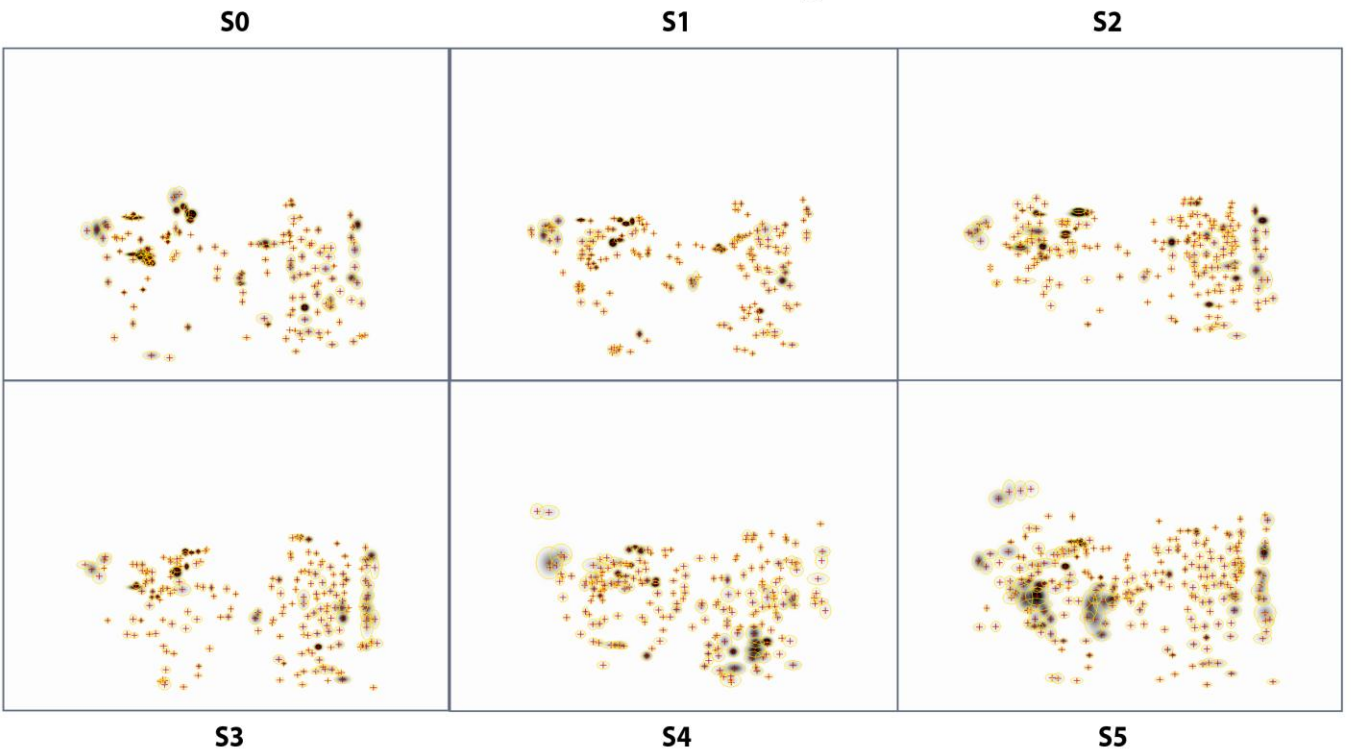


Ratón Macho 5_IgG

A



Ratón Macho 5_IgM



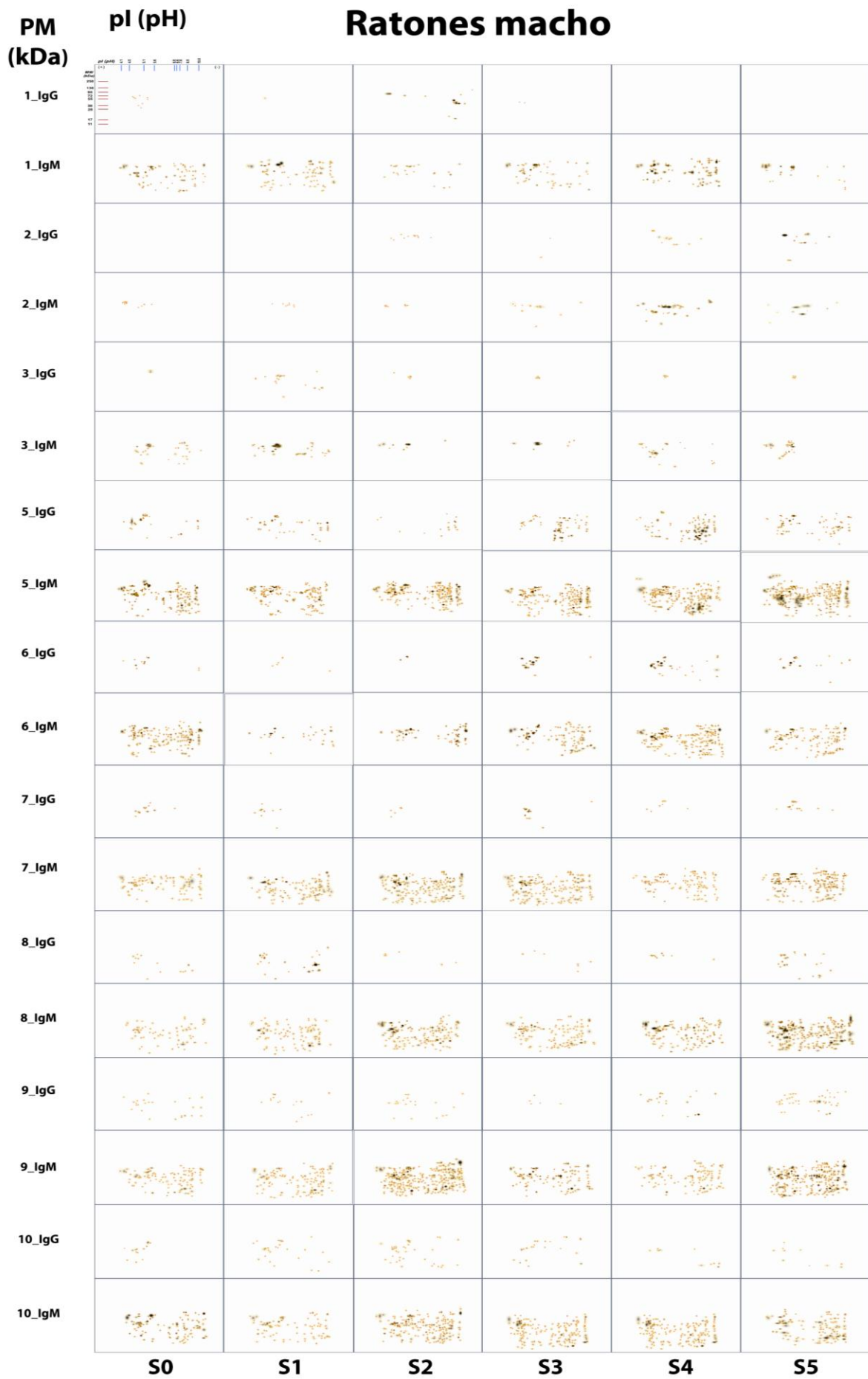


Figura 12. Imágenes de los inmunoblots-2D de la respuesta inmune mediada por IgG e IgM de los ratones macho. Imágenes analizadas con el programa PdQuest. A) Imagen de los inmunoblots-2D del ratón macho 5 de la respuesta mediada por IgG e IgM. B) Total de las imágenes de los inmunoblots-2D de cada ratón macho. Las cruces de color rojo indican el centro de cada spot y la circunferencia amarilla corresponde a su área.

VI.2.3.1. Coordenadas y número de Spots en los inmunoblot-2D.

Se calcularon las coordenadas de cada spot dentro de cada imagen de inmunoblot-2D de acuerdo a su peso molecular y punto isoeléctrico. Para ello, un marcador de Punto Isoeléctrico (Bio-rad), cuyos valores de pH y peso molecular son conocidos, se separó en una electroforesis-2D. Las proteínas se tiñeron con azul de coomassie (**Figura 13a**), y la imagen se procesó en el programa PdQuest bajo los mismos parámetros de análisis de todos los inmunoblots-2D y se utilizó como referencia (**Figura 13b**).

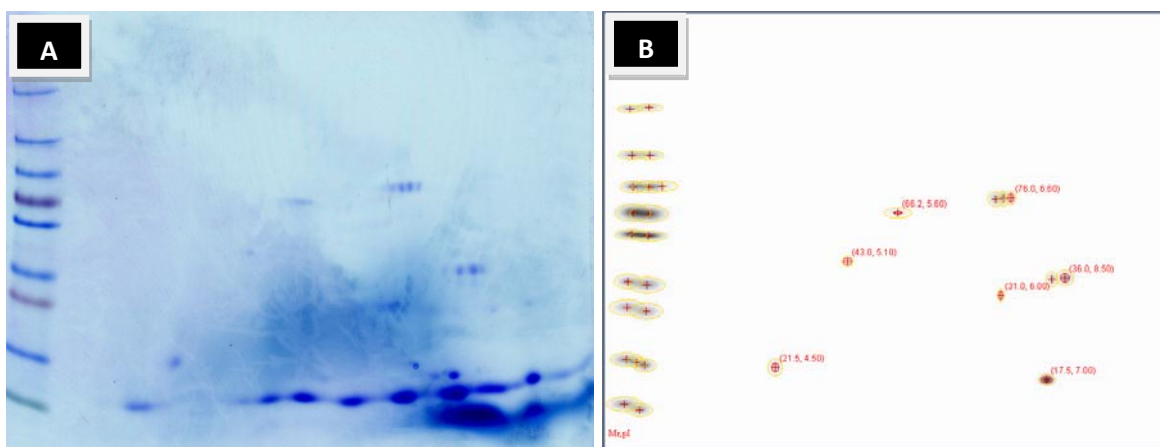


Figura 13. Imágenes de referencia para calcular las coordenadas de los spots dentro de cada inmunoblot-2D. a) marcador de Punto isoeléctrico separado por Electroforesis-2D. b) Imagen del marcador de Punto Isoeléctrico analizada con el Programa PdQuest.

El tener la coordenada de cada spot dentro de la imagen, permitió conocer cuales spots estaban presentes en los inmunoblots-2D de los sueros de la S0 (pre-inmune), y cuáles se repetían en las imágenes de inmunoblots-2D de los sueros de las semanas subsecuentes (1 a 5). Lo anterior permitió restar los spots



presentes en la imagen del suero pre-inmune a las imágenes de las S1 a la S5, dejando sólo el número neto de spots de cada imagen correspondientes a los sueros restantes (**Tabla 2 y Tabla 3**). Los spots del suero de la S0 fueron considerados parte de la respuesta primaria del sistema inmune atribuida a IgM natural, y a los spots pertenecientes a las S1 a S5, como respuesta inmune secundaria o adaptativa.

En la **Tabla 2 y Tabla 3** se presentan las cantidades de spots (reacciones Ag-Ac) de cada una de las imágenes de inmunoblots-2D de las semanas de obtención del suero de cada ratón hembra y macho, respectivamente, a cuyas cantidades ya se les restaron los spots de la S0.

En los ratones hembra, el número promedio de Ags reconocidos por IgM de los sueros de la primera semana (número de spots), fue muy similar al promedio de los reconocidos en la S0 (518 y 563, respectivamente); sin embargo, el patrón de reconocimiento fue diferente (**Tabla 2**). En el análisis de la respuesta mediada por IgM o IgG con respecto al tiempo de desarrollo del tumor en ratones hembra, la Σ de spots de IgM en la S0 varió de 35 a 98 Ags reconocidos, con un promedio de 62.6 y una desviación estándar (SD) de 23.6. Durante las 5 semanas, el reconocimiento de Ags por IgM varió en promedio de 57.6 spots en la S1 a 55.8 spots en la S5, con la respuesta más baja (41 spots) en la S3.

El reconocimiento de Ags 4T1 por medio de IgM se presentó desde la S0 (suero pre-inmune), mientras el reconocimiento de Ags por IgG en la S0 estuvo ausente (ejemplo, ratones hembra 1 y 2) o casi ausente (ratones 4 a 10).

Después del implante de las células tumorales 4T1 en hembras, el mayor reconocimiento de Ags por IgG se presentó, en promedio, en la S1 (20.3 spots), no obstante, este disminuyó con el tiempo hasta casi desaparecer en la S5, mientras el reconocimiento de Ags por IgM se mantiene durante las 5 semanas de crecimiento del tumor mamario.



Tabla 2. Número de spots, suma, promedio, desviación estándar y número total de spots en imágenes de inmunoblot-2D de ratones hembras, de las respuestas de IgM e IgG a través del desarrollo de cáncer de mama con células tumorales 4T1. (T=tiempo; S=semana).

Ratones Hembras								
Spots IgM								
Nº Ratón	S0	S1	S2	S3	S4	S5	∑ Spots IgM T = S1–S5	∑ Spots IgM S0–S5
1	86	20	129	83	146	75	453	539
2	39	77	49	49	60	89	324	363
3	65	66	41	18	24	31	180	245
4	45	94	22	24	36	15	191	236
5	98	69	63	91	61	13	297	395
6	89	21	23	23	14	23	104	193
7	45	28	19	14	70	144	275	320
9	35	120	109	17	15	43	304	339
10	61	23	47	46	78	69	263	324
∑ Spots por suero	563	518	502	365	504	502	2391	2954
Promedio	62.6	57.6	55.8	40.6	56.0	55.8	265.7	328.2
SD	23.6	36.4	39.0	29.2	41.4	43.0	100.1	102.5
Spots IgG								
Nº Ratón	S0	S1	S2	S3	S4	S5	∑ Spots IgG T = S1–S5	∑ Spots IgG S0–S5
1	0	27	9	0	0	2	38	38
2	0	8	8	5	0	0	21	21
3	0	0	3	5	0	0	8	8
4	4	3	8	2	11	5	29	33
5	4	34	13	2	1	1	51	55
6	7	10	14	5	1	10	40	47
7	2	30	21	5	11	12	79	81
9	6	51	46	15	11	15	138	144
10	7	20	25	17	14	21	97	104
∑ Spots por suero	30	183	147	56	49	66	501	531
Promedio	3.33	20.33	16.33	6.22	5.44	7.33	55.67	59.00
SD	2.96	16.73	13.06	5.85	6.06	7.55	41.53	43.38

Para conocer las diferencias en el reconocimiento de Ags de las células 4T1 por IgG o IgM de los sueros de los ratones macho, también se hizo el conteo de spots de cada imagen de inmunoblot-2D (**Tabla 3**).



En ratones macho hubo un mayor reconocimiento de Ags por IgM (Total Σ Spots IgM S0-S5= 4147) que por IgG (Total Σ Spots IgG S0-S5= 678) ($P=0.003$). El número promedio de Ags que fueron reconocidos por IgM en la S1 fue menor que en la S0 (58.6 ± 39.8 y 86.1 ± 46.6 , respectivamente, $P=0.096$, $N= 9$, media \pm SD). En contraste, el número promedio de Ags que fueron reconocidos por IgG en la S1 y en la S0 fueron similares (9.89 ± 7.75 y 13.11 ± 9.64 , respectivamente, $P=0.314$, $N = 9$), pero el patrón de distribución y el reconocimiento de Ags 4T1 fue diferente.



Tabla 3. Número de spots, suma, promedio, desviación estándar y número total de spots en imágenes de inmunoblot-2D de ratones machos, de las respuestas de IgM e IgG a través del desarrollo de cáncer de mama con células tumorales 4T1. (T=tiempo; S=semana).

Ratones macho								
Spots IgM								
N° Ratón	S0	S1	S2	S3	S4	S5	∑ Spots IgM T=S1-S5	∑ Spots IgM S0-S5
1	66	55	21	17	68	19	180	246
2	14	4	10	12	35	12	73	87
3	33	28	5	7	24	26	90	123
4	147	122	131	124	156	174	707	854
5	150	7	15	49	88	55	214	364
6	98	77	142	121	69	129	538	636
7	63	58	104	93	91	171	517	580
9	102	87	222	67	72	184	632	734
10	102	89	44	114	110	64	421	523
∑ Spots por suero	775	527	694	604	713	834	3372	4147
Promedio	86.1	58.6	77.1	67.1	79.2	92.7	374.7	460.8
SD	46.6	39.8	76.4	48.1	39.3	71.6	240.2	271.0
Spots IgG								
N° Ratón	S0	S1	S2	S3	S4	S5	∑ Spots IgG T=S1-S5	∑ Spots IgG S0- S5
1	9	0	13	2	0	0	16	24
2	0	0	12	3	15	12	42	42
3	2	17	6	4	3	6	39	38
4	30	21	11	42	64	50	253	218
5	12	4	2	12	24	15	71	69
6	12	7	5	9	6	10	50	49
7	14	14	3	5	6	14	70	56
9	25	9	12	1	13	36	108	96
10	14	17	27	12	8	8	99	86
∑ Spots por suero	118	89	91	90	139	151	748	678
Promedio	13.11	9.89	10.11	10.0	15.4	16.78	83.11	75.33
SD	9.64	7.75	7.59	12.69	19.57	15.92	70.08	58.25

Se compararon las cantidades de spots totales de las imágenes de los inmunoblots-2D_IgG e IgM tanto de ratones hembras o machos, a estas cantidades no se les restaron los spots de la S0, para conocer si habían diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de Ags reconocidos por IgG e IgM. La respuesta mediada por IgM (413.7 ± 115.3 para hembras y



618.1±378.5 para machos) fue mayor que la respuesta mediada por IgG (64.56±46.74 para hembras y 96.22±50.49 para machos) en ratones de ambos sexos, habiendo una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$, $N=9$) (**Figura 14**). Por otro lado, ambas respuestas (IgG e IgM) fueron similares entre ambos sexos.

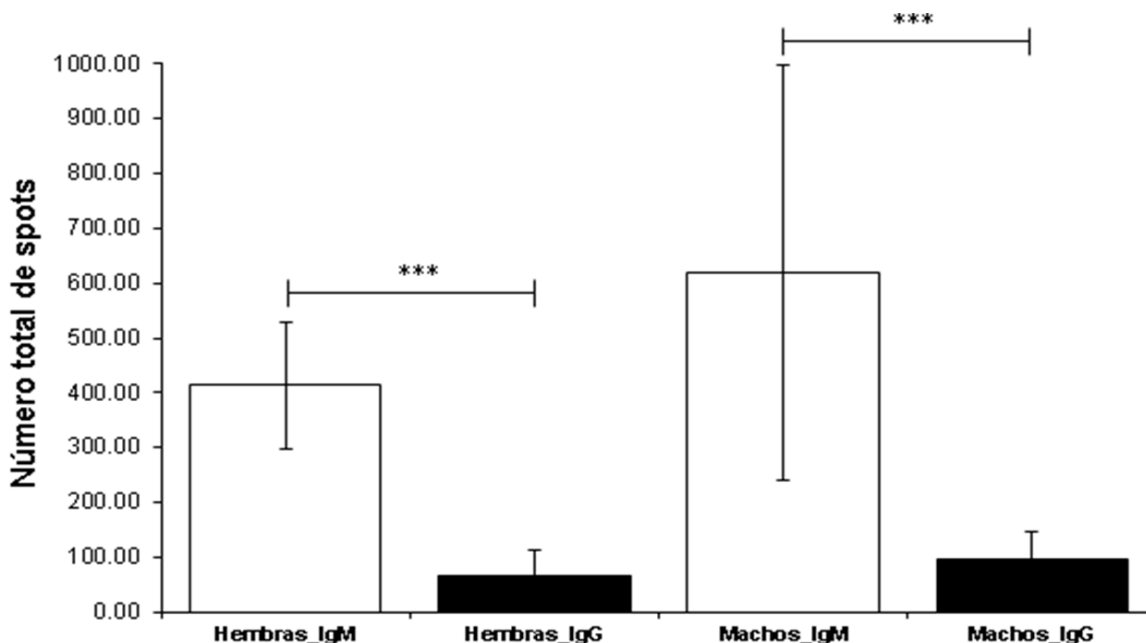


Figura 14. Número total de spots en ratones hembra y macho en el reconocimiento de antígenos de las células 4T1 por IgG e IgM.

En la **Figura 15** se muestra el reconocimiento de Ags tumorales, donde se graficó el número promedio de spots de IgM e IgG de la S1 a la S5. En la **Figura 15a** se muestra que el número de Ags que fueron reconocidos por IgM adaptativa en ratones macho incrementó a través del desarrollo del tumor ($r_{Sp} = 0.90$, $p=0.037$). Por el contrario, el reconocimiento de Ags por IgM en ratones hembra permaneció constante. La respuesta de IgM adaptativa no fue inmunosuprimida en ratones hembra ni en ratones macho.

Con respecto al reconocimiento de Ags por IgG en ratones hembra, el número de spots disminuyó con el tiempo ($r_{Sp} = -0.70$, $p=0.049$), lo que refleja la inmunosupresión de IgG durante todo el desarrollo del tumor. Sin embargo, en ratones machos, el reconocimiento de Ags por IgG aumentó significativamente durante el crecimiento del tumor ($r_{Sp} = 0.89$, $p=0.041$) (**Figura 15b**).



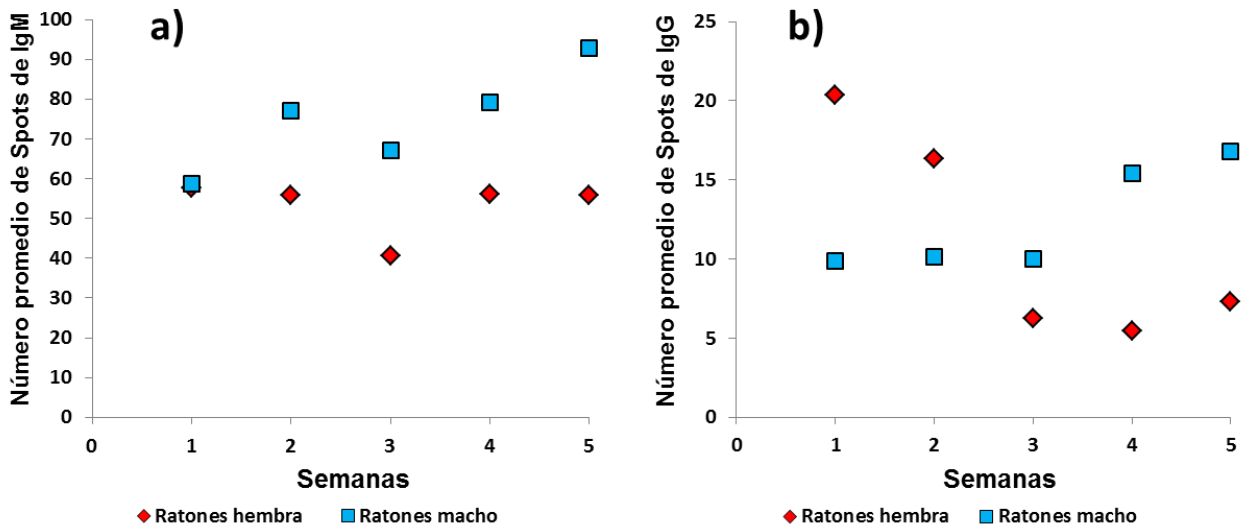


Figura 15. Número promedio de spots en las diferentes semanas de crecimiento tumoral (semanas 1-5) en ratones hembra y macho para IgM (a) e IgG (b).

La **Figura 16** muestra los diagramas de dispersión de volumen del tumor (mm^3) en cada ratón hembra y macho contra el número de spots en las imágenes de inmunoblot-2D de las respuestas IgM durante el desarrollo del tumor. Las respuestas de IgG de ninguna semana de desarrollo del cáncer se correlacionó con el tamaño del tumor, por ello las gráficas no se mostraron. Sólo se muestran los diagramas de dispersión del volumen de tumor contra el reconocimiento de Ags (número de spots) por IgM de las semanas que tuvieron correlaciones estadísticamente significativas (hembras: S1 y S5; machos: S1 y S4).

En ratones hembra, el volumen tumoral y el número de Ags reconocidos por IgM (spots) tuvieron una correlación negativa ($r^2=0.39$, $p=0.074$, $N=9$) en la S1 después del implante de las células tumorales (**Figura 16a**). Es decir, en esta semana entre mayor fue el número de spots reconocidos por IgM, menor fue el tamaño del tumor. Sin embargo, en la S5 este comportamiento se invirtió ($r^2=0.76$, $p=0.002$, $N=9$) (**Figura 16b**), entre mayor era el reconocimiento de Ags por IgM (spots) mayor era el tamaño del tumor.

En ratones macho, se observó una tendencia positiva en la S1 ($r^2= 0.43$, $p=0.057$, $N=9$ **Figura 16c**) y en la S4 ($r^2= 0.55$, $p=0.023$, $N=9$ **Figura 16d**).

Tanto en ratones hembra como machos, en las etapas iniciales de la aparición del cáncer de mama, IgM adaptativa podría ayudar a controlar el tamaño



del tumor, pero en las últimas etapas, el tumor era mayor en los ratones que tenían más spots.

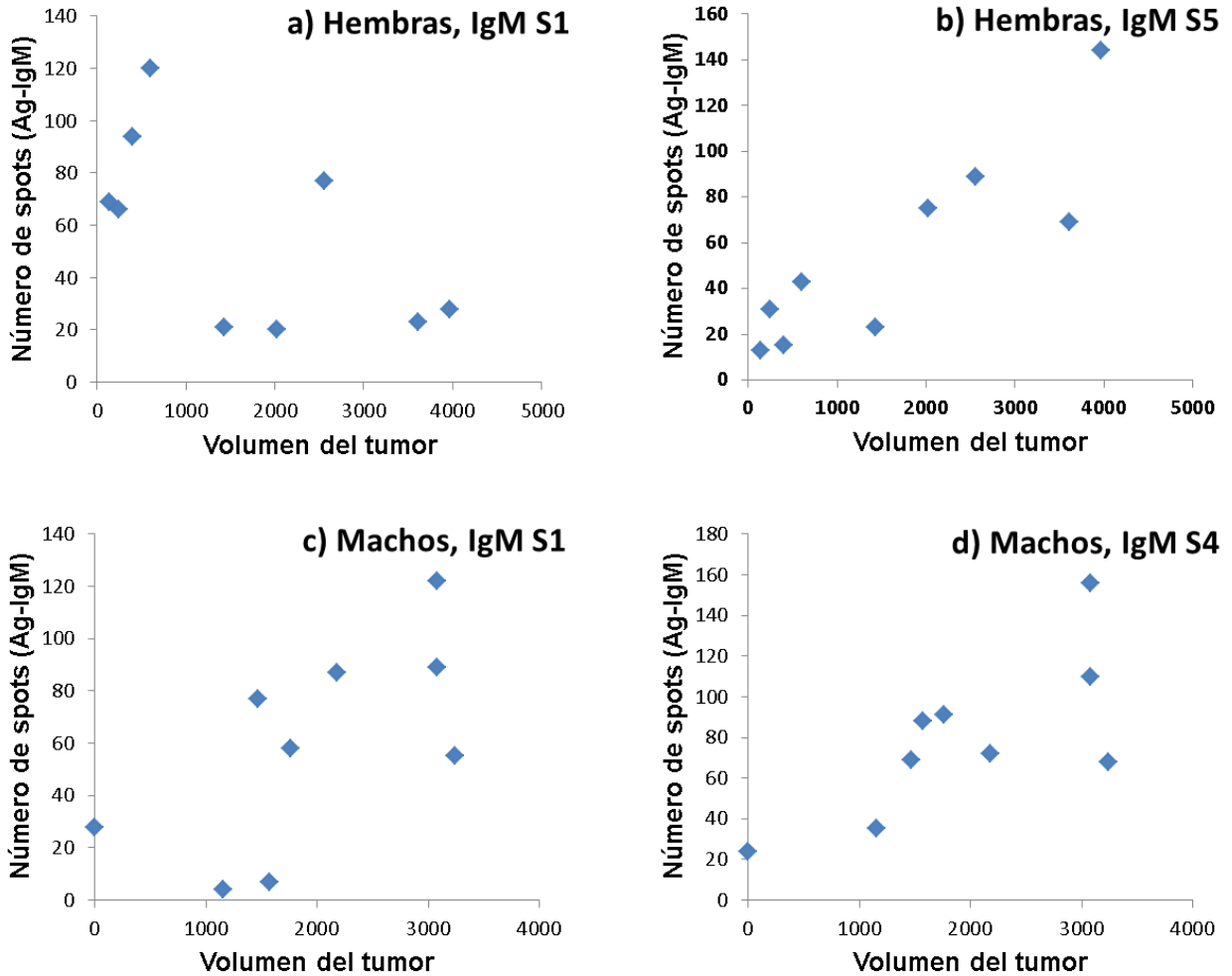


Figura 16. Tamaño del tumor y su relación con el número de spots en cada ratón hembra en la semana 1 (a) y en la semana 5 (b), y en ratones macho en las semanas 1 (c) y 4 (d).



VI.2.3.1. Frecuencia de Spots en los inmunoblot-2D de ratones hembra.

En la **Figura 17** se presenta la frecuencia de spots de los antígenos reconocidos amplia, mediana y raramente por todos los sueros de la S0 y S1 del total de ratones hembra.

La suma total de los spots de antígenos reconocidos por IgM naturales en la S0 fue de 563, y la frecuencia de spots fue de 8 antígenos compartidos por todos los ratones hembras en la S0. En la S1, la suma de todos los spots en ratones hembra fue de 518, y la frecuencia de spots compartidos fue de 10 antígenos. Sin embargo, al comparar la frecuencia de spots de los 1081 antígenos reconocidos por IgM en la S0 y S1, sólo 10 antígenos fueron compartidos entre ambas semanas.

Con respecto a la cantidad de Ags reconocidos por IgM, la cantidad de Ags reconocidos de IgG decreció en la S1, pero la frecuencia de antígenos reconocidos fue similar entre las respuestas de IgG e IgM, siendo 3 antígenos compartidos de 183 y 10 antígenos compartidos de 518 entre individuos, respectivamente. La frecuencia de reconocimiento de IgM e IgG contra los mismos antígenos muestra que hay muy pocos antígenos detectados por IgM o IgG que se compartan entre los ratones hembra en la S0 y S1, o entre IgG y IgM. El que IgM e IgG compartan el reconocimiento temprano de 8 antígenos en S1 convierte a estos antígenos en proteínas notables, los cuales podrían, en trabajos futuros, secuenciarse e identificar para saber que proteínas son, y asentar las bases para desarrollar una herramienta de diagnóstico temprano.



Frecuencia de Spots

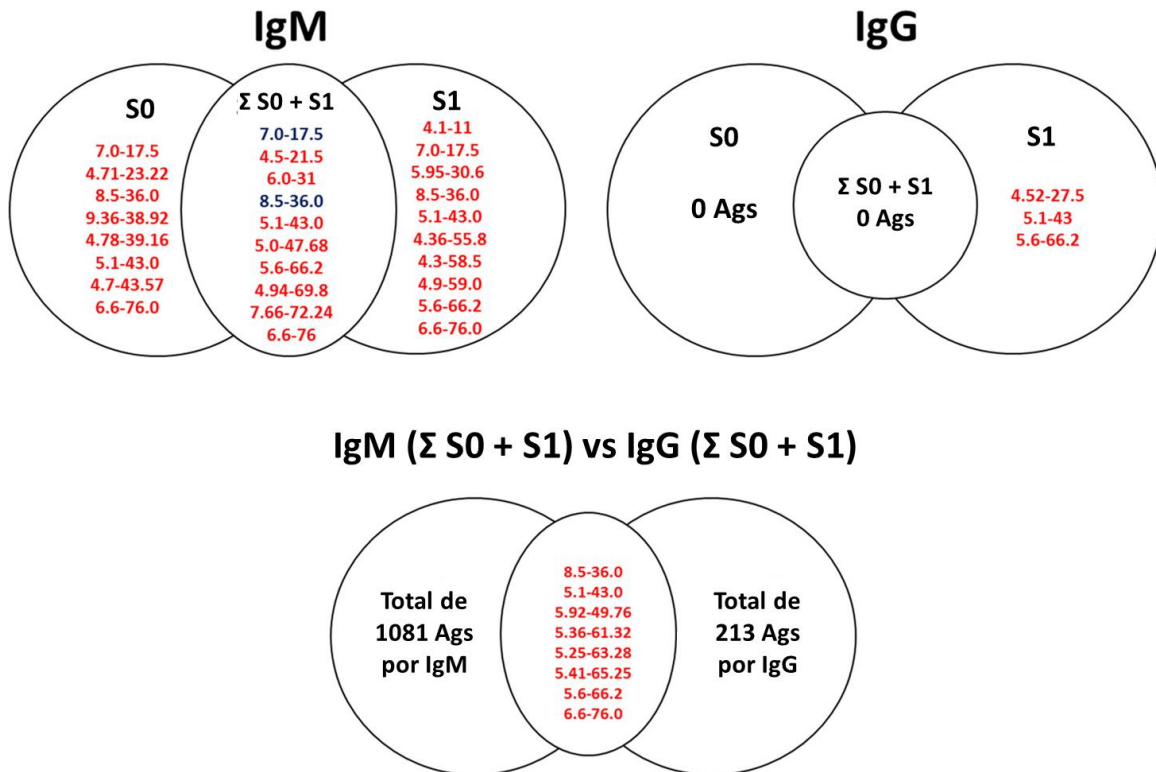


Figura 17. Frecuencia de spots de las imágenes de inmunoblot-2D de ratones hembra en la semana 0 y semana 1 de la respuesta mediada por IgG y IgM. La figura muestra el Punto isoeléctrico y Peso molecular de los spots que se comparten no sólo entre las imágenes de cada tiempo (S0 y S1), sino también entre todos los ratones hembras. Los spots de color rojo son reconocidos "Medianamente" y los spots de color azul intenso son reconocidos "ampliamente" por los ratones. Los spots son reconocidos por 0-1 ratones fueron categorizados como "raros", de 2 a 5 ratones como "Medio" y por 6 a 10 ratones como "Ampliamente". Ags = antígenos.

VI.3. Patrones de reconocimiento y distribución de los spots (reconocimiento de antígenos por IgG e IgM).

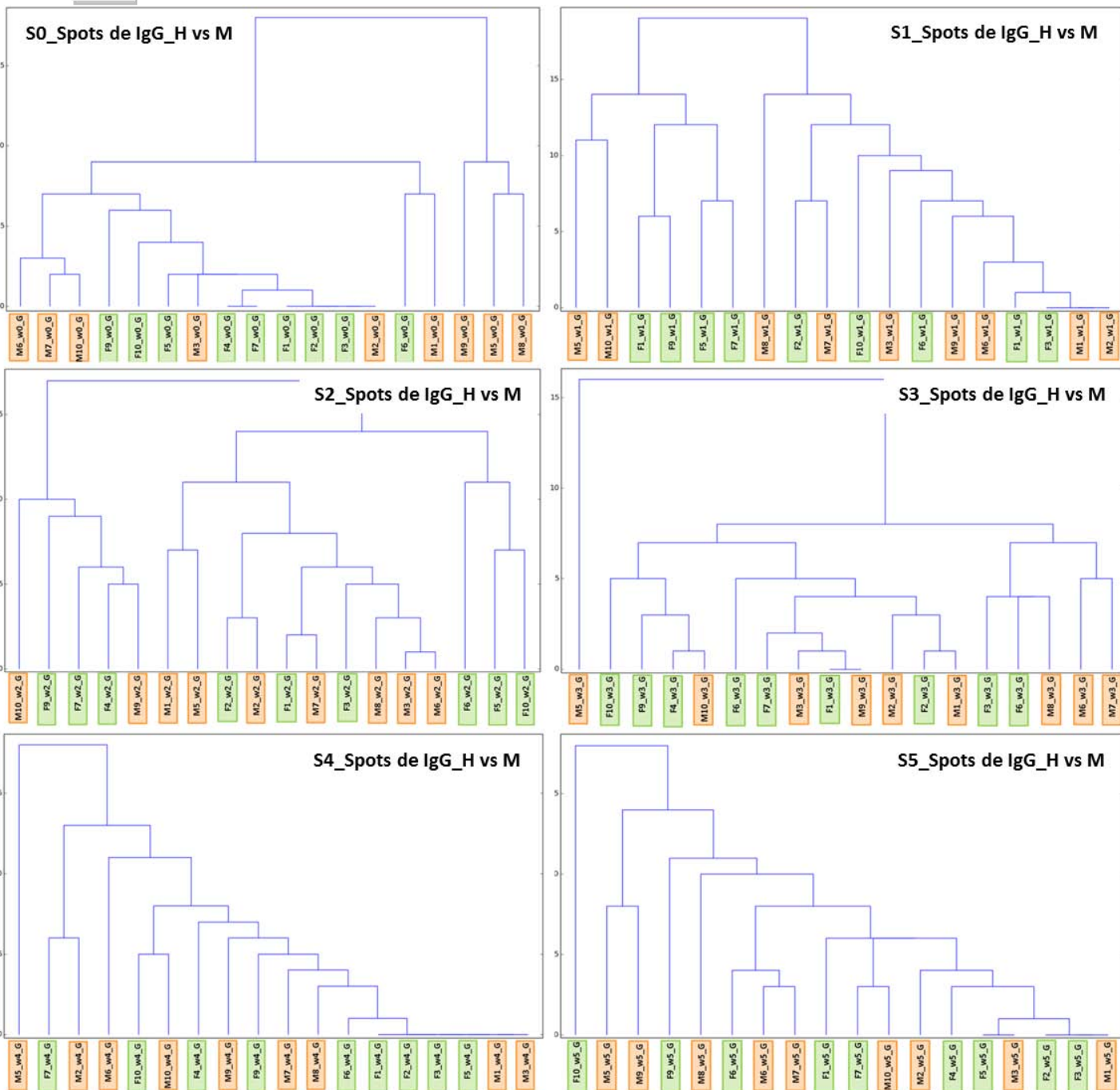
VI.3.1. Firmas inmunológicas.

Para obtener el patrón de spots en las imágenes de inmunoblots-2D cada uno de los inmunoblots-2D se dividió en una cuadrícula de 100 casillas (10x10) (**Figura 18**), y se generó una base de datos de 0s y 1s, la cual se tradujo en una firma multibinomial de 0s y 1s (**Figura 19**), que representa una firma de la respuesta inmune humoral de IgG o IgM. Cada ratón hembra y macho tiene un patrón individual de reconocimiento de los Ags tumorales 4T1.



separan los ratones por sexo se observó en el suero pre-inmune, y también en las subsecuentes etapas de desarrollo del tumor (S1-S5).

A



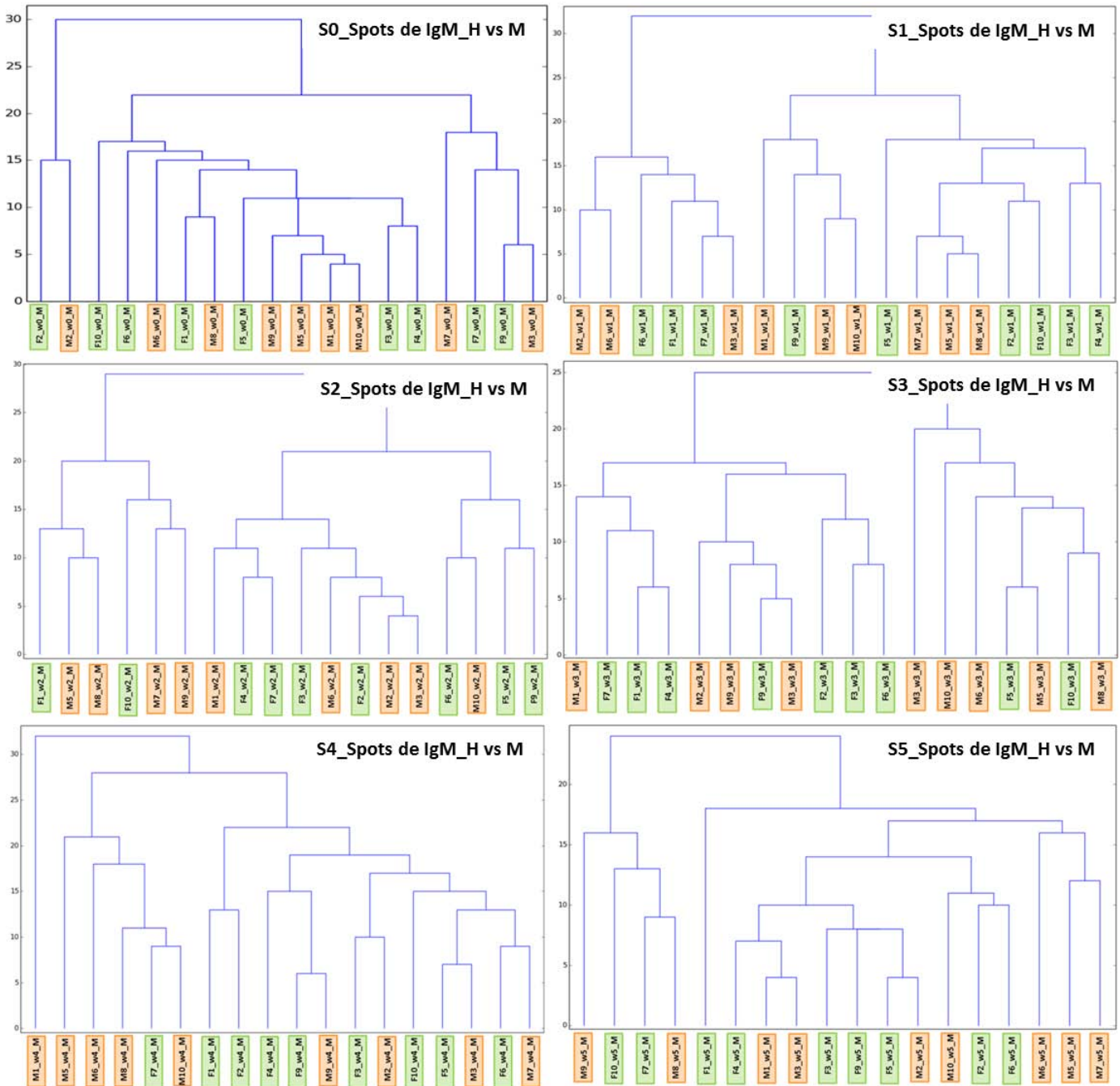
B

Figura 19. Dendrogramas de patrones de reconocimiento de antígenos en las imágenes por sexo, de la suma de las firmas inmunológicas de 0s y 1s de las semanas 1 a 5, donde se muestran la respuesta humoral de IgG (A) e IgM (B) entre ratones hembra (F= cajas verdes) y ratones macho (M= cajas naranjas). w: Semana, G: IgG, M: IgM.

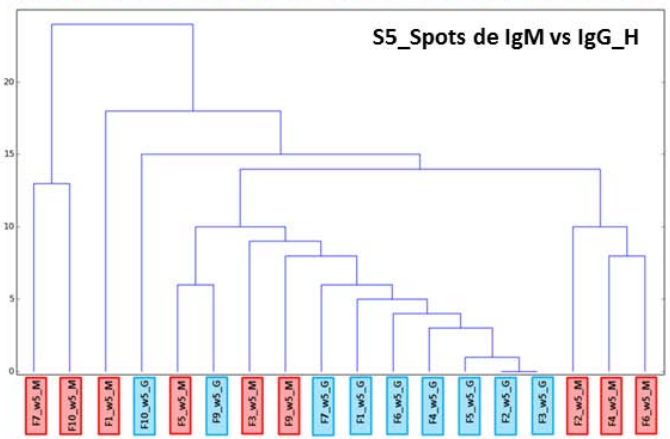
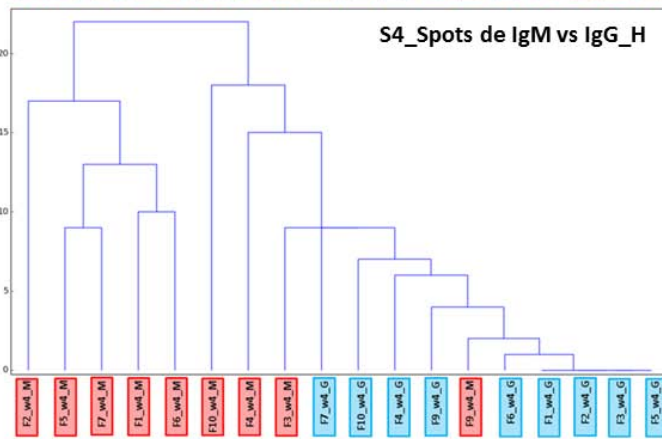
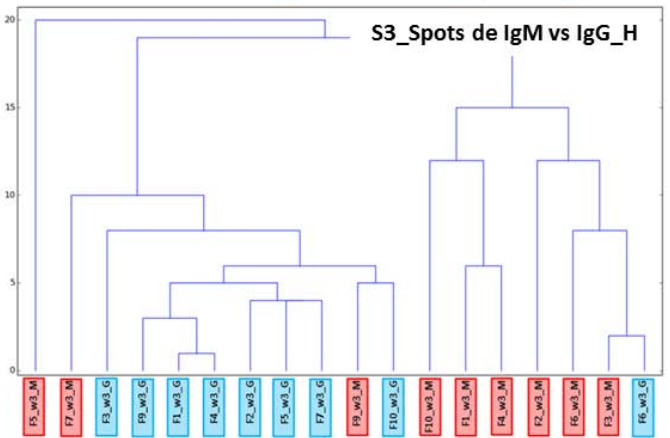
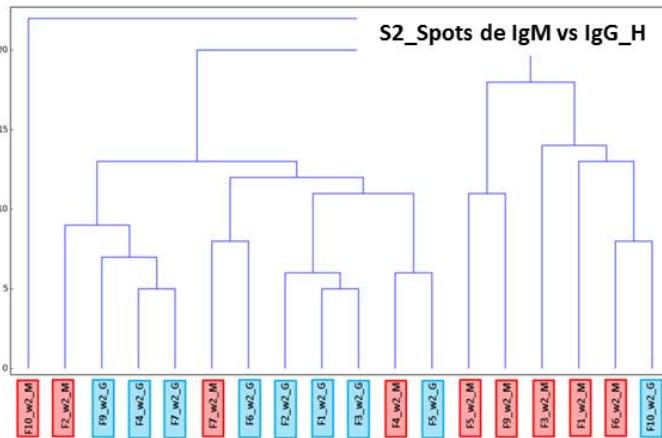
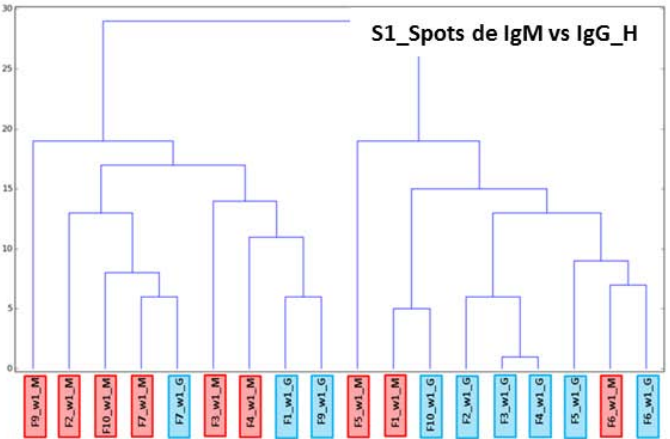
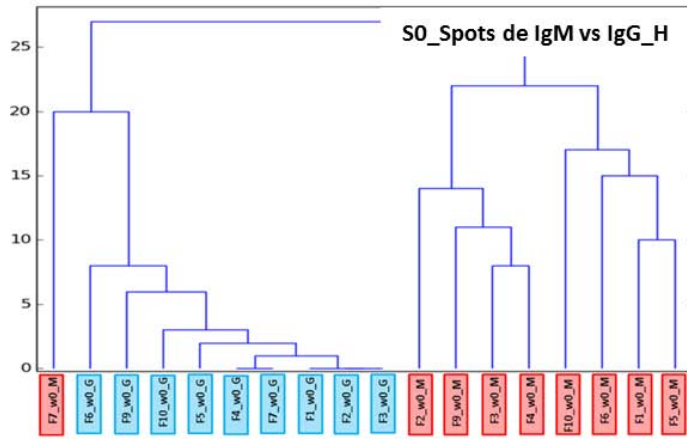
Los dendogramas de la **Figura 20** muestran las agrupaciones según el tipo de inmunoglobulina. Las firmas inmunológicas permitieron agrupar a los ratones de acuerdo al patrón de reconocimiento de Ags por IgG o IgM.

En el dendograma de las firmas inmunológicas de la S0 de ratones hembra, los individuos se separaron prácticamente en dos grupos, ya sea en IgG o IgM, a excepción de la firma inmunológica de IgM del ratón hembra 7. A partir de la S1 y hasta la S5, la separación es menos notable que en la S0, pero todavía se pueden observar las diferencias. En ratones macho, la separación de los individuos se observó en la S0 y en la S1 de una manera notable, a partir de la S2 hasta la S5 la separación disminuye pero todavía es percibida.

Lo anterior indica que el patrón de reconocimiento de Ags en las imágenes de inmunoblots-2D es similar entre ratones machos y hembras, pero dicho patrón de reconocimiento sí es diferente de acuerdo al tipo de inmunoglobulina que reconoce a los Ags 4T1. En el caso de IgM, el patrón de reconocimiento se traduce en la calidad con que los Ags tumorales 4T1 son reconocidos.



A



B

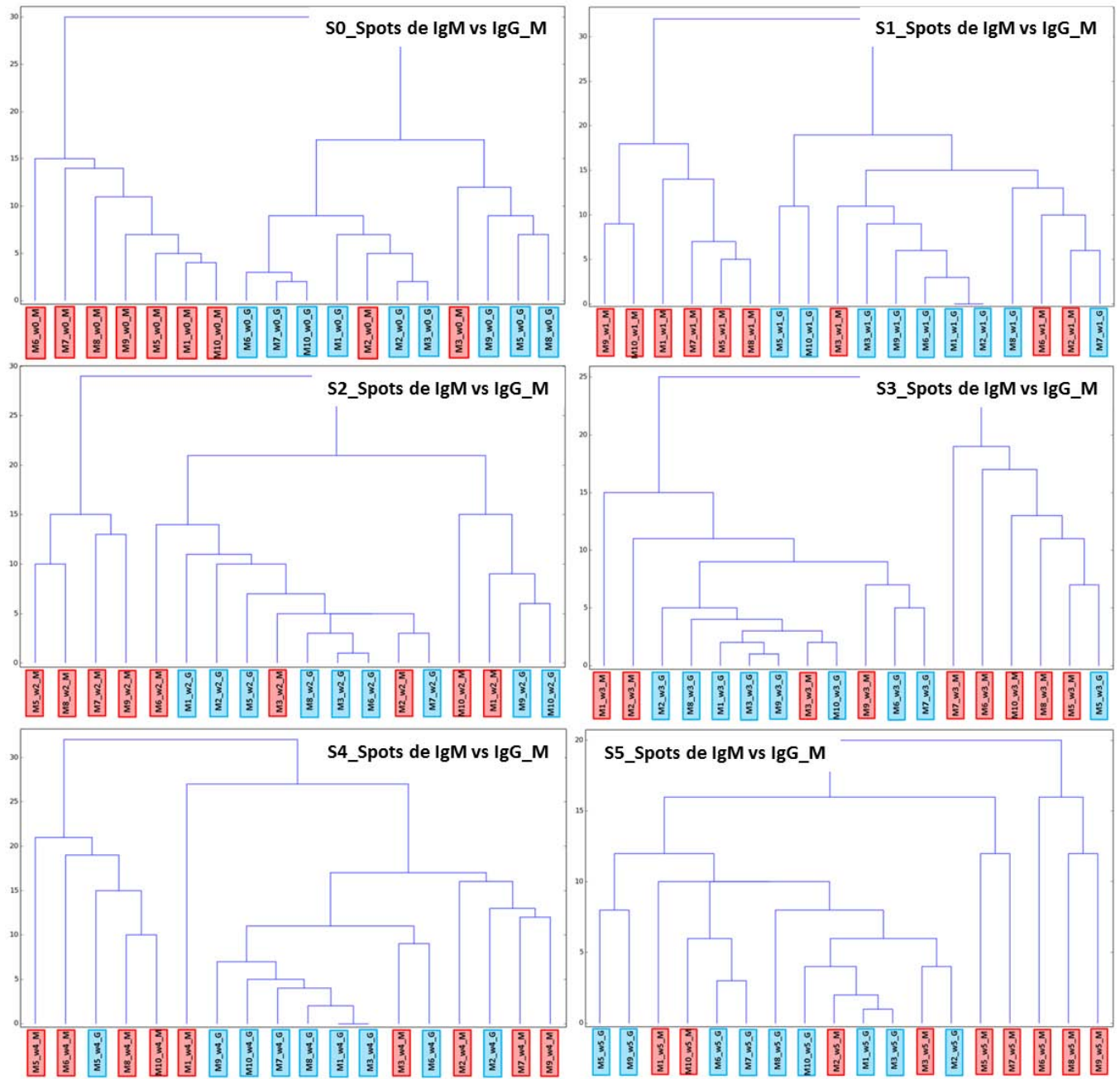


Figura 19. Dendrogramas de patrones de reconocimiento de antígenos de las imágenes de inmunoblots-2D por isotipo de inmunoglobulina, elaborado a partir de las firmas inmunológicas de 0s y 1s de las semanas 0 a la 5, en el que la IgG (G= cajas azules) e IgM (M= cajas rojas) de la respuesta humoral de ratones hembra (A) y macho (B). w: Semana, F: ratones hembra, M: ratones machos.



VII. DISCUSIÓN

La mayoría de las investigaciones sobre el cáncer de mama se han enfocado en el establecimiento de biomarcadores basados en IgG como tratamiento para etapas avanzadas de la enfermedad. Sin embargo, se ha reportado que las mujeres que padecen cáncer de mama presentan inmunosupresión de anticuerpos IgG (Rodríguez and Padilla, 2008; Zhang, 2013; Llanes-Fernández et al., 2006; Roberts et al., 1973; Tagliaferri et al., 2001). Aun así, el sistema inmune humoral tiene la capacidad de detectar células tumorales en etapas tempranas de la transformación celular por medio de anticuerpos como IgM.

IgM tiene la capacidad de eliminar a las células cancerosas en las primeras etapas de la transformación celular, al reconocer cambios mínimos presentes en algunos antígenos asociados a tumor (proteínas o carbohidratos con estructuras aberrantes). Sin embargo, son pocos los estudios sobre IgM natural e IgM adaptiva y su participación en el reconocimiento temprano de antígenos asociados a tumores mamarios, por lo que es importante estudiarlas, para poder considerarlas como una posible herramienta de diagnóstico temprano del cáncer de mama (Díaz-Zaragoza et al., 2014).

El cáncer de mama es el cáncer más común en las mujeres a nivel mundial (Etzioni et al., 2003; Panieri, 2012), por lo que su diagnóstico temprano es muy importante y representa un enfoque prometedor para reducir las cifras de mortalidad, y para obtener un tratamiento curativo. En México, de 256 mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama, el 90% de los casos las mujeres se diagnosticaron por autoexploración, y de ese 90%, sólo el 10% de los casos fueron diagnosticados en etapa I (Knaul et al., 2008). Además, la mayoría de las mujeres con cáncer de mama concentradas en hospitales públicos de tercer nivel en la ciudad de México, son diagnosticadas en estadíos avanzados, de manera tal que se reducen importantemente sus posibilidades de cura y sobrevida (López-Carrillo et al.).



La educación y la auto-exploración son importantes para la detección temprana del cáncer de mama, no obstante, es necesario el desarrollo de herramientas de diagnóstico temprano, las cuales ayuden a reconocer señales de advertencia de aparición de cáncer y que tomen ventaja en el diagnóstico temprano, a través de pruebas sencillas dentro de una población con el fin de identificar a personas enfermas y asintomáticas (WHO, 2015a). Asimismo, a pesar de utilizar la mamografía para la detección del cáncer de mama, es importante aplicar en entornos de bajos recursos herramientas alternativas de bajo costo que la complementen (WHO, 2015a; b).

Los resultados presentados en esta tesis podrían ser la base para el desarrollo de una herramienta de diagnóstico temprano del cáncer de mama, la cual se basa en el patrón de distribución de reacciones antígeno-anticuerpo (spot) en imágenes de inmunoblots-2D, donde se analiza el reconocimiento de antígenos asociados a tumor expresados en las etapas tempranas de la transformación celular, por medio de los anticuerpos IgG e IgM (natural y adaptativa) de ratones hembra y macho con cáncer de mama.

Las imágenes de los inmunoblot-2D mostraron una gran variabilidad de las respuesta inmune humoral mediada por IgG e IgM hacia los antígenos de las células tumorales 4T1 en las diferentes etapas del cáncer de mama, tanto en ratones hembras como macho, es decir, el reconocimiento de antígenos fue diferente entre los ratones aunque estos eran singénicos. Sin embargo, el análisis detallado de la distribución de los spots permitió obtener algunos patrones de reconocimiento definidos, que permitieron diferenciar el reconocimiento de antígenos por IgG o IgM.

El reconocimiento de antígenos tumorales de las células 4T1 por medio de IgG estuvo ausente o casi ausente en ratones de ambos sexos en la S0, lo que se atribuye a la existencia de IgG naturales, las cuales se han reportado forman parte de la batería de anticuerpos del sistema inmune humoral, pero de las que no se conoce mucho (Ronda et al., 1994; Nagele et al., 2013).

El reconocimiento de antígenos por IgM presente desde la S0 en todos los ratones hembra y macho, fue considerada IgM natural, mientras el reconocimiento



de antígenos observado de la semana 1 a la 5 se atribuyó a IgM adaptativa. La IgM natural actúa como parte de la primera línea de defensa del organismo y no sólo es responsable del reconocimiento y la eliminación de partículas infecciosas, sino también del reconocimiento y la eliminación de células precancerosas y cancerosas (Klimovich, 2011; Brändlein et al., 2004, 2003; Manson et al., 2005; Vollmers and Brändlein, 2005b, 2009). Además, las IgM naturales también median el reconocimiento temprano y la eliminación de invasores bacterianos, virales, y material propio alterado (células senescentes, restos celulares), ya que reaccionan con receptores de superficie celular (Baumgarth, 2011; Nagele et al., 2013; Vollmers and Brändlein, 2009).

Las IgM naturales se encuentran en condiciones normales en ratones y en humanos, aún en ausencia de estímulos antigénicos exógenos (Madi et al., 2009; Merbl et al., 2007). IgM natural es secretada principalmente por las células B1a CD5⁺ y constituye la mayor parte de las IgM circulantes (Coutinho et al., 1995), mientras que la IgM adaptativa es inducida por un estímulo antigénico y es producida principalmente por células B convencionales (B2) (Baumgarth et al., 1999).

En la semana 0, la diferencia en la cantidad de spots entre IgG e IgM fue clara; siendo casi cero para IgG y numerosa para IgM. El patrón de reconocimiento de spots de la respuesta de IgM fue muy variable y no hubo inmunoblots-2D iguales. La identificación de antígenos tumorales 4T1 por IgM, incluso antes de la estimulación antigénica (S=0), es consistente con un reconocimiento humoral innato. Durante este tipo de reconocimiento, los carbohidratos son las principales estructuras reconocidas de manera muy similar a como lo hacen los receptores tipo-Toll. No obstante, se ha reportado que IgM natural también reconoce el carboxilo terminal de las proteínas (Sokoloff et al., 2001).

En cuanto al reconocimiento de antígenos de las células tumorales 4T1 por IgG, la mayor cantidad de spots se observó en la S1, sin embargo, este disminuyó con el tiempo hasta casi desaparecer en la S5. La inmunosupresión de IgG se ha reportado en ratones hembra que desarrollan cáncer de mama al ser implantadas



con células tumorales 4T1 (Tagliaferri et al., 2001), asimismo, mujeres con cáncer de mama, también se ha reportado inmunosupresión de IgG (Rodríguez and Padilla, 2008; Zhang, 2013; Llanes-Fernández et al., 2006; Roberts et al., 1973; Tagliaferri et al., 2001).

Las disparidades en el reconocimiento antigénico por IgG o IgM durante el desarrollo de cáncer entre los ratones hembra y macho también podrían deberse a los efectos de las hormonas sexuales y a las diferencias en la forma en que el sistema inmune reconoce a los antígenos 4T1 en ambos sexos. En condiciones saludables, las mujeres tienen mayores niveles de IgG e IgM y las respuestas inmunes mediadas por células son más fuertes que en hombres (Cohn, 1979), además, la producción de anticuerpos se ve mejorada en la inmunidad adaptativa (Eidinger, David and Garrett, 1972; Dresser, 1962). Los ratones hembra no experimentaron inmunosupresión de IgM durante el desarrollo del tumor, probablemente debido a los estrógenos. En mujeres se ha reportado que la producción elevada de inmunoglobulinas es inducida *in vitro* en linfocitos por estradiol, y al aumento de la diferenciación de las células productoras de IgM. Este efecto selectivo sobre la síntesis de IgM es similar *in vitro* e *in vivo*; las mujeres en edad fértil tienen mayores niveles de IgM en suero que mujeres posmenopáusicas y hombres (Paavonen et al., 1981). Durante el desarrollo de estos experimentos, los ratones hembra se encontraban en edad reproductiva de la 8° semana a la 13° semana.

El que en los ratones hembra se haya presentado inmunosupresión de IgG y no de IgM, puede atribuirse a que las células B2 probablemente forman, en las etapas avanzadas del cáncer de mama, parte del infiltrado inflamatorio del tumor. Se ha reportado que el infiltrado inflamatorio de los tumores mamarios está conformado por el 60% de células B, y por medio de histología, se ha observado que la mayoría de esas células son agregados de células B IgG+, a diferencia del tejido sano que en su mayoría presenta agregados de células B IgA+ (Rodríguez and Padilla, 2008). Además, la presencia de IL-10, producida por las células B reguladoras, favorece la inducción de factores pro-inflamatorios e inductores de la angiogénesis (VEGF), inhibe la generación de respuesta inmune en el sitio del



tumor y media la inmunosupresión (Llanes-Fernández Et Al., 2006. Disis and Stanton, 2015). Por lo que podría decirse, que el tumor secuestra a las células B IgG+ y la presencia de IL-10 inmunosuprime su función (Ernst and Anderson, 2015).

Los niveles de IgM se mantienen durante el desarrollo de la enfermedad, por la presencia constante de IgM naturales producidas por las células B1 en el bazo y en las cavidades pleurales. Las células B1 se dividen en células de la zona marginal y en células B1 foliculares, y se ha observado que las últimas pueden reconocer ciertos antígenos por medio de una respuesta T-dependiente después de una infección (Taki et al., 1992). También existe la población de células B1b, que producen anticuerpos IgM de memoria y de larga duración, por medio de una respuesta T-independiente (Alugupalli et al., 2004). Por lo anterior, podría decirse que la presencia de las células B1 foliculares y de las células B1b contribuye al incremento de la producción total de anticuerpos IgM, pero no de IgG (Martin and Kearney, 2001).

En los ratones macho el reconocimiento de antígenos por IgG aumentó de la S1 hasta la S5, mientras el reconocimiento de antígenos por IgM se mantuvo y no decayó durante las 5 semanas de crecimiento del tumor en ratones de ambos sexos. En los ratones macho con cáncer de mama no se observó inmunosupresión de las respuestas de IgM e IgG, probablemente porque los ratones produjeron una mejor respuesta inmune contra los antígenos de células tumorales 4T1, ya que el reconocimiento de antígenos *per se* se relaciona con el desarrollo tumoral, y porque estas células originalmente provienen de ratones hembra (Yoshimura et al., 2001). Es decir, los ratones macho posiblemente reconocieron a los antígenos 4T1 de origen femenino como "no propios" o "xenoantígenos", lo que provocó que las reacciones de IgG e IgM aumentaran con el tiempo, en contraste con las respuestas de ratones hembra. Los xenoantígenos homólogos tienen propiedades de antígenos reconocidos como "no propios", lo que permitió que los ratones macho rompieran la tolerancia (Strioga et al., 2014). Además, los ratones machos podrían desarrollar cáncer de mama cuando se implantan con las células 4T1 debido a la presencia de andrógenos. Estudios



epidemiológicos han reportado que los andrógenos estimulan la proliferación celular y promueven el desarrollo del cáncer (Key T, Appleby P, Barnes I, 2002). Estudios de cohortes prospectivos también sugieren que el riesgo de cáncer de mama aumenta con altos niveles de andrógenos circulantes, directamente por el aumento del crecimiento celular y la proliferación a través del receptor de andrógenos, o indirectamente a través de la aromatización de estrógenos (Campagnoli et al., 2013; Kotsopoulos and Narod, 2012).

Después de la implantación de las células tumorales 4T1, el reconocimiento de antígenos se dio por IgG y IgM de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, en el patrón de reconocimiento de antígenos-IgM de los inmunoblots-2D de las S1 a la S5, se observa la suma del patrón de reconocimiento de la S0 o de la respuesta IgM natural más el patrón de reconocimiento de la respuesta IgM adaptativa. Es decir, algunos antígenos que fueron reconocidos en la S0 también fueron reconocidos por el mismo ratón en la S1, y se consideraron ser los mismos antígenos ya que compartían el punto isoeléctrico y el peso molecular. No obstante, el número de spots listados en la **Tabla 1** de la S1 a la S5 para cada ratón es el resultado de restar, de acuerdo al punto isoeléctrico y al peso molecular, los antígenos reconocidos en la S0, que también fueron detectados en las semanas posteriores del desarrollo del tumor.

Los antígenos reconocidos exclusivamente por la respuesta inmune innata (S0) y los antígenos reconocidos exclusivamente por IgM (S1), podrían aislarse para el diagnóstico temprano ya que son los primeros en ser censados por las IgM naturales, y reconocidos por las IgM adaptativas después de la exposición a las células tumorales 4T1. Sin embargo, para diferenciar entre los antígenos reconocidos por IgM natural e IgM adaptativa, se tendrían que distinguir estructuralmente entre ellas. Para ello, se podrían utilizar ratones irradiados letalmente (Hayakawa and Smyth, 2006; Martin and Kearney, 2001), que sean deficientes ya sea de células B1 o de células B2, y estimular la producción de anticuerpos IgM naturales o IgM adaptativos, respectivamente. Entonces, se confrontaría el suero de estos ratones deficientes con cáncer de mama, ya sea de células B1 o células B2, contra los antígenos tumorales de las células 4T1, para



observar los patrones de reconocimiento de antígenos por separado. Así se podrían diferenciar a los antígenos reconocidos por IgM natural de los reconocidos por IgM adaptativa, y conocer si algunos antígenos son reconocidos por ambos tipos de IgM.

Para obtener los patrones de reconocimiento de antígenos, las imágenes de inmunoblots-2D fueron divididas en una cuadrícula de 100 casillas. Cada ratón hembra y macho tiene un patrón individual de reconocimiento de antígenos tumorales 4T1. La cantidad de antígenos reconocidos por IgG e IgM del suero de ratones hembra y machos de las diferentes semanas y la cantidad de spots de cada individuo, podría ser similar, por lo que no hubo diferencias en el reconocimiento de antígenos entre machos y hembras. No obstante, si hubo diferencias en los patrones de distribución de spots dentro de las imágenes de inmunoblots-2D, donde los patrones de reconocimiento difieren si los antígenos fueron reconocidos por IgG o por IgM. El número de antígenos reconocidos por ratones macho fue similar a los reconocidos por ratones hembra, y por lo tanto, no se dio un patrón de reconocimiento diferencial entre ambos sexos. Tanto los ratones hembra y macho reconocieron en su mayoría los mismos antígenos, y aunque las hembras pudieran poseer un extra en la producción de IgM por los estrógenos, esto probablemente no afectó el patrón de reconocimiento de antígenos. Por otro lado, el patrón de reconocimiento de antígenos en las imágenes de inmunoblots-2D si es diferente de acuerdo al tipo de inmunoglobulina (IgG e IgM) que reconoce a los antígenos 4T1.

Los 8 antígenos compartidos entre IgM e IgG son proteínas importantes y notables que se podrían secuenciar e identificar para conocer que proteínas son. En su mayoría los antígenos fueron reconocidos por IgM natural e IgM adaptativa, en las S0 y S1 respectivamente, lo que apoya la idea de utilizar ambos tipos de IgM para el diagnóstico temprano del cáncer de mama. Se ha reportado que se necesitan tanto IgM natural como IgM adaptativa para el óptimo funcionamiento del sistema inmune contra infecciones primarias. Ratones quiméricos a los que les hacen falta las células B1 o B2 y por lo tanto algún tipo de IgM, sufrieron un alto índice de mortalidad después de una infección, no obstante, los ratones



quiméricos faltantes de IgM natural mueren en poco tiempo después de ser infectados, a diferencia de los ratones quiméricos que producen IgM natural, pero no IgM adaptativa. Se ha comprobado que los efectos de IgM natural e IgM adaptativa no son redundantes, sino que actúan en conjunto para proveer protección inmune completa, aunque cada tipo de IgM actúe en diferente momento y locación (Baumgarth et al., 2000b).

Los resultados presentados apoyan la idea de que IgM es una inmunoglobulina que puede utilizarse como una herramienta para el diagnóstico temprano, porque sus patrones de reconocimiento en las imágenes de inmunoblot-2D difieren de los de IgG. De acuerdo a los patrones de reconocimiento de IgM, ésta parece no estar sujeta a regulación hormonal y no presenta inmunosupresión como IgG, lo que se observó en ratones hembra con cáncer de mama. Además, los resultados favorecen la idea de utilizar este análisis de la variabilidad de la respuesta inmune humoral mediada por IgM natural y adaptativa, para asentar las bases para desarrollar una herramienta de diagnóstico temprano.



VIII. CONCLUSIONES

- Las imágenes de los inmunoblot-2D mostraron una gran variabilidad de la respuesta inmune humoral mediada por IgG e IgM hacia los antígenos de las células tumorales 4T1 en las diferentes etapas del cáncer de mama, tanto en ratones hembras como macho. Además, la distribución de los spots dentro de las imágenes dieron patrones definidos de reconocimiento antigénico, los cuales al ser transcritos en una firma inmunológica, permitieron agrupar a los ratones de acuerdo al tipo inmunoglobulina (IgG e IgM) que reconocía al antígeno, pero no al sexo.
- La respuesta mediada por IgG en los sueros de los ratones hembra se observó inmunosuprimida, y sólo se presentó en la semana 1 y/o semana 2 del desarrollo tumoral. La respuesta mediada por IgM hacia los antígenos de las células tumorales 4T1, se presentó de la semana 0 a la semana 5. El reconocimiento de los antígenos tumorales 4T1 por IgG e IgM de los sueros de ratones macho se mantuvo a lo largo del desarrollo de la enfermedad.
- Los anticuerpos presentes en los sueros de las semanas 0 se consideraron como IgM naturales, mientras los anticuerpos de las semanas 1 a la 5 se consideraron como IgM adaptativas. La participación de ambos tipos de IgM fue constante a lo largo del crecimiento tumoral, sin embargo, fueron 8 los antígenos detectados por ambos tipos de IgM en la semana 0 y semana 1, los cuales pudieran ser importantes para el diagnóstico temprano, por lo que podrían secuenciarse, identificarse y utilizarse como una herramienta para el diagnóstico temprano del cáncer de mama.



IX. PERSPECTIVAS

En un futuro se plantea llevar a cabo lo siguiente:

- Medir la concentración de IgM total de cada uno de los sueros de los ratones de las diferentes semanas de desarrollo tumoral.
- Medir la relación IgM:IgG en cada uno de los sueros.
- Como un primer control negativo, se implantaran ratones con fibroblastos y su suero se confrontará con los antígenos de las células 4T1 para obtener los inmunoblots-2D.
- Un segundo control negativo consistirá en confrontar el suero de ratones implantados con las células 4T1 contra las proteínas obtenidas de un lisado de fibroblastos o de tejido normal.
- Para constatar la inmunosupresión de IgG, se medirá la citocina inmunosupresora IL-10.
- Se secuenciarán los 8 antígenos que fueron reconocidos por IgM natural e IgM adaptativa en la semana 0 y semana 1 de desarrollo del cáncer de mama, para conocer de qué proteínas se trata.

Para la obtención de mejores datos, se aplicará el análisis de la variabilidad de la respuesta de IgM en un modelo murino de cáncer de mama espontáneo:

- Se realizará el análisis de la variabilidad de la respuesta inmune humoral mediada por IgM del cáncer de mama murino, con los sueros y el tejido tumoral de los ratones transgénicos FVB PyVT, los cuales desarrollan cáncer de mama espontáneo. Se identificarán y secuenciarán los antígenos representativos de los tumores PyVT que sean reconocidos por IgM natural e IgM adaptativa en las primeras semanas de edad de los ratones, antes de la aparición de una masa tumoral palpable; y se establecerá si los antígenos son probables candidatos para una herramienta de diagnóstico temprano del cáncer de mama.



X. LITERATURA CITADA

- Albanopoulos, K., A. Armakolas, M.M. Konstadoulakis, E. Leandros, E. Tsiompanou, E. Tsiobanou, S. Katsaragakis, D. Alexiou, and G. Androulakis. 2000. Prognostic significance of circulating antibodies against carcinoembryonic antigen (anti-CEA) in patients with colon cancer. *Am. J. Gastroenterol.* 95:1056–61.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002. *B Cells and Antibodies*. 4th ed. Garland Science, New York.
- Allison, J.P. 2005. Blockade of T cell inhibitory signals: a new paradigm in tumor immunotherapy? *Cancer Immunol.* 5:9.
- Alugupalli, K.R., J.M. Leong, R.T. Woodland, M. Muramatsu, T. Honjo, and R.M. Gerstein. 2004. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity.* 21:379–90.
- American Cancer Society. 2015. *Breast Cancer*.
<http://documents.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003090-pdf.pdf>.
- American Cancer Society. 2015. *Type breast cancers*.
<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailed>.
- Anderson, B.O., S. Braun, S. Lim, R.A. Smith, S. Taplin, and D.B. Thomas. 2003. Early detection of breast cancer in countries with limited resources. *Breast J.* 9 Suppl 2:S51–9.
- Anderson, K.S., N. Ramachandran, J. Wong, J. V Raphael, E. Hainsworth, G. Demirkan, D. Cramer, D. Aronzon, F. Stephen, L. Harris, T. Logvinenko, and J. Labaer. 2008. Application of Protein Microarrays for Multiplexed Detection of Antibodies to Tumor Antigens in Breast Cancer. *J. Proteome Res.* 7:1490–1499.
- Anderson, W.F., M.D. Althuis, L.A. Brinton, and S.S. Devesa. 2004. Is male breast cancer similar or different than female breast cancer? *Breast Cancer Res. Treat.* 83:77–86.
- Anelli, T., and E. van Anken. 2013. Missing links in antibody assembly control. *Int. J. Cell Biol.* 2013:606703.
- Arango, M.C., M.E. Faxas, Y. Pérez, and R. Camacho-Rodríguez. 2002. Citotoxicidad natural inducida por la activación de linfocitos T en pacientes con cáncer de mama. *Rev. Cubana Med.* 41:3–9.



- Arango, M.C., L. Llánes, L. Moreno de Miguel, and E. Fáxas. 1999. Influencia de citocinas en respuesta citotóxica natural de pacientes con cáncer de mama. *Rev. Cuba. Oncol.* 15:186–192.
- Baumgarth, N. 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* 11:34–46.
- Baumgarth, N., J. Chen, O.C. Herman, G.C. Jager, and L.A. Herzenberg. 2000a. The role of B-1 and B-2 cells in immune protection from influenza virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 252:163–9.
- Baumgarth, N., O.C. Herman, G.C. Jager, L. Brown, and L.A. Herzenberg. 1999. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:2250–5.
- Baumgarth, N., O.C. Herman, G.C. Jager, L.E. Brown, L.A. Herzenberg, and J. Chen. 2000b. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J. Exp. Med.* 192:271–80.
- Bendtsen, K., M.B. Hansen, C. Ross, and M. Svenson. 1998. High-avidity autoantibodies to cytokines. *Immunol. Today.* 19:209–211.
- Berry, D.A., K.A. Cronin, S.K. Plevritis, D.G. Fryback, L. Clarke, M. Zelen, J.S. Mandelblatt, A.Y. Yakovlev, J.D.F. Habbema, and E.J. Feuer. 2005. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353:1784–92.
- Boes, M. 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunol.* 37:1141–9.
- Boes, M., C. Esau, M.B. Fischer, T. Schmidt, M. Carroll, and J. Chen. 1998. Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *J. Immunol.* 160:4776–87.
- Boes, M., T. Schmidt, K. Linkemann, B.C. Beaudette, A. Marshak-Rothstein, and J. Chen. 2000. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:1184–9.
- Bohn, J. 1999. Are natural antibodies involved in tumour defence? *Immunol. Lett.* 69:317–320.
- Borgen, P.I., G.Y. Wong, V. Vlamis, C. Potter, B. Hoffmann, D.W. Kinne, M.P. Osborne, and W.M. McKinnon. 1992. Current management of male breast cancer. A review of 104 cases. *Ann. Surg.* 215:451–7.



- Brandan, M.E., and Y.V. Navarro. 2006. Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. *Cancerología*. 1:147–162.
- Brändlein, S., M. Eck, P. Ströbel, E. Wozniak, H.K. Müller-Hermelink, F. Hensel, and H.P. Vollmers. 2004. PAM-1, a natural human IgM antibody as new tool for detection of breast and prostate precursors. *Hum. Antibodies*. 13:97–104.
- Brändlein, S., T. Pohle, and N. Ruoff. 2003. Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res*. 63:7995–8005.
- Brändlein, S., N. Rauschert, L. Rasche, A. Dreykluft, F. Hensel, E. Conzelmann, H.-K. Müller-Hermelink, and H.P. Vollmers. 2007. The human IgM antibody SAM-6 induces tumor-specific apoptosis with oxidized low-density lipoprotein. *Mol. Cancer Ther*. 6:326–33.
- BreastCancer.org. 2015. Cómo interpretar los resultados de análisis de receptores hormonales. <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostic>.
- Bright, K., M. Barghash, M. Donach, M.G. de la Barrera, R.J. Schneider, and S.C. Formenti. 2011. The role of health system factors in delaying final diagnosis and treatment of breast cancer in Mexico City, Mexico. *Breast*. 20 Suppl 2:S54–9.
- Burnet, F.M. 1971. Immunological Surveillance in Neoplasia. *Immunol. Rev*. 7:3–25.
- Campagnoli, C., P. Pasanisi, I. Castellano, C. Abbà, T. Brucato, and F. Berrino. 2013. Postmenopausal breast cancer, androgens, and aromatase inhibitors. *Breast Cancer Res. Treat*. 139:1–11.
- Capurro, M., L. Bover, P. Portela, P. Livingston, and J. Mordoh. 1998. FC-2.15, a monoclonal antibody active against human breast cancer, specifically recognizes Lewis(x) hapten. *Cancer Immunol. Immunother. Cll*. 45:334–49.
- Carlsson, G., L. Ekelund, L. Stigsson, and L. Hafström. 1983. Vascularization and tumour volume estimations of solitary liver tumours in rats. *Ann. Chir. Gynaecol*. 72:187–91.
- Carsetti, R., M.M. Rosado, and H. Wardmann. 2004. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol. Rev*. 197:179–91.
- Carson, W., C.L. Shapiro, T.R. Crespín, L.M. Thornton, and B.L. Andersen. 2004. Cellular immunity in breast cancer patients completing taxane treatment. *Clin. cancer Res*. 10:3401–3409.
- Casali, P. and Schettino, E.W. 1996. Structure and function of natural antibodies. *Top. Microbiol. Immunol*. 210:167–179.



- Chávarri-Guerra, Y., C. Villarreal-Garza, P.E.R. Liedke, F. Knaul, A. Mohar, D.M. Finkelstein, and P.E. Goss. 2012. Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol.* 13:e335–e343.
- Chen, Y., S. Khanna, C.S. Goodyear, Y.B. Park, E. Raz, S. Thiel, C. Grönwall, J. Vas, D.L. Boyle, M. Corr, D.H. Kono, and G.J. Silverman. 2009. Regulation of dendritic cells and macrophages by an anti-apoptotic cell natural antibody that suppresses TLR responses and inhibits inflammatory arthritis. *J. Immunol.* 183:1346–59.
- Cho, H.J., and N. Bhardwaj. 2003. Against the self: dendritic cells versus cancer. *APMIS acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 111:805–817.
- Cimino-Mathews, A., J.B. Foote, and L.A. Emens. 2015. Immune Targeting in Breast Cancer. *Oncology.* 29(5):375-85.
- Cohn, D.A. 1979. Sensitivity to androgen . A possible factor in sex differences in the immune response. *Clin. exp. Immunol.* 38:218–227.
- Conry, R.M., K.O. Allen, S. Lee, S.E. Moore, D.R. Shaw, and A.F. LoBuglio. 2000. Human autoantibodies to carcinoembryonic antigen (CEA) induced by a vaccinia-CEA vaccine. *Clin. Cancer Res.* 6:34–41.
- Coronella, J.A., C. Spier, M. Welch, T. Trevor, A.T. Stopeck, H. Villar, M. Evan, K.T. Trevor, and E.M. Hersh. 2002. Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the Breast. *J. Immunol.* 169:1829–36.
- Coutinho, a, M.D. Kazatchkine, and S. Avrameas. 1995. Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 7:812–8.
- Crichlow, R.W. 1972. Carcinoma of the male breast. *Surg. Gynecol. Obstet.* 134:1011–9.
- Crichlow, R.W., and S.W. Galt. 1990. Male breast cancer. *Surg. Clin. North Am.* 70:1165–77.
- Dehesa, A.Z., S. Frías, G.G. Vázquez, E. Josué, R. Medina, E.C. Alarcón, J.L. Ventura, J.R.R. Velázquez, N.C. Sánchez, and G. Delina. 2007. Cáncer de glándula mamaria y metástasis: un creciente problema de salud en México. *Mensaje Bioquímico.* XXXI:172–195.
- Demers, P.A., D.B. Thomas, K.A. Rosenblatt, L.M. Jimenez, A. McTiernan, H. Stalsberg, A. Stemhagen, W.D. Thompson, M.G. Curnen, and W. Satariano. 1991. Occupational exposure to electromagnetic fields and breast cancer in men. *Am. J. Epidemiol.* 134:340–7.



- Demeter, J.G., N.G. Waterman, and G.D. Verdi. 1990. Familial male breast carcinoma. *Cancer*. 65:2342–2343.
- Desmetz, C., A. Mange, T. Maudelonde, and J. Solassol. 2011. Autoantibody signatures: progress and perspectives for early cancer detection. *J. Cell. Mol. Med.* 15:2013–2024.
- Dexter, D.L., H.M. Kowalski, B.A. Blazar, Z. Fligel, R. Vogel, and G.H. Heppner. 1978. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 38:3174–81.
- Díaz-Zaragoza, M., R. Hernández, and P. Ostoa-Saloma. 2014. 2D immunoblots show differential response of mouse IgG and IgM antibodies to antigens of mammary carcinoma 4 T1 cells. *Cancer Cell Int.* 14:9.
- Díaz-Zaragoza, M., R. Hernández-Ávila, R. Viedma-Rodríguez, D. Arenas-Aranda, and P. Ostoa-Saloma. 2015. Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer (Review). *Oncol. Rep.* 34: 1106-14.
- Disis, M.L. and S.E. Stanton. 2015. Triple-negative breast cancer: Immune modulation as the new treatment paradigm. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 35:e25-30.
- Dresser, D.W. 1962. Specific inhibition of antibody production. I. Protein-over loading paralysis. *Immunology.* 5:161–168.
- Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 21:137–148.
- Dupont, W.D., and D.L. Page. 1985. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med.* 312:146–151.
- Eidinger, David and Garrett, T.J. 1972. Studies of regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *J. Exp. Med.* 136:1098–1116.
- Eiermann, W., J. Bergh, F. Cardoso, P. Conte, J. Crown, N.J. Curtin, J. Gligorov, B. Gusterson, H. Joensuu, B.K. Linderholm, M. Martin, F. Penault-Llorca, B.C. Pestalozzi, E. Razis, C. Sotiriou, S. Tjulandin, and G. Viale. 2012. Triple negative breast cancer: proposals for a pragmatic definition and implications for patient management and trial design. *Breast.* 21:20–6.
- Ernst, B., and K.S. Anderson. 2015. Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. *Curr. Oncol. Rep.* 17:5-10.



- Etzioni, R., N. Urban, S. Ramsey, M. McIntosh, S. Schwartz, B. Reid, J. Radich, G. Anderson, and L. Hartwell. 2003. The case for early detection. *Nat. Rev. Cancer.* 3:243–252.
- Faxas, M.E., G. Expósito, A.M. Vázquez, C.A. García, N.L. Fernández, and L. Moreno. 1987. Cellular immunity changes in patients with benign and malignant breast disease. *Rev. Cuba. Oncol.* 3:81–92.
- Fernández Madrid, F. 2005. Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis. *Cancer Lett.* 230:187–198.
- Gasser, S., S. Orsulic, E.J. Brown, and D.H. Raulet. 2005. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature.* 436:1186–90.
- Gilewski, T., S. Adhuri, G. Ragupathi, T. Yao, K. Panageas, M. Moynahan, A. Houghton, L. Norton, and P.O. Livingston. 2000. Vaccination of high-risk breast cancer patients with Mucin-1 (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clin. Cancer Res.* 1:1693–1701.
- Globocan. 2012. Cancer incidence and mortality worldwide in 2008. International Agency for Research on Cancer, WHO. <http://globocan.iarc.fr/>.
- Guy, C.T., R.D. Cardiff, and W.J. Muller. 1992. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol. Cell. Biol.* 12:954–61.
- Hadden, J.W. 1999. Review Article The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update. *Int. J. Immunopharmacol.* 21:79–101.
- Hayakawa, Y., and M.J. Smyth. 2006. Innate immune recognition and suppression of tumors. *Adv. Cancer Res.* 95:293–322.
- Hensel, F., S. Brändlein, M. Eck, K. Schmidt, V. Krenn, A. Kloetzer, A. Bachi, M. Mann, H.K. Müller-Hermelink, and H.P. Vollmers. 2001. A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody. *Lab. Investig.* 81:1097–108.
- Hensel, F., R. Hermann, C. Schubert, N. Abe, K. Schmidt, A. Franke, A. Shevchenko, M. Mann, H.K. Mu, and H.P. Vollmers. 1999. Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis. *Cancer Res.* 59:5299–306.
- Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 5:971–4.



- Huang, R.R., D. Wen, M. Nguyen, R. Offodile, S. Stern, R. Turner, A.J. Cochran, J. Eisenberg, K. Breast, and J. Wayne. 2000. Selective modulation of paracortical dendritic cells and T-lymphocytes in breast cancer sentinel lymph nodes. *Breast J.* 6:225–232.
- Irvin, W.J., and L. a Carey. 2008. What is triple-negative breast cancer? *Eur. J. Cancer.* 44:2799–805.
- Janeway, C. a. 2013. Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold spring harb symp quant biol. 1989. 54: 1-13. *J. Immunol.* 191:4475–87.
- Jayasekera, J.P., E.A. Moseman, and M.C. Carroll. 2007. Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. *J. Virol.* 81:3487–94.
- Karin, M., T. Lawrence, and V. Nizet. 2006. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell.* 124:823–835.
- Key T, Appleby P, Barnes I, R.G. 2002. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: Reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst.* 94:606–616.
- Kim, R., M. Emi, K. Tanabe, and K. Arihiro. 2006. Immunobiology of the sentinel lymph node and its potential role for antitumour immunity. *Lancet Oncol.* 7:1006–1016.
- Klimovich, V.B. 2011. IgM and its receptors: structural and functional aspects. *Biochemistry.* 76:534–49.
- Knaul, F.M., G. Nigenda, R. Lozano, H. Arreola-Ornelas, A. Langer, and J. Frenk. 2008. Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reprod. Health Matters.* 16:113–123.
- Knaul, F.M., G. Nigenda, R. Lozano, M. C, H. Arreola-ornelas, A. Langer, and J. Frenk. 2009. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Publica Mex.* 51:335–344.
- Kobata, A., and J. Amano. 2005. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours. *Immunol. Cell Biol.* 83:429–39.
- Korde, L.A., J.A. Zujewski, L. Kamin, S. Giordano, S. Domchek, W.F. Anderson, J.M.S. Bartlett, K. Gelmon, Z. Nahleh, J. Bergh, B. Cutuli, G. Pruneri, W. McCaskill-Stevens, J. Gralow, G. Hortobagyi, and F. Cardoso. 2010. Multidisciplinary meeting on male breast cancer: summary and research recommendations. *J. Clin. Oncol.* 28:2114–22.



- Kotsopoulos, J., and S.A. Narod. 2012. Androgens and breast cancer. *Steroids*. 77:1–9.
- Lara-Medina, F., V. Pérez-Sánchez, D. Saavedra-Pérez, M. Blake-Cerda, C. Arce, D. Motola-Kuba, C. Villarreal-Garza, A.M. González-Angulo, E. Bargalló, J.L. Aguilar, A. Mohar, and Ó. Arrieta. 2011. Triple-negative breast cancer in Hispanic patients. *Cancer*. 117:3658–3669.
- Lazcano-Ponce, E., and B. Allen-Leigh. 2009. Innovation in cervical cancer prevention and control in Mexico. *Arch. Med. Res.* 40:486–92.
- Lee, H.J., J.J. Lee, I.H. Song, I.A. Park, J. Kang, J.H. Yu, J.H. Ahn and G. Gong. 2015. Prognostic and predictive value of NanoString-based immunerelated gene signatures in a neoadjuvant setting of triple-negative breast cancer: relationship to tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Res Treat.* 151:619–27.
- Lelekakis, M., J.M. Moseley, T.J. Martin, D. Hards, E. Williams, P. Ho, D. Lowen, J. Javni, F.R. Miller, J. Slavin, and R.L. Anderson. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin. Exp. Metastasis*. 17:163–170.
- Levenson, V. V. 2007. Biomarkers for early detection of breast cancer: what, when, and where? *Biochim. Biophys. Acta*. 1770:847–856.
- Lim, H.W., P. Hillsamer, A.H. Banham, and C.H. Kim. 2005. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 175:4180–83.
- Liu, C.-Y., L.-M. Tseng, J.-C. Su, K.-C. Chang, P.-Y. Chu, W.-T. Tai, C.-W. Shiau, and K.-F. Chen. 2013. Novel sorafenib analogues induce apoptosis through SHP-1 dependent STAT3 inactivation in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 15:R63.
- Llanes-Fernández, L., R.I. Alvarez-Goyanes, M.D.C. Arango-Prado, J.M. Alcocer-González, J.C. Mojarrieta, X.E. Pérez, M.O. López, S.F. Odio, R. Camacho-Rodríguez, M.E. Guerra-Yi, V. Madrid-Marina, R. Tamez-Guerra, and C. Rodríguez-Padilla. 2006. Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients. *Breast*. 15:482–9.
- Lopes-Carvalho, T., and J.F. Kearney. 2004. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol. Rev.* 197:192–205.
- López-Carrillo, L., L. Torres-Sánchez, M. López-Cervantes, and C. Rueda-Neria. Identificación de lesiones mamarias malignas en México. *Salud Publica Mex.* 43:199–202.
- Lu, H., V. Goodell, and M.L. Disis. 2008. Humoral immunity directed against tumor-associated antigens as potential biomarkers for the early diagnosis of cancer. *J. Proteome Res.* 7:1388–1394.



- Madi, A., I. Hecht, S. Bransburg-Zabary, Y. Merbl, A. Pick, M. Zucker-Toledano, F.J. Quintana, A.I. Tauber, I.R. Cohen, and E. Ben-Jacob. 2009. Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:14484–14489.
- Manson, J.J., C. Mauri, and M.R. Ehrenstein. 2005. Natural serum IgM maintains immunological homeostasis and prevents autoimmunity. *Springer Semin Immunopathol.* 26:425–432.
- Manz, R. a, A.E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2005. Maintenance of serum antibody levels. *Annu. Rev. Immunol.* 23:367–86.
- Martin, F., and J.F. Kearney. 2001. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 13:195–201.
- Mathers, C.D., A.D. Lopez, and C.J.L. Murray. 2006. The Burden of Disease and Mortality by Condition: Data, Methods, and Results for 2001. *In* Global Burden of Disease and Risk Factors. World Bank, Washintong DC.
- Matsuura, K., Y. Yamaguchi, H. Ueno, A. Osaki, K. Arihiro, and T. Toge. 2006. Maturation of dendritic cells and T-cell responses in sentinel lymph nodes from patients with breast carcinoma. *Cancer.* 106:1227–36.
- Mcperson, K., C.M. Steel, and J.M. Dixon. 2000. ABC of Breast Diseases. Breast cancer — epidemiology, risk factors, and genetics. *Clin. Rev.* 321:624–628.
- Von Mensdorff-Pouilly, S., a a Verstraeten, P. Kenemans, F.G. Snijdwint, a Kok, G.J. Van Kamp, M. a Paul, P.J. Van Diest, S. Meijer, and J. Hilgers. 2000. Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J. Clin. Oncol.* 18:574–83.
- Merbl, Y., M. Zucker-Toledano, F.J. Quintana, and I.R. Cohen. 2007. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J. Clin. Invest.* 117:712–718.
- Merino, M.C., and A. Gruppi. 2006. Origen y desarrollo de linfocitos B1: Una población celular involucrada en defensa y autoinmunidad. *Medicina (B. Aires).* 66:165–172.
- Miller, a B. 1993. What is the role of early detection and screening in cancer control? *J. Public Health Policy.* 14:403–412.
- Milner, E.C.B., J. Anolik, A. Cappione, and I. Sanz. 2005. Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity? *Springer Semin Immunopathol.* 26:433–452.



- Molina, R., V. Barak, A. van Dalen, M.J. Duffy, R. Einarsson, M. Gion, H. Goike, R. Lamerz, M. Nap, G. Sölétormos, and P. Stieber. 2005. Tumor markers in breast cancer-european group on tumor markers recommendations. *Tumour Biol.* 26:281–93.
- Molling, J.W., W. Kölgen, H.J.J. van der Vliet, M.F. Boomsma, H. Kruizena, C.H. Smorenburg, B.G. Molenkamp, J. a Langendijk, C.R. Leemans, B.M.E. von Blomberg, R.J. Scheper, and A.J.M. van den Eertwegh. 2005. Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *Int. J. cancer.* 116:87–93.
- Monzavi-Karbassi, B., L.J. Hennings, C. Artaud, T. Liu, F. Jousheghany, A. Pashov, R. Murali, L.F. Hutchins, and T. Kieber-Emmons. 2007. Preclinical studies of carbohydrate mimetic peptide vaccines for breast cancer and melanoma. *Vaccine.* 25:3022–31.
- Moore, D.H., and C.T. Moore. 1983. Breast carcinoma etiological factors. *Adv. Cancer Res.* 40:189–253.
- Moore, S., and F. Foote. 1949. T he relative favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer.* 2:635–642.
- Moretta, L., C. Bottino, D. Pende, M.C. Mingari, R. Biassoni, and A. Moretta. 2002. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur. J. Immunol.* 32:1205–11.
- Moretta, M., and E. Ciccone. 1994. Human Natural Killer Cell: origen, clonality, specificity and receptors. *Adv. Immunol.* 55:341–381.
- Nagele, E.P., M. Han, N.K. Acharya, C. DeMarshall, M.C. Kosciuk, and R.G. Nagele. 2013. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS One.* 8:e60726.
- National Breast Cancer Foundation. 2015. *Breast Cancer Types.*
[http://www.nationalbreastcancer.org/types-of-breast-cancer.](http://www.nationalbreastcancer.org/types-of-breast-cancer)
- Nauta, A.J., N. Raaschou-Jensen, A. Roos, M.R. Daha, H.O. Madsen, M.C. Borrias-Essers, L.P. Ryder, C. Koch, and P. Garred. 2003. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur. J. Immunol.* 33:2853–63.
- Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2.2002. 2003. Para la prevención, diagnóstico, Tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer mama. *Secretaria de Salud.* www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/041ssa202.html.%
- Notkins, A.L. 2004. Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol.* 25:174–9.



- Ochsenbein, A.F., T. Fehr, C. Lutz, M. Suter, F. Brombacher, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*. 286:2156–9.
- Ogden, C.A., R. Kowalewski, Y. Peng, V. Montenegro, and K.B. Elkon. 2005. IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity*. 38:259–64.
- Ostoa-Saloma, P., M. Esquivel-Velázquez, P. Ostoa-Jacobo, and C. Larralde. 2009. Strategies of statistical image analysis of 2D immunoblots: the case of IgG response in experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Immunol. Methods*. 351:46–54.
- Paavonen, B.Y.T., L.C. Andersson, and H. Adlercreutz. 1981. Regulation of estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in Pokeweed mitogen-stimulated cultures. *J. Exp. Med.* 154:1935–1945.
- Palacio-Mejía, L.S., D. Pobl, E. Lazcano-ponce, D. C, B. Allen-leigh, D. Antrop, and M. Hernández-ávila. 2009. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Publica Mex.* 51:S208–S219.
- Panda, S., and J.L. Ding. 2014. Natural Antibodies Bridge Innate and Adaptive Immunity. *J. Immunol.* 194:13–20.
- Panieri, E. 2012. Breast cancer screening in developing countries. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 26:283–290.
- Pappo, I., T. Karni, J. Sandbank, I. Dinur, A. Sella, V. Stahl-Kent, I. Wasserman, and A. Halevy. 2007. Breast cancer in the elderly: histological, hormonal and surgical characteristics. *Breast*. 16:60–7.
- Pashov, A., B. Monzavi-Karbassi, and T. Kieber-Emmons. 2009. Immune surveillance and immunotherapy: lessons from carbohydrate mimotopes. *Vaccine*. 27:3405–15.
- Patel, T.A., G. Colon-Otero, C. Bueno Hume, J.A. Copland, and E.A. Perez. 2010. Breast cancer in Latinas: gene expression, differential response to treatments, and differential toxicities in Latinas compared with other population groups. *Oncologist*. 15:466–75.
- Perou, C.M., T. Sørlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lønning, A.L. Børresen-Dale, P.O. Brown, and D. Botstein. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 406:747–52.



- Pohle, T., S. Brändlein, N. Ruoff, S. Bra, H.K. Mu, and H.P. Vollmers. 2004. Lipoptosis: tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation. *Cancer Res.* 64:3900–06.
- Porter, P. 2008. “Westernizing” women’s risks? Breast cancer in lower-income countries. *N. Engl. J. Med.* 358:213–6.
- Pulaski, B. a, and S. Ostrand-Rosenberg. 2001. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 20:Unit 20.2.
- Pulaski, B.A., and S. Ostrand-Rosenberg. 1998. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Cancer Res.* 58:1486–93.
- Pulaski, B.A., D.S. Terman, S. Khan, E. Muller, and S. Ostrand-Rosenberg. 2000. Cooperativity of Staphylococcal aureus enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer Res.* 60:2710–5.
- Quartier, P., P.K. Potter, M.R. Ehrenstein, M.J. Walport, and M. Botto. 2005. Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *Eur. J. Immunol.* 35:252–60.
- Racine, R., M. McLaughlin, D.D. Jones, S.T. Wittmer, K.C. MacNamara, D.L. Woodland, and G.M. Winslow. 2011. IgM production by bone marrow plasmablasts contributes to long-term protection against intracellular bacterial infection. *J. Immunol.* 186:1011–21.
- Ragupathi, G., N.X. Liu, C. Musselli, S. Powell, K. Lloyd, and P.O. Livingston. 2005. Antibodies against tumor cell glycolipids and proteins, but not mucins, mediate complement-dependent cytotoxicity. *J. Immunol.* 174:5706–12.
- Rauschert, N., S. Brändlein, E. Holzinger, F. Hensel, H.-K. Müller-Hermelink, and H.P. Vollmers. 2008. A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Lab. Investig.* 88:375–86.
- Ravandi-Kashani, F., and T.G. Hayes. 1998. Male breast cancer: a review of the literature. *Eur. J. Cancer.* 34:1341–7.
- Ray, S.K., C. Putterman, and B. Diamond. 1996. Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:2019–24.



- Reis-Filho, J.S., and L. Pusztai. 2011. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*. 378:1812–23.
- Roberts, M.M., E.M. Bass, I.W. Wallace, and A. Stevenson. 1973. Local immunoglobulin production in breast cancer. *Br. J. Cancer*. 27:269–275.
- Roda, J.M., R. Parihar, C. Magro, G.J. Nuovo, S. Tridandapani, and W.E. Carson. 2006. Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Res*. 66:517–26.
- Rodríguez, R.C., and C.R. Padilla. 2008. Compromiso del Sistema Inmune en Pacientes con Cáncer de Mama. 3:191–197.
- Sasco, A.J., A.B. Lowenfels, and P. Pasker-de Jong. 1993. Review article: epidemiology of male breast cancer. A meta-analysis of published case-control studies and discussion of selected aetiological factors. *Int. J. Cancer*. 53:538–49.
- Scheike, O. 1973. Male breast cancer. 5. Clinical manifestations in 257 cases in Denmark. *Br. J. Cancer*. 28:552–61.
- Schettino, E.W., S.K. Chai, M.T. Kasaian, H.W. Schroeder, and P. Casali. 1997. VHDJH gene sequences and antigen reactivity of monoclonal antibodies produced by human B-1 cells: evidence for somatic selection. *J. Immunol*. 158:2477–89.
- Shaw, P.X., S. Hörkkö, M.K. Chang, L.K. Curtiss, W. Palinski, G.J. Silverman, and J.L. Witztum. 2000. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J. Clin. Invest*. 105:1731–40.
- Shishido, S.N., S. Varahan, K. Yuan, X. Li, and S.D. Fleming. 2012. Humoral innate immune response and disease. *Clin. Immunol*. 144:142–158.
- Sokoloff, A. V, I. Bock, G. Zhang, S. Hoffman, J. Dama, J.J. Ludtke, A.M. Cooke, and J.A. Wolff. 2001. Specific recognition of protein carboxy-terminal sequences by natural IgM antibodies in normal serum. *Mol. Ther*. 3:821–30.
- Sotiriou, C., S.-Y. Neo, L.M. McShane, E.L. Korn, P.M. Long, A. Jazaeri, P. Martiat, S.B. Fox, A.L. Harris, and E.T. Liu. 2003. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 100:10393–8.
- Spies, T. 2005. Relevance of NKG2D and its ligands in tumor immunity. *Cancer Immun*. 5:10.



- Stein, M.N., J. Shin, O. Gudzowaty, A.M. Bernstein, and J.M. Liu. 2006. Antibody-dependent cell cytotoxicity to breast cancer targets despite inhibitory KIR signaling. *Anticancer Res.* 26:1759–63.
- Strioga, M.M., A. Darinskas, V. Pasukoniene, A. Mlynska, V. Ostapenko, and V. Schijns. 2014. Xenogeneic therapeutic cancer vaccines as breakers of immune tolerance for clinical application : To use or not to use ? *Vaccine.* 32:4015–4024.
- Tagliaferri, M., I. Cohen, and D. Tripathy. 2001. Complementary and alternative medicine in early-stage breast cancer. *Semin. Oncol.* 28:121–134.
- Taki, S., M. Schmitt, D. Tarlinton, I. Förster, and K. Rajewsky. 1992. T cell-dependent antibody production by Ly-1 B cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 651:328–335.
- Tan, H.T., J. Low, S.G. Lim, and M.C.M. Chung. 2009. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *FEBS J.* 276:6880–904.
- Thomas, D.B., L.M. Jimenez, A. McTiernan, K. Rosenblatt, H. Stalsberg, A. Stemhagen, W.D. Thompson, M.G. Curnen, W. Satariano, and D.F. Austin. 1992. Breast cancer in men: risk factors with hormonal implications. *Am. J. Epidemiol.* 135:734–48.
- Verring, A., A. Clouth, P. Ziolkowski, and G.M. Oremek. 2011. Clinical usefulness of cancer markers in primary breast cancer. *ISRN Pathol.* 2011:1–4.
- Vollmers, H.P., and S. Brändlein. 2005a. The “early birds”: natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histol. Histopathol.* 20:927–937.
- Vollmers, H.P., and S. Brändlein. 2005b. Death by stress: antibody induced apoptosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 27:185.
- Vollmers, H.P., and S. Brändlein. 2006a. Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58:755–65.
- Vollmers, H.P., and S. Brändlein. 2006b. Natural IgM antibodies: from parias to parvenus. *Histol. Histopathol.* 21:1355–1366.
- Vollmers, H.P., and S. Brändlein. 2009. Natural antibodies and cancer. *N. Biotechnol.* 25:294–298.
- WHO. 2015a. Early detection of cancer. <http://www.who.int/cancer/detection/en/>.
- WHO. 2015b. Breast cancer: prevention and control. <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/e>.
- Wondimu, A., T. Zhang, T. Kieber-Emmons, P. Gimotty, K. Sproesser, R. Somasundaram, S. Ferrone, C.-Y. Tsao, and D. Herlyn. 2008. Peptides mimicking GD2 ganglioside



elicit cellular, humoral and tumor-protective immune responses in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 57:1079–89.

Yoshimura, N., T. Sawada, M. Furusawa, and S. Fuchinoue. 2001. Expression of xenoantigen transformed human cancer cells to be susceptible to antibody-mediated cell killing. *Cancer Lett.* 164:155–160.

Zhang, M., W.G. Austen, I. Chiu, E.M. Alicot, R. Hung, M. Ma, N. Verna, M. Xu, H.B. Hechtman, F.D. Moore, and M.C. Carroll. 2004. Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:3886–91.

Zhang, X. 2013. Regulatory functions of innate-like B cells. *Cell. Mol. Immunol.* 10:113–21.

Zhou, Z.-H., A.G. Tzioufas, and A.L. Notkins. 2007. Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *J. Autoimmun.* 29:219–28.



XI. ANEXOS

XI.1. Artículos publicados.

XI.1.1. 2D immunoblots show differential response of mouse IgG and IgM antibodies to antigens of mammary carcinoma 4 T1 cells.

Díaz-Zaragoza et al. *Cancer Cell International* 2014, **14**:9
<http://www.cancerci.com/content/14/1/9>



PRIMARY RESEARCH

Open Access

2D immunoblots show differential response of mouse IgG and IgM antibodies to antigens of mammary carcinoma 4 T1 cells

Mariana Díaz-Zaragoza^{1,2}, Ricardo Hernández¹ and Pedro Ostoa-Saloma^{1,2*}

Abstract

Background: Immunosuppression in breast cancer has been reported in women and in the highly metastatic mouse mammary tumor model 4 T1. The immunosuppressive environment complicates the use of the humoral response against the tumor as an immunodiagnostic tool. IgM has not been used in immunodiagnostic in part because its antitumor responses, both innate and adaptive, have not been studied in function of time in breast cancer.

We show a new approach to analyzing the mouse humoral immune response, and compare the evolution with time of IgG and IgM responses against the antigens of 4 T1 cells.

Methods: The study is based on 2-dimensional immunoblotting detection of antigens from 4 T1 cells by the IgG and IgM antibodies in the serum of female mice injected with 4 T1 cells.

Results: There was a high variability in the intra-and inter-mouse response. Variability in the IgM response was manifested as a pattern of spots that could become a multibinomial variable of 0 and 1, which could represent a signature of the immune response. Different numbers of spots was found in the IgG and IgM responses from week 1 to 5. On average, the IgM had more but the IgG response decrease with the time. The natural IgM at $t = 0$ responds stronger than w1; the adaptive response of both IgM and IgG were elicited where, with the former being stronger better than the latter. Antigens that are recognized by some female mice in the first week are also recognized by other female mice at time 0. Contamination of the natural IgM makes difficult use the adaptive IgM as a tool for immunodiagnostic.

Conclusions: IgM and IgG response varied with the time and individuals. Spot variation in 2D pattern for the natural IgM could be expressed as a binomial signature, which opens up the way to correlate a particular pattern with resistance or susceptibility. This uncovers a battery of IgMs for each individual to confront cancer or infections. The possibility to differentiate between adaptive IgM antibodies from the natural IgM will allow investigation of the adaptive IgM for early immunodiagnosis.

Keywords: 2D Immunoblot, IgM, 4 T1 cells, Mammary carcinoma

Background

During a lifetime, human beings are permanently exposed to the development of transformed cells, which arise spontaneously or by contact with trigger factors. Immune surveillance of cancer leads to the generation of anti-tumor antibodies from the early stages of the disease [1]. Once a tumor is established, however, the network of immune sys-

tem associated with it, may paradoxically promote tumor growth and metastasis rather its destruction [2]. The use of mouse models allows investigation of how the immunosuppression status may contribute to tumor establishment. Immunosuppression in breast cancer occurs in women [3-5], and in the highly metastatic mouse mammary tumor model 4 T1 [6,7]. An immunosuppressive environment complicates the use of the humoral response against the tumor as an immunodiagnostic tool. Autoantibodies have many attractive features as biomarkers, in particular natural IgM antibodies (Ab) are involved in the primary defense mechanism that activates the cascades of complement and apoptosis. Therefore

* Correspondence: postoa@unam.mx

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria México D.F. C.P. 04510 Mexico City, Mexico

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria México D.F. C.P. 04510 Mexico City, Mexico



it is one of the most important mechanisms in the detection and elimination of transformed cells as part of the innate humoral immune system [8-12]; IgMs are low-affinity antibody products of the innate immunity that detect the major changes on malignant cells as post-transcriptional modifications of carbohydrate patterns [9,13-18]. Natural IgM antibodies can induce tumor-specific apoptosis [19]. The IgM antitumor responses, both innate and adaptive, have not been studied as a function of time in breast cancer, and therefore we show a new approach for analyzing the mouse humoral immune response, and compare the evolution of IgG and IgM responses against the antigens of 4 T1 cells. The study is based on the detection of antibodies in the serum of female mice injected in the mammary gland nipple with 4 T1 cells, with analysis by two-dimensional immunoblotting. Differential behavior was found between the responses of IgG and IgM. Not only the response to IgG, but the response of IgM decreased with the time, although with different kinetics. Each mouse has an individual pattern of recognition, in our experiments to a tumor antigenic background and a variable number of spots for IgMs. In other words, each individual has a particular expression of IgMs (in number and capacity of recognition) that is genetically determined. This variability was measured by generating a signature expressed as a binomial variable. The ability to differentiate between the adaptive IgM and natural IgM antibodies allows the detection of the early antigens breast cancer in an anticipated (predictive) manner by means of immunoassay, achieving this recognizing regardless of the immunosuppressive environment.

Results and discussion

The images in Figure 1 of the 2D-immunoblots shows a remarkable variation among the humoral immune response mediated by IgG or IgM in each serum of individual female mice at $t = 0$ and during the 5 weeks of development of breast cancer. The number of antigens recognized by IgM in the first week was very similar that recognized in time 0 (518 and 563, respectively); however, the recognition pattern was different. In the analysis of IgM and IgG response with time, the Σ of IgM spots at $t = 0$ varied from 35 to 98 antigens, with an average of 62.6 and a standard deviation (sd) of 23.5 (Table 1). During the 5 weeks, the IgM response varied on average from 57.6 spots in the first week to 55.8 by the fifth week, with the lowest response (41 spots) in the third week. After challenge with 4 T1 tumor cells, the response IgG was, on average, the highest response at the first week (20.3 spots), but this was decreased with time. It can also be seen that 4 T1 antigen recognition by IgM is presented from week 0 (pre-immune serum), whereas there was no response of IgG (e.g. mice 1 and 2) or almost absent (e.g. mice 4 and 5). At 1 week after implantation of 4 T1 tumor cells, the IgG and IgM responses were still present; however, IgG recognition decays through to 5

weeks of tumor growth, so that the response of IgM is maintained at a higher level than IgG during tumor development. Decrease in the IgG response is possibly due to immunosuppression caused by the development of breast cancer at the time that the 4 T1 tumor cells were implanted [5]. Since the IgM response, also declined slightly in the number of spots with time, immunosuppression would also be affecting it. Decrease in the IgM response could be due to a T-independent immunosuppression, which is based on the existence of T-independent antigens as glycoproteins and glycolipids, which are recognized by natural IgM because they are capable of activating B cells without T cell collaboration [20-22]. Since the volume of serum was low, IgM could not be measured by ELISA because of even though fewer spots, the IgM concentration could be maintained, and then there would not be any immunosuppression.

At time 0, the difference in spots number between the IgG and IgM was clear, with the IgG spots being almost zero, and the IgM spots numerous. The pattern of spots in the IgM response at was highly variable, and there were no 2 similar immunoblots. Identification of 4 T1 antigen by IgM, even before antigenic challenge ($t = 0$), was consistent with an innate humoral recognition mentioned above, nature of this recognition being through structural patterns of Toll-like receptors. Carbohydrates are the main structures recognized, but there are also reports where the natural IgM can recognize the carboxyl terminus of proteins [23]. There were 2 types of IgM found in normal conditions in the circulation in mice. Natural IgM is mainly secreted by B-1a CD5⁺ cells in the apparent absence of antigen stimulation, which constitutes most of the circulating IgM [24], whereas antigen-induced IgM is mostly produced by conventional B (B-2) cells only after antigen stimulation [25]. Thus antibodies detected at time 0 are called natural antibodies. Variability in the IgM response was manifested as a pattern of spots that became a multibinomial variable of 0 and 1, which could represent a signature of the IgM or IgG humoral immune responses (Figure 2); each signature is therefore a measure of this variability. Each mouse has an individual pattern of recognition, in this case to the tumor antigenic background, manifested in tumor size (Table 2). Thus each individual has a unique expression of genetically determined natural IgMs (in number and capacity of recognition). The possibility that this genetic determination does not recognize different tumors and their cells in the same way, or that some individuals recognize some kind of tumor better than others, is being investigated.

The cancer model we used did not allow us to establish a relation between a natural IgM response and resistance to tumor because this model was originally one for studying metastasis. Another type of mouse model, where diverse stages of cancer can develop will allow us to correlate natural IgM response with resistance.

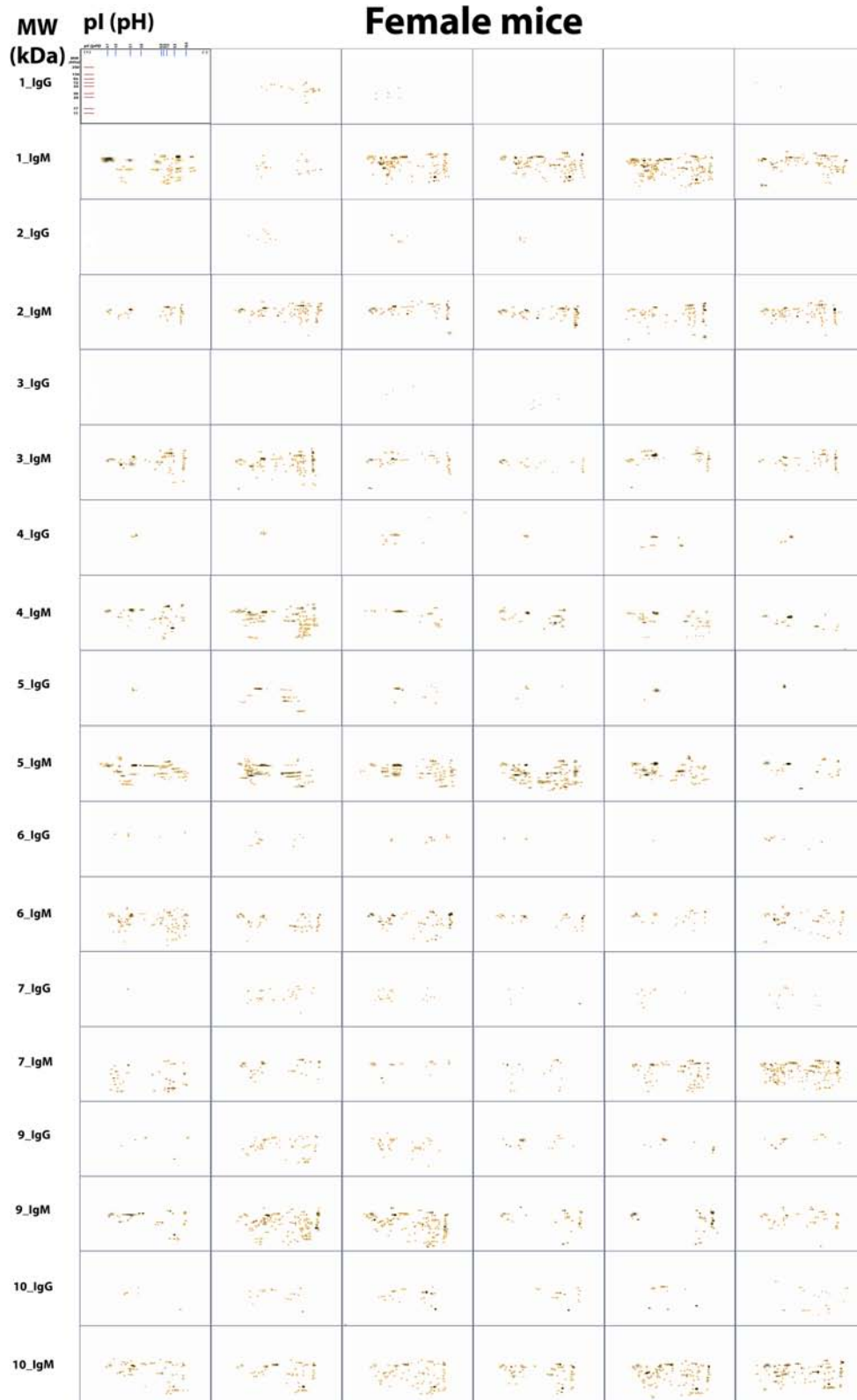


Figure 1 Images of 2D-immunoblot of the immune response mediated by IgG and IgM in female mice analyzed with PdQuest software. Images of T = 0 and w1-5 are shown. Scales of Molecular Weight (Kda) and isoelectric point (pH) are only shown in the images of 2D-immunoblot 1_IgG-T = 0. The red crosses indicate the center of each spot and the yellow circle, their area.

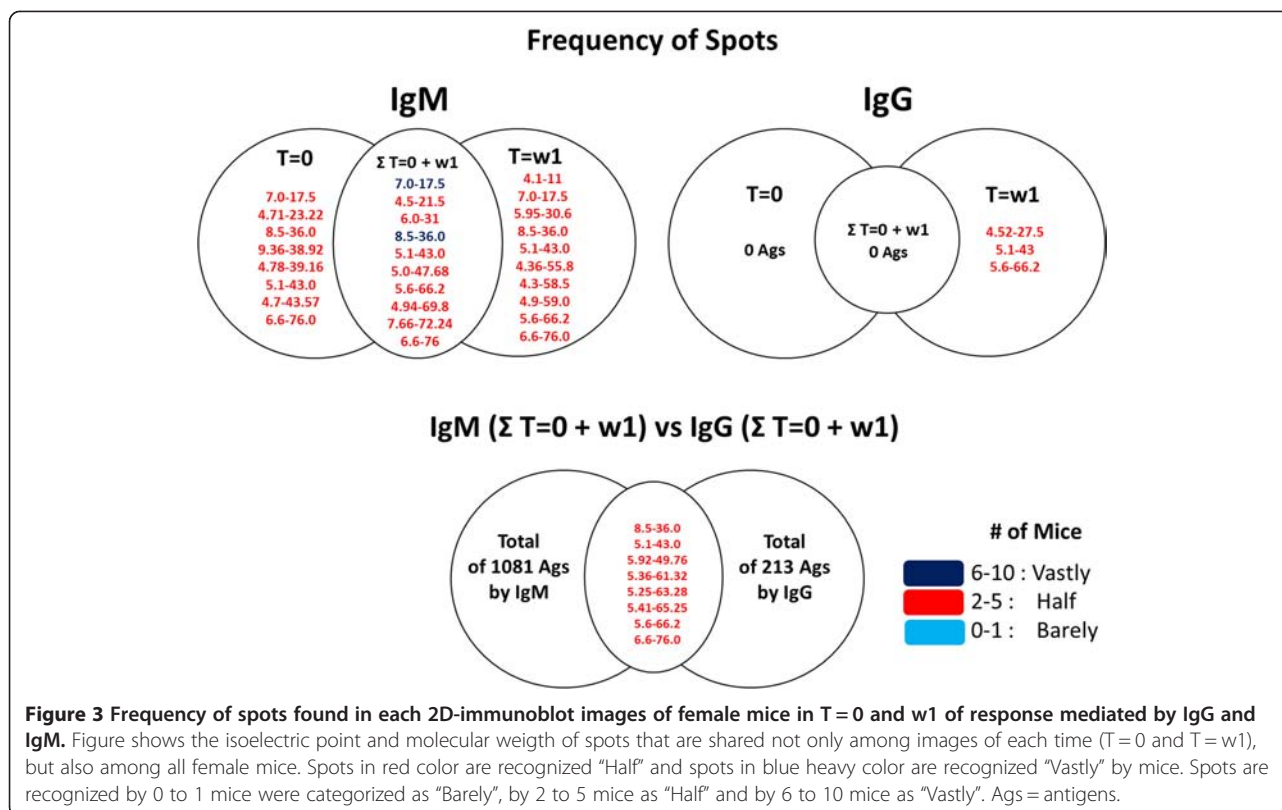
Table 1 Number, sum, average, standard deviation and total of spots found in 2D-immunoblot images of female mice from response mediated by IgG and IgM through the development of breast cancer with 4 T1 tumor cells

N° female mice	Spots IgM						Σ spots IgM T = w1-w 5	TOTAL Σ spots IgM w0 - w5
	w0	w1	w2	w3	w4	w5		
1	86	20	129	83	146	75	453	539
2	39	77	49	49	60	89	324	363
3	65	66	41	18	24	31	180	245
4	45	94	22	24	36	15	191	236
5	98	69	63	91	61	13	297	395
6	89	21	23	23	14	23	104	193
7	45	28	19	14	70	144	275	320
9	35	120	109	17	15	43	304	339
10	61	23	47	46	78	69	263	324
Σ spots by serum	563	518	502	365	504	502	2391	2954
Average	62.6	57.6	55.8	40.6	56.0	55.8	265.7	328.2
SD	23.6	36.4	39.0	29.2	41.4	43.0	100.1	102.5
Spots IgG								
N° female mice	w0	w1	w2	w3	w4	w5	Σ spots IgG T = w1-w 5	TOTAL Σ spots IgG w0-w5
1	0	27	9	0	0	2	38	38
2	0	8	8	5	0	0	21	21
3	0	0	3	5	0	0	8	8
4	4	3	8	2	11	5	29	33
5	4	34	13	2	1	1	51	55
6	7	10	14	5	1	10	40	47
7	2	30	21	5	11	12	79	81
9	6	51	46	15	11	15	138	144
10	7	20	25	17	14	21	97	104
Σ spots by serum	30	183	147	56	49	66	501	531
Average	3.33	20.33	16.33	6.22	5.44	7.33	55.67	59.00
SD	2.96	16.73	13.06	5.85	6.06	7.55	41.53	43.38

The pattern recognition of IgM after inoculation of 4 T1 cells is not only caused by acquired immune response, but by the innate immune response. Some antigens that are recognized in the first week are also recognized by the same female at time 0. It is possible that these antigens in the first week, and sharing IP and MW with time = 0, are a product of an adaptive IgM in response to 4 T1 cells. The number of spots in Table 1 from the first to the fifth week for each mouse is the result of subtracting the antigens recognized at t = 0, which by coincidence were also detected in subsequent times of tumor development by isoelectric point and molecular weight determinations. Hence, in Table 1 the spots exclusively produced by the *innate* immune response (t = 0), separated from the spots produced exclusively by the *acquired* immune response (t = w1-5), antigens that are shared over time, were not considered exclusive. The significant number of antigens was recognized by IgM at the

first week, from which we could use several antigens for early diagnosis because they are the first to be recognized by IgM and IgG immunoglobulins after antigen challenge with 4 T1 tumor cells. However, the antigens that are mainly recognized are the one that overlapped between t = 0 and w1 (Figure 1, Table 1). This overlap in the recognition of antigens between natural and adaptive IgM makes it difficult to use adaptive IgM as a diagnostic character of early immunodiagnostic. This difficulty could be overcome if technically one can distinguish structurally between natural IgM and adaptive IgM.

The number of spots in each 2D-immunoblot by immunoglobulin to the week of tumor development was estimated. Figure 3 gives frequency of spots of most of the antigens recognized, those half recognized and those barely recognized. The sum total of the spots of antigen recognition by natural IgM in the T = 0 was 563, and the frequency of spots for 8 antigens shared by all females



Implantation of tumor cells

BALB/c mice was shaved on the abdomen and injected with 10×10^3 4 T1 tumor cells in 50 μ L isotonic solution subcutaneously in a nipple of a mammary gland. The tumor was allowed to develop and grow for 30 days. Tumor size was measured after removal in 2 perpendicular dimensions with a Vernier caliper. Tumor size in cubic millimeters was calculated by the formula $(a \times b^2)/2$, where b was the smaller dimension of the tumor.

Serum sampling

BALB/c mice were bled by the tail once per week for 6 weeks. The first bleeding was made before implanting 4 T1 tumor cells (time = 0) or pre-immune serum. After implantation of tumor cells, mice were bled and the sera weekly (w1, 2, 3, 4 and 5). Blood was incubated at 4°C for 30 min and centrifuged for storage at -20°C until use.

2D electrophoresis

For immunoblotting, proteins from 4 T1 cells were incubated with Abs from each serum of every mouse at different stages of tumor growth. A volume (100 μ g) of 4 T1 cell proteins in 6 M urea, 50 mM DTT, 2% CHAPS, 2% ampholines pH 3-10 (Bio-Lyte), 0.001% bromophenol blue and MilliQ H₂O up to 125 μ L was used to hydrate the IPG strips (7 cm) in an immobilized pH gradient (pHi 3-10, Bio-Rad). To separate proteins from the 4 T1 cells or

tumors in one dimension (isoelectric point), hydrated strips were placed in the Protean IEF Cell from Bio-Rad reaching a voltage of 4000 and 10,000 V-h, ~6 h.

After separation of proteins by isoelectric focusing, the strips were equilibrated with 2 washes for 10 min, the first in 6 M urea, 0.375 M Tris-HCl, pH8.8, 2% SDS, 20% glycerol, 2% (w / v) DTT, and the second in 6 M urea, 0.375 M Tris-HCl, pH8.8, 2% SDS, 20% glycerol, 2.5% (w / v) iodo-acetamide.

For the separation in a second dimension (2D) for molecular weight, the strip with separated proteins in one dimension was placed on an acrylamide gel (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, 10-20%, Bio-Rad) and electrophoresed in buffer 25 mM Tris pH 8.3, 250 mM glycine, 0.1% SDS, at 100 V for 90 min in a chamber (Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad).

The proteins separated on 2D were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane using a wet transfer chamber (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad) at 100 V, 1 h and 10 min; the buffer was Tris-Glycine-Methanol (25 mM Tris pH 8.3, 250 mM glycine, 20% v/v methanol).

After transfer, the membrane was placed in 20 mL Sensitizer (12 mM HCl) for 5 min, and the solution was removed. It was placed in 20 mL CPTS dye ((Copper(II) phthalocyanine-3,4',4'',4'''-tetrasulfonic acid tetrasodium salt (50 mg in 100 mL 12 mM HCl)), and was stirred strongly for protein staining. The dye was removed and

the membrane washed with Sensitizer before being digitalized with a scanner (HP Scanjet G4050). The stained proteins were removed with Eraser solution (50 mL 0.2 M KCl + 40.8 mL 0.2 M NaOH, pH 12.5).

ImmunoBlot

The nitrocellulose membrane was blocked with 30 mL 5% non-fat dry milk in PBS + Tween 20 (0.03%) at pH 7.4 and stirred overnight at 4°C. The next day the milk was removed and 5 mL skim milk in PBS-Tween and the primary Ab mouse serum (1:250) were placed and stirred for 4 h at room temperature. Four washes each for 10 min each of 20 mL PBS-Tween were used.

Bound antibodies were detected by incubation (1 h at room temperature) with HRP-conjugated secondary antibody (goat anti-IgG or IgM mouse, ZIMED), diluted 1/2500 in PBS-Tween 20. Each was washed 4 times for 10 min with 20 mL PBS-Tween. Detection of second antibody binding was by incubation with DAB substrate (3, 3'-diaminobenzidine; 0.5 mg/mL; 10 min) and 10 µL hydrogen peroxide.

Image processing

From duplicates of the resulting 2D-immunoblot images, a master image was created, which was analyzed by counting the total number of spots (Σ spots) or the number of unique spots per week were counted. Exclusive spots were obtained by subtracting the antigens recognized at $t = 0$, which had coincidence in isoelectric point and molecular weight, and were also detected at subsequent weeks of tumor development. Immunoblots were digitalized using an HP Scanjet G4050 scanner with a resolution level of 300 DPI in a TIFF format. The TIFF images were transformed to the Format 1.sc, required for analysis in PDQuest software (Bio-Rad). The images were transferred to Adobe Photoshop for counting of spots, identification of coordinates of each spot in the 2D-immunoblot, and the calculation of the perimeters of the spots, location of the coordinates and the centroids. All 2D-immunoblots were analyzed at the same settings of brightness, contrast, and color to minimize bias.

Abbreviations

IgG: Immunoglobulin G; IgM: Immunoglobulin M; 2D: Two dimension; DTT: Dithiothreitol; CHAPS: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; SDS: Sodium dodecyl sulfate; HCl: Hydrochloric acid; KCl: Potassium chloride; NaOH: Sodium hydroxide; Σ : Summation; $t = 0$: Time 0.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MDZ carried out aspects of the mouse experiments and 2D Immunoblots, reviewed the manuscript its scientific veracity. RH participated in the execution of the mouse studies and participated in all experiments. POS conceived, designed and analyzed the collective results of all the experiments, and wrote the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

MDZ has a Doctoral fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. RH is a Master of Science and has an academic position at the Instituto de Investigaciones Biomédicas. POS is a PhD in Biochemistry and is a Researcher at the Instituto de Investigaciones Biomédicas. All work at the Universidad Nacional Autónoma de México.

Acknowledgements

Financial support was provided by Grant # 151747 (Pedro Ostoa-Saloma) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México and #IN204311-3 (Pedro Ostoa Saloma) from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT), DGAPA Universidad Nacional Autónoma de México. This paper is in partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM). M. Díaz-Zaragoza acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT), and UNAM.

Received: 6 August 2013 Accepted: 24 January 2014

Published: 28 January 2014

References

1. Vollmers HP, Brändlein S: **Natural IgM antibodies: from parias to parvenus.** *Histol Histopathol* 2006, **21**:1355–1366.
2. Dunn GP, et al: **The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.** *Immunity* 2004, **21**:137–14.
3. Llanes-Fernández L, Alvarez-Goyanes RI, Del Arango-Prado MC, Alcocer-González JM, Mojarrieta JC, Pérez XE, López MO, Odio SF, Camacho-Rodríguez R, Guerra-Yi ME, Madrid-Marina V, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C: **Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients.** *Breast* 2006, **15**:482–489.
4. Roberts MM, Bass EM, Wallace IW, Stevenson A: **Local immunoglobulin production in breast cancer.** *Br J Cancer* 1973, **27**:269–275.
5. Tagliaferri M, Cohen I, Tripathy D: **Complementary and alternative medicine in early-stage breast cancer.** *Semin Oncol* 2001, **28**:121–134.
6. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI: **Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4 + CD25+ T cells.** *Blood* 2007, **109**:2058–2065.
7. Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, Martinez-Allo VC, Dergan-Dylon S, Méndez-Huergo SP, Stupirski JC, Mazal D, Osinaga E, Toscano MA, Sundblad V, Rabinovich GA, Salatino M: **Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease.** *Cancer Res* 2013, **73**:1107–1117.
8. Shishido SN, Varahan S, Yuan K, Li X, Fleming SD: **Humoral innate immune response and disease.** *Clin Immunol* 2012, **144**:142–158.
9. Hensel F, Hermann R, Schubert C, Abé N, Schmidt K, Franke A, Shevchenko A, Mann M, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP: **Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis.** *Cancer Res* 1999, **59**:5299–5306.
10. Hensel F, Hermann R, Brändlein S, Krenn V, Schmausser B, Geis S, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP: **Regulation of the new coexpressed CD55 (decay-accelerating factor) receptor on stomach carcinoma cells involved in antibody SC-1-induced apoptosis.** *Lab Invest* 2001, **81**:1553–1563.
11. Glennie MJ, Van de Winkel JG: **Renaissance of cancer therapeutic antibodies.** *Drug Discov Today* 2003, **8**:503–510.
12. Brändlein S, Lorenz J, Ruoff N, Hensel F, Beyer I, Müller J, Neukam K, Illert B, Eck M, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP: **Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients.** *Hum Antibodies* 2002, **11**:107–119.
13. Lloyd KO, Old LJ: **Human monoclonal antibodies to glycolipids and other carbohydrate antigens: dissection of the humoral immune response in cancer patients.** *Cancer Res* 1989, **49**:3445–3451.
14. Egea G, Franci C, Gambus G, Lesuffleur T, Zweibaum A, Real FX: **cis-Golgi resident proteins and O-glycans are abnormally compartmentalized in the RER of colon cancer cells.** *J Cell Sci* 1993, **105**:819–830.
15. Hanisch FG, Stadie TR, Deutzmann F, Katalinic PJ: **MUC1 glycoforms in breast cancer-cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation.** *Eur J Biochem* 1996, **236**:318–327.
16. Turner GA: **N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins.** *Clin Chim Acta* 1992, **208**:149–171.

17. Hensel F, Brandlein S, Eck M, Schmidt K, Krenn V, Kloetzer A, Bachi A, Mann M, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP: **A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody.** *Lab Invest* 2001, **81**:1097–1108.
18. Brändlein S, Pohle T, Ruoff N, Wozniak E, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP: **Natural IgM antibodies and immunosurveillance: mechanisms against epithelial cancer cells in humans.** *Cancer Res* 2003, **63**:7995–8005.
19. Brändlein S, Vollmers HP: **Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity.** *Histol Histopathol* 2004, **19**:897–905.
20. Bachmann MF, Rohrer UH, Kundig TM, Burki K, Hengartner H, Zinkernagel RM: **The influence of antigen organization on B cell responsiveness.** *Science* 1993, **262**:1448–1451.
21. Mond JJ, Vos Q, Lees A, Snapper CM: **T cell independent antigens.** *Curr Opin Immunol* 1995, **7**:349–354.
22. Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ: **B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms.** *Immunol Rev* 2000, **176**:154–170.
23. Sokoloff AV, Bock I, Zhang G, Hoffman S, Dama J, Ludtke JJ, Cooke AM, Wolff JA: **Specific recognition of protein carboxy-terminal sequences by natural IgM antibodies in normal serum.** *Mol Ther* 2001, **3**:821–830.
24. Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S: **Natural autoantibodies.** *Curr Opin Immunol* 1995, **7**:812–818.
25. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Herzenberg LA, Herzenberg LA: **Innate and acquired immunities to influenza virus are provided by distinct B cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:2250–2255.

doi:10.1186/1475-2867-14-9

Cite this article as: Díaz-Zaragoza *et al.*: 2D immunoblots show differential response of mouse IgG and IgM antibodies to antigens of mammary carcinoma 4 T1 cells. *Cancer Cell International* 2014 **14**:9.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



XI.1.2. Comparison patterns of 4 T1 antigens recognized by humoral immune response mediated by IgG and IgM antibodies in female and male mice with breast cancer using 2D-immunoblots.

Immunobiology 220 (2015) 1050–1058



Contents lists available at ScienceDirect

Immunobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/imbio



Comparison patterns of 4 T1 antigens recognized by humoral immune response mediated by IgG and IgM antibodies in female and male mice with breast cancer using 2D-immunoblots



Mariana Díaz-Zaragoza^{a,b}, Ricardo Hernández-Ávila^a, Tzipe Govezensky^a, Luis Mendoza^c, Dulce María Meneses-Ruíz^a, Pedro Ostoa-Saloma^{a,b,*}

^a Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, Mexico

^b Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria México, D.F. 04510, Mexico

^c CompBioLab, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2014

Received in revised form 12 March 2015

Accepted 1 May 2015

Available online 18 May 2015

Keywords:

2D immunoblot

IgM

IgG

4 T1 cells

Breast cancer

Xenoantigens

ABSTRACT

The early detection of cancer is one of the most promising approaches to reduce its growing burden and develop a curative treatment before the tumor is established. The early diagnosis of breast cancer is the most demanding of all tumors, because it is the most common cancer in women worldwide. We have described a new approach to analyze humoral immune reactions against 4 T1 cell antigens in female mice, reporting that the IgG and IgM responses differed and varied over time and between individuals. In this study, we compared and analyzed the detection of tumor antigens with IgG and IgM from the sera of male mice that were injected with 4 T1 cells into the mammary gland nipple in 2D immunoblot images. The variability in IgM and IgG responses in female and male mice with breast cancer at various stages of disease was characterized, and the properties with regard to antigen recognition were correlated statistically with variables that were associated with the individuals and tumors.

The ensuing IgG and IgM responses differed. Only the IgG response decreased over time in female mice – not in male mice. The IgM response was maintained during tumor development in both sexes. Each mouse had a specific pattern of antigen recognition – ie, an immunological signature – represented by a unique set of antigen spots that were recognized by IgM or IgG. These data would support that rationale IgM is a better tool for early diagnosis, because it is not subject to immunosuppression like IgG in female mice with breast cancer.

© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The detection of cancers at the early stages allows a curative treatment to be administered before tumor progression occurs. However, such steps are challenging, which is particularly significant in high-risk populations (Desmetz et al., 2011; Etzioni et al., 2003).

Abbreviations: IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; Ags, antigens; 2D, 2-dimensional; DTT, dithiothreitol; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; SDS, sodium dodecyl sulfate; w0, Week 0; w1–5, Weeks 1–5.

* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, AP 70228, CP. 04510 México, D.F., Mexico. Tel.: +52 55 56223854; fax: +52 55 55503982.

E-mail address: postoa@unam.mx (P. Ostoa-Saloma).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2015.05.012>

0171-2985/© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Diagnoses that are based on symptoms are unacceptable in cancer, because symptoms usually appear when the tumors have progressed severely. This shortcoming has necessitated the early detection of cancer in asymptomatic individuals and the development of tumor-specific assays as routine screens. Early diagnosis in patients with breast cancer is paramount, because it is the most commonly diagnosed cancer in women worldwide (Levenson, 2007; Lu et al., 2008).

Monitoring cancer-related autoantibodies is valuable in the early detection of breast cancer, because they are observed in the asymptomatic stages of cancer – up to 5 years before the onset of disease (Anderson et al., 2011; Desmetz et al., 2011; Fernández Madrid, 2005; Tan et al., 2009; Zhong et al., 2008). Autoantibodies are prevalent in human sera and are part of the normal immune response, one important problem for identifying tumor-related antigens is demonstrating their tumor relevance (Coutinho et al.,

1995; Fernández Madrid, 2005). Furthermore, B cells can produce specific antibodies in large amounts after stimulation by a small amount of tumor antigen. As a result, tumor antigen-specific serum antibodies can be detected at high titer in patients with early stages of cancer (Lu et al., 2008). Natural immunoglobulin M (IgM) has a direct cytotoxic effect on tumor cells, recognizing tumor-modified cell surface antigens that develop during tumorigenesis and activating complement to destroy nascent transformed cells or induce their apoptosis (Brändlein et al., 2003; Manson et al., 2005; Shishido et al., 2012). Thus, IgM should be considered in developing a tool for early diagnosis before the tumor has been established, because it is the first immunoglobulin that detects early tumor antigens.

Although mammography is recommended as a routine screen for breast cancer, it is insufficiently sensitive to detect the initial stages of cellular transformation, suggesting that new diagnostic tests are needed to complement mammography to differentiate early-stage cancer from benign disease.

The 4 T1 model closely resembles human breast cancer and is a rigorous model of advanced spontaneous metastatic disease (Hennings et al., 2011; Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001). We have described a new approach to analyze humoral immune reactions against 4 T1 cell antigens in female mice (Díaz-Zaragoza et al., 2014). In this study, we examined tumor antigens by 2-dimensional (2D) immunoblot with antibodies in sera from male and female mice in which 4 T1 cells were injected into the mammary gland nipple. Our aim was to characterize the variability in IgM and IgG humoral immune responses in female and male mice with breast cancer at various stages of disease development and correlate antigen recognition statistically with variables that are associated with individual mice and tumor parameters, adding new information to recently published data.

The IgG response to tumor antigens decreased throughout tumor progression in female but not male mice. The IgM response was constant during tumor development in both sexes. Each mouse had a specific pattern of antigen recognition – ie, an immunological signature – represented by varying numbers of IgM- or IgG-recognized spots.

Materials and methods

Tumor cell line

The 4 T1 mouse tumor cell line (ATCC® CRL-2539; a gift from Dr. Karen Manucharyan) was cultured in RPMI 1640, supplemented with 10% fetal bovine serum and 1X antibiotic–antimycotic mixture of streptomycin and ampicillin (all from GIBCO), in 25-cm² culture dishes (Corning) and incubated at 37 °C in air plus 5% CO₂. After nearly reaching total confluence, the cells were washed 3 times with phosphate-buffered saline, pH 7.4; collected by scraping; and used for tumor implantation and protein extraction.

Mice and implantation of tumor cells

Ten 8-week-old male BALB/c AnN mice were kept in the animal facilities at Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, with food and water ad libitum. All experiments were carried out per the animal welfare ordinance and approved by the Code of Ethics for Academic Staff of the Institute: (<http://www.biomedicas.unam.mx/administracion/unidades.apoyo.inst/bioterio.html>).

The abdomen of BALB/c mice was shaved, and we injected with 10⁴ 4 T1 tumor cells in 50 μL isotonic solution into the mammary gland nipple. The tumors were allowed to develop and grow for 35 days. Tumor size was measured on removal in 2 perpendicular dimensions with a Vernier caliper and calculated as $(a \times b^2)/2$, where *a* and *b* are the larger and smaller dimensions of the tumor.

Sampling of sera

Sera were collected from mice once per week by tail vein puncture. The first sample was taken before the implantation of 4 T1 tumor cells (time = 0) to obtain preimmune sera. After implantation, the mice were bled, and serum samples were for during 5 weeks (w1, 2, 3, 4 and 5). Blood samples were incubated at 4 °C for 30 min and centrifuged. Sera were collected and stored at –20 °C until use.

2D immunoblots

Washed 4 T1 cells were lysed as described (Díaz-Zaragoza et al., 2014). Then, 100 μg of 4 T1 cell extract proteins in 6 M urea, 50 mM DTT, 2% CHAPS, 2% ampholines, pH 3–10 (Bio-Rad), 0.001% Bromophenol blue, and MilliQ H₂O up to 125 μL was applied to IPG strips (7 cm, GE HealthCare) and separated in an immobilized pH gradient from 3 to 7 by isoelectric focusing at 10,000 Vh over 6 h.

Next, the strips were equilibrated sequentially with 2 washes for 10 min with 6 M urea, 0.375 M Tris–HCl, pH 8.8, 2% SDS, 20% glycerol, and 2% (w/v) DTT and 6 M urea, 0.375 M Tris–HCl, pH 8.8, 2% SDS, 20% glycerol, and 2.5% (w/v) iodo-acetamide.

The proteins were separated in the second dimension by SDS-PAGE in 4–20% Mini-PROTEAN TGX Precast Gels (Bio-Rad) at 100 V for 90 min in a chamber (Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad).

After 2D separation, the proteins were transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane at 100 V for 1 h and 10 min in Tris-glycine-methanol (25 mM Tris, pH 8.3, 250 mM glycine, and 20%, v/v methanol), and the membrane was placed in a 20 mL Sensitizer (12 mM HCl) for 5 min. The blots were stained with CPTS dye (copper(II) phthalocyanine-3,4',4''-tetrasulfonic acid tetrasodium salt). After being washed with 12 mM HCl, the blots were digitalized on a scanner (HP Scanjet G4050). The blots were destained with Eraser solution (50 mL 0.2 M KCl + 40.8 mL 0.2 M NaOH, pH 12.5), blocked with 30 mL 5% nonfat dry milk (Svelty Nestle, México) in PBS-Tween 20 (0.03%) at pH 7.4, and stirred overnight at 4 °C.

The blots were incubated with sera from individual mice, diluted 1:250 with PBS-Tween 20, for 4 h at room temperature. After extensive washes, bound antibodies were detected by incubation with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG or goat anti-mouse IgM (ZYMED Mex), diluted 1:2500 in PBS-Tween 20, for 1 h at room temperature. Secondary antibody signals were visualized with DAB (3,3'-diaminobenzidine; 0.5 mg/mL). At least 2 immunoblots were run per serum sample.

Image processing

The 2D immunoblots were digitalized on an HP Scanjet G4050 scanner with a resolution of 300 DPI in TIFF format. The TIFF images were transformed to 1.sc format, as required for analysis in PDQuest (Bio-Rad). Master images were created from the duplicates of the 2D immunoblot images. Using PDQuest, the coordinates of each spot and the numbers of spots on the 2D immunoblots were determined. The images were transferred to Adobe Photoshop to match them according to molecular weight markers and specific spots on all 2D immunoblots. All 2D immunoblots were analyzed using the same settings for brightness, contrast, and color to minimize bias.

The 2D immunoblot images were analyzed by counting the total numbers of spots and the numbers of unique spots for each serum sample. Only spots that were not recognized on the immunoblots by the corresponding preimmune (*t* = 0) serum were taken into account.

Clustering

The 2D immunoblot images were analyzed per previous reports (Díaz-Zaragoza et al., 2014; Ostoa-Saloma et al., 2009). Briefly, once the coordinates of the spots were calculated within each 2D immunoblot image, the images were divided into 10 columns (pHi) \times 10 rows (Mw, kDa). In each grid, matrices were established, assigning a score of 0 if there was no spot in the cell and 1 if there was one or more spots.

The matrix was converted into a vector by placing the n -th row immediately after its predecessor. Thus, instead of a 10×10 matrix, a vector was generated with 100 places that containing values of 0 and 1. This vector was used as the input for a python script to perform complete linkage clustering with the hcluster package (<https://pypi.python.org/pypi/hcluster/0.2.0>). For this analysis, we chose the city block metric, in which the distance between 2 points is the sum of the absolute differences in their Cartesian coordinates. The resulting hierarchical clustering is presented as a dendrogram.

Statistics

Two-way ANOVA was used to analyze the total number of spots, and t -test was used to compare tumor sizes. The link between time and the average number of spots was analyzed by Spearman correlation. Linear regression was performed to analyze the existence or lack of correlation between tumor volume and the number of spots. All statistical analyses were performed using SAS 9.0. The P -value to determine the significance in this study was $P=0.1$ (See Note¹).

Results and discussion

We have described a new approach to analyze humoral immune reactions against 4 T1 cell antigens in female mice, reporting that the IgG and IgM responses differed and varied over time and between individuals (Díaz-Zaragoza et al., 2014).

In the present study, we analyzed and compared the antigen recognition patterns by IgG and IgM in the serum from 4 T1 cell-implanted male and female mice on 2D immunoblots, correlating the number of antigens that was recognized by IgG and IgM at various times during tumor development and the spatial distribution of spots in the images with gender and tumor size.

As shown in Fig. 1, the recognition of 4 T1 cell antigens by IgG or IgM varied widely in sera from individual male mice from time 0 (preimmune serum) to 5 weeks (w1–5) of breast cancer development. Also, IgM present more spots in comparison to the IgG images.

To quantify the differences in the recognition of 4 T1 cell antigens, the number of spots in each 2D immunoblot was counted (Table 1) confirming the differences between immunoglobulin isotypes statistically. There was greater recognition of antigens by IgM (Total Σ Spots IgM w0–w5 = 4147) than by IgG (Total Σ Spots IgG w0–w5 = 678) ($P=0.003$). The average number of antigens that were recognized by IgM in the first week (w1) was lower than

at time 0 (58.6 ± 39.8 and 86.1 ± 46.6 , respectively, $P=0.096$, $N=9$, mean \pm SD). In contrast, the average number of antigens that were recognized by IgG in w1 and at time 0 were similar (9.89 ± 7.75 and 13.11 ± 9.64 , respectively, $P=0.314$, $N=9$), but the pattern of distribution and recognition of antigens differed.

We compared our results on male mice with earlier findings in female mice (Díaz-Zaragoza et al., 2014). Based on the number of total spots, the IgM response was significantly greater than the IgG reaction in male and female mice (460.8 ± 271.0 and 75.33 ± 58.25 , $P<0.0001$, $N=9$) (Fig. 2). But, the IgM response was similar in both genders, as was the IgG reaction.

The number of spots that were recognized by adaptive IgM in male mice increased as the tumor developed ($r_{Sp}=0.90$, $P=0.037$). In contrast, this response remained constant in female mice (Fig. 3a), suggesting that the adaptive IgM response is not immunosuppressed in female or male mice.

With regard to IgG antigen recognition in female mice, the number of spots declined over time ($r_{Sp}=-0.70$, $P=0.049$), reflecting IgG immunosuppression throughout the development of the tumor, consistent with previous reports on the immunosuppression of IgG in women and in female mice during breast cancer progression (Roberts et al., 1973). Yet, in male mice, antigen recognition by IgG rose significantly during tumor growth ($r_{Sp}=0.89$, $P=0.041$) (Fig. 3b).

We did not observe immunosuppression of IgM and IgG responses in male mice with breast cancer, likely because they were raising an immune response against 4 T1 cell antigens of female origin proper, in addition to antigens that were related to tumor development (Yoshimura et al., 2001). Male mice possibly recognized 4 T1 cell antigens of female origin as nonself, triggering IgG and IgM reactions against tumor antigens, increasing antigen recognition over time, in contrast with the responses in females. Male mice could also have perceived 4 T1 antigens to be xenoantigens. Homologous xenoantigens have properties of “non-self” antigens, enabling them to break tolerance (Strioga et al., 2014).

The disparities in antigenic recognition by IgG or IgM during the development of cancer between female and male mice could also be attributed to the effects of sex hormones and differences in how the immune system recognizes 4 T1 antigens in both genders. Under healthy conditions, females have higher IgG and IgM levels and stronger cell-mediated immune responses than males (Cohn, 1979), and their development of antibodies is enhanced in secondary immunity and by estrogens in primary immune responses. Females have superior responses to a variety of antigens (Eidinger and Garrett, 1972), reject allografts more rapidly (Graff et al., 1969), and have relative resistance to the induction of immune tolerance (Dresser, 1962).

Conversely, male mice might develop cancer when implanted with 4 T1 cells due to the presence of androgens. Epidemiological studies have reported that androgens stimulate cell proliferation and promote the development of cancer (Key et al., 2002). Prospective cohort studies also suggest that there the risk of breast cancer is greater with high levels of circulating androgens – directly by increasing cellular growth and proliferation via the androgen receptor or indirectly through their aromatization to estrogens (Campagnoli et al., 2013; Kotsopoulos and Narod, 2012).

Female mice did not experience immunosuppression of IgM during tumor development, likely due to the presence of estrogens, as reported in women, who undergo estradiol-induced upregulation of Ig in vitro on lymphocytes and increased differentiation of IgM-producing cells. This selective effect on IgM synthesis is similar in vitro and in vivo – women of fertile age have higher serum IgM levels than postmenopausal women and men (Paavonen et al., 1981). The female mice in this experiment were at reproductive age – from 8 to 13 weeks.

¹ Note: The reference $\alpha=0.1$ ($P=0.1$) simply means that the probability of rejecting the null hypothesis when in fact this hypothesis is truth (type I error). Since we are conducting our experiments for the first time, and there are few similar experiments in literature, we wanted to control also type II error (not being able to reject the null hypothesis when in fact the alternative hypothesis is the correct one). There is not one value of α that determines statistical significance. Numbers such as 0.10, 0.05 and 0.01 are values commonly used for α ; there is no overriding mathematical theorem that says these are the only levels of significance that we can use. *What Level of Alpha Determines Statistical Significance?* By Courtney Taylor. *Statistics Expert. Commonly Used Values Levels of Significance.* <http://statistics.about.com/od/Inferential-Statistics/a/What-Level-Of-Alpha-determines-Statistical-Significance.htm>.

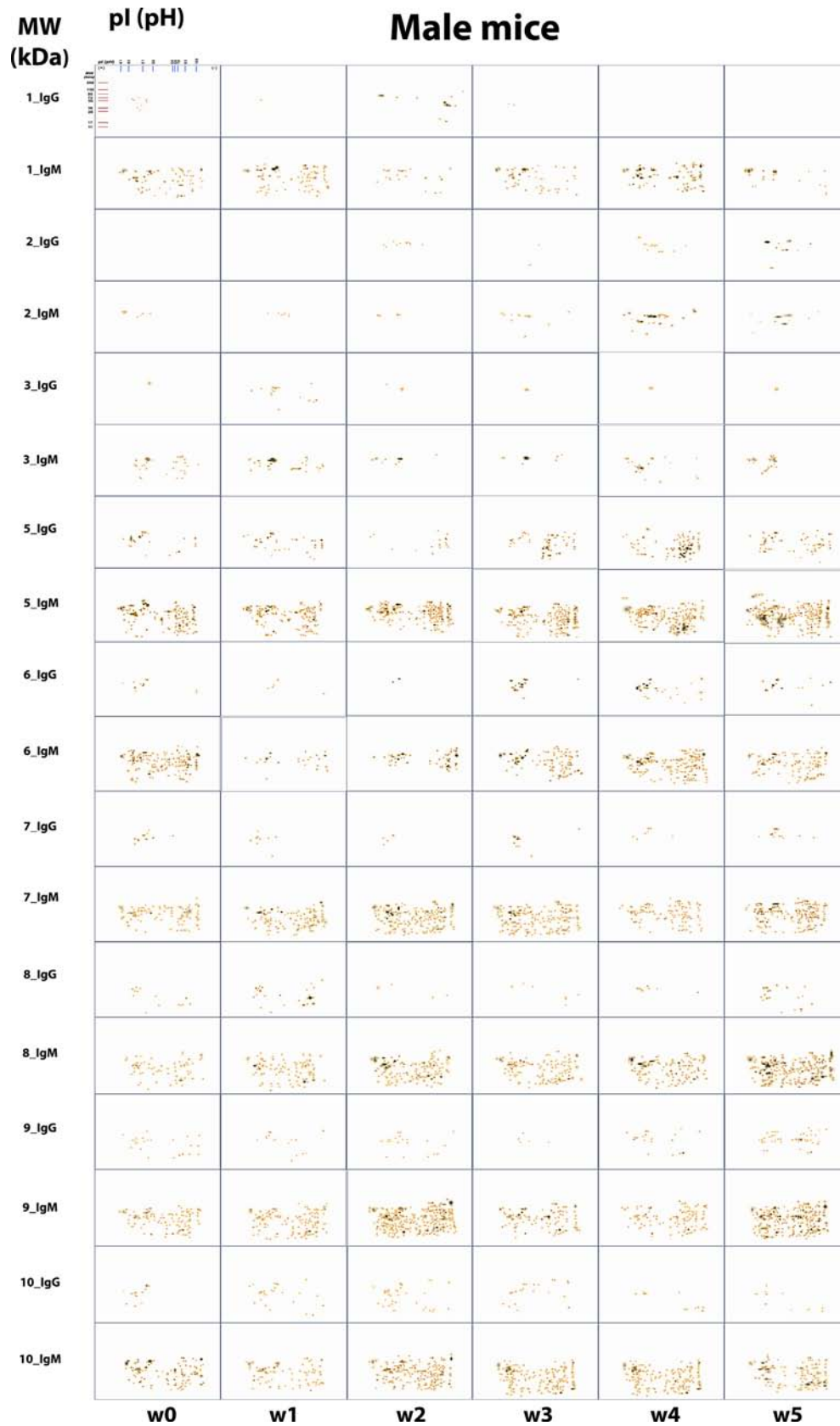


Fig. 1. Images of 2D immunoblots of immune responses mediated by IgG and IgM in male mice analyzed with PDQuest. Images at T=0 and w1–5 are shown. Scales for molecular weight (kDa) and isoelectric point (pH) are only shown for 2D-immunoblot 1.IgG-T=0. The red crosses indicate the center of each spot, and the yellow circle is the area.

Table 1
Number of spots, sum, average, standard deviation, and total number of spots in 2D immunoblot images of male mice from IgG and IgM responses throughout the development of breast cancer with 4 T1 tumor cells.

N° Male mice	w0	w1	w2	w3	w4	w5	\sum Spots IgM T= w1–w5	TOTAL \sum spots IgM w0–w5
Spots IgM								
1	66	55	21	17	68	19	180	246
2	14	4	10	12	35	12	73	87
3	33	28	5	7	24	26	90	123
4	147	122	131	124	156	174	707	854
5	150	7	15	49	88	55	214	364
6	98	77	142	121	69	129	538	636
7	63	58	104	93	91	171	517	580
9	102	87	222	67	72	184	632	734
10	102	89	44	114	110	64	421	523
\sum spots by serum	775	527	694	604	713	834	3372	4147
Average	86.1	58.6	77.1	67.1	79.2	92.7	374.7	460.8
SD	46.6	39.8	76.4	48.1	39.3	71.6	240.2	271.0
Spots IgG								
1	9	0	13	2	0	0	16	24
2	0	0	12	3	15	12	42	42
3	2	17	6	4	3	6	39	38
4	30	21	11	42	64	50	253	218
5	12	4	2	12	24	15	71	69
6	12	7	5	9	6	10	50	49
7	14	14	3	5	6	14	70	56
9	25	9	12	1	13	36	108	96
10	14	17	27	12	8	8	99	86
\sum spots by serum	118	89	91	90	139	151	748	678
Average	13.11	9.89	10.11	10.0	15.4	16.78	83.11	75.33
SD	9.64	7.75	7.59	12.69	19.57	15.92	70.08	58.25

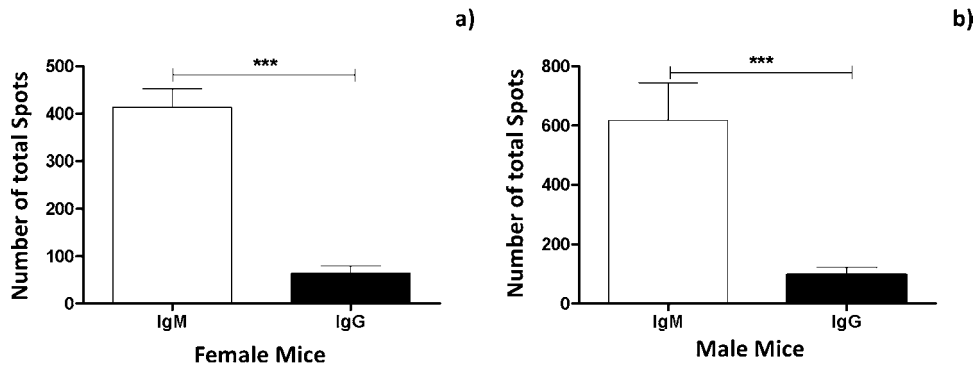


Fig. 2. Total numbers of spots in female mice (a) and males (b) in the recognition of 4 T1 cells by IgG and IgM.

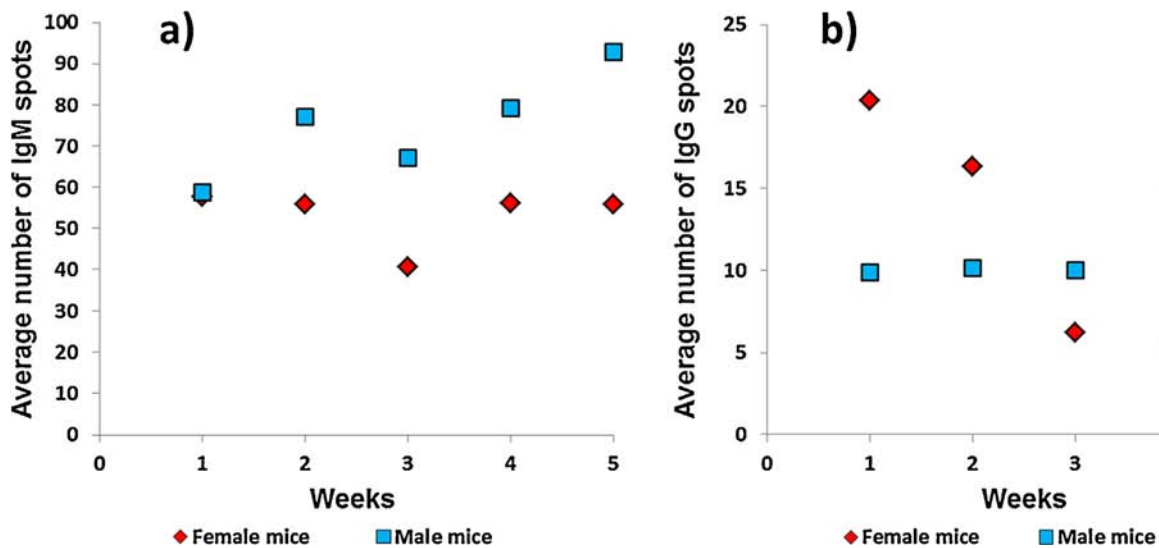


Fig. 3. Average number of spots at various weeks of tumor growth (Weeks 1–5) in female and male mice for IgM (a) and IgG (b).

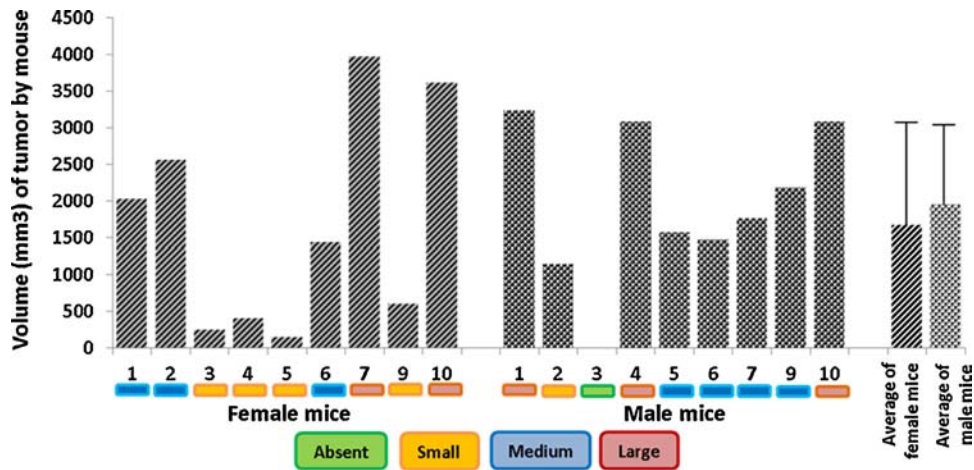


Fig. 4. Tumor size in cubic millimeters in each female (Díaz-Zaragoza et al., 2014) and male mouse and its classification (absent, small, medium, and large).

Fig. 4 shows the tumor sizes in each of the male mice in centimeters and volume, demonstrating that males developed tumors after the implantation of 4 T1 cells. No significant differences in tumor size were observed between male and female mice.

Fig. 5 shows the scatterplots of tumor volume (mm³) in each female and male mouse versus the number of spots in the 2D immunoblot images of the IgG and IgM responses during tumor development. Only time points with significant changes are shown. IgG responses did not correlated with tumor size. IgM responses in

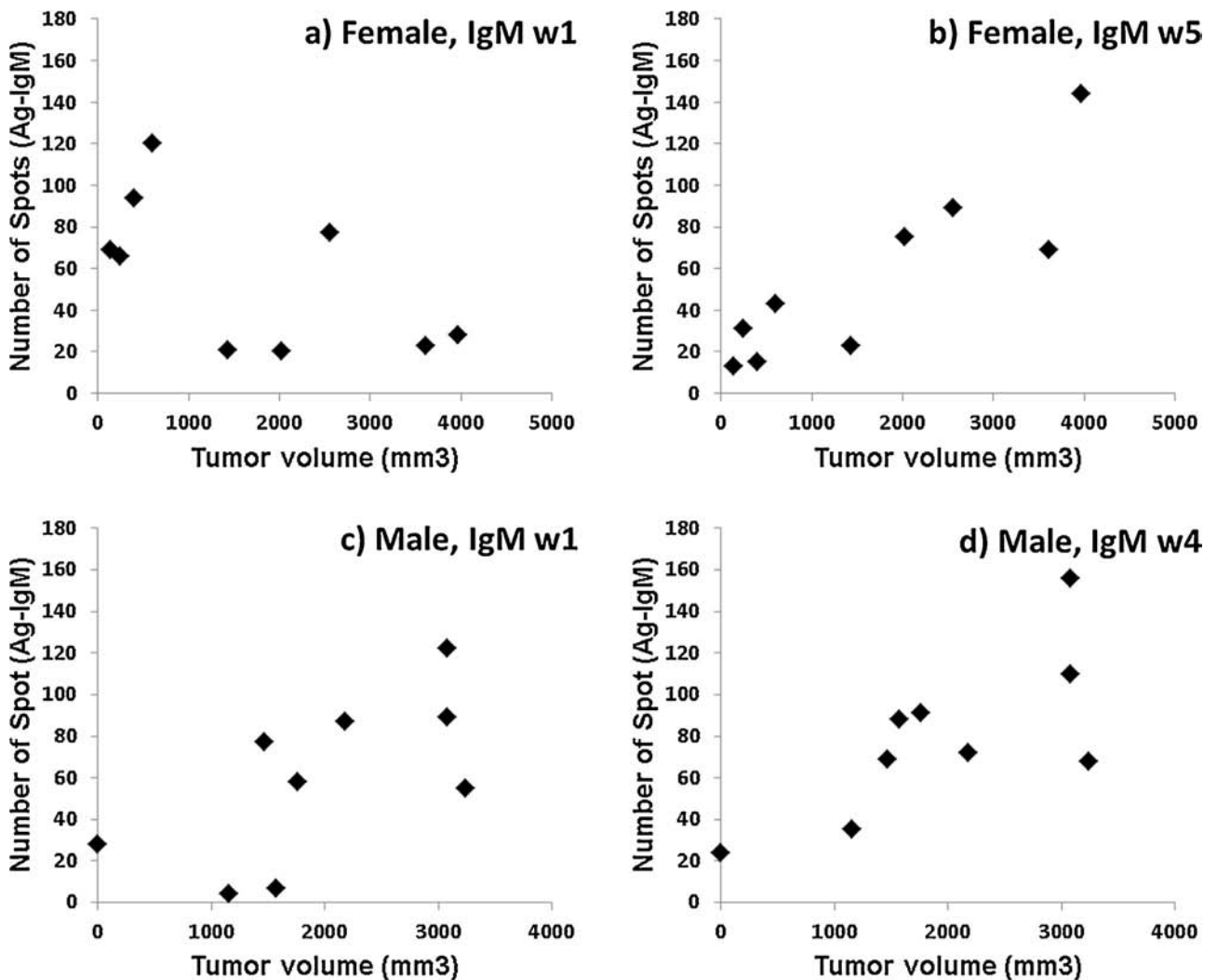


Fig. 5. Tumor size versus number of spots in each female mouse at Week 1 (a) and Week 5 (b) and in male mice at Weeks 1 (c) and 4 (d).

The dendrogram in Fig. 8 shows the clustering of mice by immunoglobulin isotype against 4 T1 antigens. The immune signatures allowed us to group individuals by recognition pattern by IgG or IgM. Antigenic recognition by IgG and IgM in female mice fell primarily into 2 clades, except for F1_G to F7_G and F9_G to IgG, which were pooled into the IgM group. F1_M, F5_M, and F6_M of IgM were grouped in the clade in which most cases are IgG (Fig. 8A). Antigenic recognition by IgG and IgM in male mice was grouped into 2 clades – 1 that comprised exclusively IgM immunological signatures and has another that contained all IgG and 3 IgM signatures (M2, M3, and M6).

Thus our results support that IgM can be used as a tool for early diagnosis of breast cancer, because studies about IgG have not demonstrated that this immunoglobulin is efficient as diagnostic tool. Further, the pattern recognition of IgM is not subject to hormonal regulation. Also, IgM activity in female and male mice is maintained during the development of breast cancer.

In a future, identifying and proposing some particular spots as antigens expressed during the earliest stage of tumor and distinguish them from those exhibited at the middle and later stages, could be possible.

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MDZ performed aspects of the mouse experiments and 2D immunoblots, analyzed the results of all of the experiments, and wrote the manuscript. RH participated in the mouse studies and participated in all experiments. TG conducted the statistical analysis and reviewed the manuscript. LM developed the python script to elaborate the dendrograms. DMMR to analyze the dendrograms and reviewed the manuscript. POS conceived of designed the study and reviewed the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

Financial support was provided by Grant #151747 (Pedro Ostoa-Saloma) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México and #IN201715 (Pedro Ostoa Saloma) from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT), DGAPA Universidad Nacional Autónoma de México. This paper is partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of National Autonomous University of México (UNAM). M. Díaz-Zaragoza acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACYT) and UNAM. The 4 T1 tumor cell line was a gift from Karen Manucharyan, PhD, Institute of Biomedical Research, UNAM. The authors thank Dr. Pavel Petrosyan for his support with English editing.

References

- Anderson, K.S., Sibani, S., Wallstrom, G., Qiu, J., Mendoza, E.A., Raphael, J., Hainsworth, E., Montor, W.R., Wong, J., Park, J.G., Lokko, N., Logvinenko, T., Ramachandran, N., Godwin, A.K., Engstrom, P., Labaer, J., 2011. A protein microarray signature of autoantibody biomarkers for the early detection of breast cancer. *J. Proteome Res.* 10, 85–96.
- Baumgarth, N., 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 34–46.
- Brändlein, S., Eck, M., Ströbel, P., Wozniak, E., Müller-Hermelink, H.K., Hensel, F., Vollmers, H.P., 2004. PAM-1, a natural human IgM antibody as new tool for detection of breast and prostate precursors. *Hum. Antib.* 13, 97–104.
- Brändlein, S., Pohle, T., Ruoff, N., 2003. Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res.* 63, 7995–8005.
- Campagnoli, C., Pasanis, P., Castellano, I., Abbà, C., Brucato, T., Berrino, F., 2013. Postmenopausal breast cancer, androgens, and aromatase inhibitors. *Breast Cancer Res. Treat.* 139, 1–11.
- Cohn, D.A., 1979. Sensitivity to androgen. A possible factor in sex differences in the immune response. *Clin. Exp. Immunol.* 38, 218–227.
- Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., Avrameas, S., 1995. Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 812–818.
- Desmetz, C., Mange, A., Maudelonde, T., Solassol, J., 2011. Autoantibody signatures: progress and perspectives for early cancer detection. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 2013–2024.
- Díaz-Zaragoza, M., Hernández, R., Ostoa-Saloma, P., 2014. 2D immunoblots show differential response of mouse IgG and IgM antibodies to antigens of mammary carcinoma 4 T1 cells. *Cancer Cell Int.* 14, 9.
- Dresser, D.W., 1962. Specific inhibition of antibody production. I. Protein-over loading paralysis. *Immunology* 5, 161–168.
- Eidinger, D., Garrett, T.J., 1972. Studies of regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *J. Exp. Med.* 136, 1098–1116.
- Etzioni, R., Urban, N., Ramsey, S., McIntosh, M., Schwartz, S., Reid, B., Radich, J., Anderson, G., Hartwell, L., 2003. The case for early detection. *Nat. Rev. Cancer* 3, 243–252.
- Fernández Madrid, F., 2005. Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis. *Cancer Lett.* 230, 187–198.
- Graff, R.J., Lappe, M.A., Snell, G.D., 1969. Influence of the gonads and adrenal glands on the immune response. *Transplantation* 7, 105–111.
- Hennings, L., Artaud, C., Jousheghany, F., Monzavi-Karbassi, B., Pashov, A., Kieber-Emmons, T., 2011. Carbohydrate mimetic peptides augment carbohydrate-reactive immune responses in the absence of immune pathology. *Cancers (Basel)* 3, 4151–4169.
- Key, T., Appleby, P., Barnes, I.R.G., 2002. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 606–616.
- Kotsopoulos, J., Narod, S.A., 2012. Androgens and breast cancer. *Steroids* 77, 1–9.
- Levenson, V.V., 2007. Biomarkers for early detection of breast cancer: what, when, and where? *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 847–856.
- Lu, H., Goodell, V., Disis, M.L., 2008. Humoral immunity directed against tumor-associated antigens as potential biomarkers for the early diagnosis of cancer. *J. Proteome Res.* 7, 1388–1394.
- Madi, A., Hecht, I., Bransburg-Zabary, S., Merbl, Y., Pick, A., Zucker-Toledano, M., Quintana, F.J., Tauber, A.I., Cohen, I.R., Ben-Jacob, E., 2009. Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14484–14489.
- Manson, J.J., Mauri, C., Ehrenstein, M.R., 2005. Natural serum IgM maintains immunological homeostasis and prevents autoimmunity. *Springer Semin. Immunopathol.* 26, 425–432.
- Merbl, Y., Zucker-Toledano, M., Quintana, F.J., Cohen, I.R., 2007. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J. Clin. Investig.* 117, 712–718.
- Nagele, E.P., Han, M., Acharya, N.K., DeMarshall, C., Kosciuk, M.C., Nagele, R.G., 2013. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS ONE* 8, e60726.
- Ostoa-Saloma, P., Esquivel-Velázquez, M., Ostoa-Jacobo, P., Larralde, C., 2009. Strategies of statistical image analysis of 2D immunoblots: the case of IgG response in experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Immunol. Methods* 351, 46–54.
- Paavonen, B.Y.T., Andersson, L.C., Adlercreutz, H., 1981. Regulation of estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in Pokeweed mitogen-stimulated cultures. *J. Exp. Med.* 154, 1935–1945.
- Pulaski, B.A., Ostrand-Rosenberg, S., 2001. Mouse 4 T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.*, Chapter 20, Unit 20.2.
- Roberts, M.M., Bass, E.M., Wallace, I.W., Stevenson, A., 1973. Local immunoglobulin production in breast cancer. *Br. J. Cancer* 27, 269–275.
- Shishido, S.N., Varahan, S., Yuan, K., Li, X., Fleming, S.D., 2012. Humoral innate immune response and disease. *Clin. Immunol.* 144, 142–158.
- Strioga, M.M., Darinskas, A., Pasukoniene, V., Mlynska, A., Ostapenko, V., Schijns, V., 2014. Xenogeneic therapeutic cancer vaccines as breakers of immune tolerance for clinical application: to use or not to use? *Vaccine* 32, 4015–4024.
- Tan, H.T., Low, J., Lim, S.G., Chung, M.C.M., 2009. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *FEBS J.* 276, 6880–6904.
- Vollmers, H.P., Brändlein, S., 2005a. The “early birds”: natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histol. Histopathol.* 20, 927–937.
- Vollmers, H.P., Brändlein, S., 2005b. Death by stress: antibody induced apoptosis. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 27, 185.
- Vollmers, H.P., Brändlein, S., 2009. Natural antibodies and cancer. *New Biotechnol.* 25, 294–298.
- Yoshimura, N., Sawada, T., Furusawa, M., Fuchinoue, S., 2001. Expression of xenotransformed human cancer cells to be susceptible to antibody-mediated cell killing. *Cancer Lett.* 164, 155–160.
- Zhong, L., Ge, K., Zu, J., Zhao, L., Shen, W., Wang, J., Zhang, X., Gao, X., Hu, W., Yen, Y., Kernstine, K.H., 2008. Autoantibodies as potential biomarkers for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 10, R40, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2091>.

Mariana Díaz-Zaragoza has a doctoral fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

Ricardo Hernández-Ávila has a Master of Science and has an academic position at Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Tzipe Govezensky is Professor of Statistics at Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Luis Mendoza is head of Unity of CompBioLab of Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Dulce María Meneses-Ruíz has a PhD in Biomedical Science and a postdoctoral position in the Immunology Laboratory of Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Pedro Ostoa-Saloma has a PhD in Biochemistry and is a researcher at Instituto de Investigaciones Biomédicas. All work was performed at Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City.

XI.1.3. Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer (Review).

ONCOLOGY REPORTS 34: 1106-1114, 2015

Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer (Review)

MARIANA DÍAZ-ZARAGOZA^{1,3}, RICARDO HERNÁNDEZ-ÁVILA¹, RUBÍ VIEDMA-RODRÍGUEZ²,
DIEGO ARENAS-ARANDA^{2*} and PEDRO OSTOA-SALOMA³

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México; ²Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Centro Médico Nacional, Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, 06729 México; ³Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, DF, México

Received February 6, 2015; Accepted May 27, 2015

DOI: 10.3892/or.2015.4095

Abstract. For early detection of cancer, education and screening are important, but the most critical factor is the development of early diagnostic tools. Methods that recognize the warning signs of cancer and take prompt action lead to an early diagnosis; simple tests can identify individuals in a healthy population who have the disease but have not developed symptoms. Early detection of cancer is significant and is one of the most promising approaches by which to reduce the growing cancer burden and guide curative treatment. The early diagnosis of patients with breast cancer is challenging, since it is the most common cancer in women worldwide. Despite the advent of mammography in screening for breast cancer, low-resource, low-cost alternative tools must be implemented to complement mammography findings. IgM is part of the first line of defense of an organism and is responsible for recognizing and eliminating infectious particles and removing transformed cells. Most studies on breast cancer have focused on the development of IgG-like molecules as biomarkers or as a treatment for the advanced stages of cancer, but autoantibodies (IgM) and tumor-associated antigens (proteins or carbohydrates with aberrant structures) have not been examined as early diagnostic tools for breast cancer. The present review summarizes the function of natural and adaptive IgM in eliminating cancer cells in the early stages of pathology and their value as early diagnostic tools. IgM, as a component of the immune system, is being used to identify tumor-associated antigens and tumor-associated carbohydrate antigens.

Correspondence to: Dr Pedro Ostoa-Saloma, Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, DF, México
E-mail: postoa@unam.mx

*In memoriam

Key words: breast cancer, natural IgM, adaptive IgM, TAA, TACA, early diagnosis

Contents

1. Introduction
2. IgM antibodies
3. Immune surveillance: Mechanism to eliminate cancer cells
4. Autoantibodies and tumor-associated antigens in breast cancer
5. IgM antibodies directed against tumor antigens of breast cancer
6. Conclusions

1. Introduction

The detection of tumors at early stages allows curative treatment to be administered before tumor progression occurs (1); consequently, patients live longer and fare better than those with advanced cancer (2,3). The detection of such tumors is challenging, which is particularly significant in the high-risk population, in whom the incidence of disease is higher (1,4). Major components of the early detection of cancer are education and screening, but the most important aspect is the development of early diagnostic tools. Tools that recognize the warning signs of cancer so prompt action can be taken may ensure an early diagnosis, and simple tests can identify individuals in a healthy population who have the disease but have not developed symptoms (5). Diagnoses that are based on symptoms are unacceptable for cancer, as they usually appear when the tumors are sufficiently large in size (6).

An early diagnosis is paramount in breast cancer (BC), since it is the most frequent tumor occurring in women in industrialized and developing nations (2,6). Thus, early detection remains the cornerstone of controlling BC to improve patient outcomes and survival. Breast tumors express aberrant levels of mutated or modified forms of proteins that are associated with malignant growth. These proteins, called tumor-associated antigens (TAAs) and tumor-associated carbohydrate antigens (TACAs), are able to stimulate cellular and humoral immune responses; TAAs are identified by serum antibodies (Abs) of patients (7,8).

The only effective screening method for BC is mammography. Mammography is expensive and is only cost-effective and feasible in developed countries with good health infrastructure. Many low- and middle-income nations must implement low-cost screening, such as clinical breast examination and early diagnostic tools (5,9). Ongoing studies are evaluating inexpensive screening methods that can be implemented and sustained in low-resource settings, based on the detection of antitumor antigens by immunoglobulin M (IgM) Abs in the serum of female mice with BC. In these studies, the patterns of antigen (Ag) recognition by Abs in 2D immunoblots are identified and expressed as immunological signatures, allowing certain patterns to be correlated with resistance or susceptibility (10).

Two types of IgM exist: natural, which is present in an organism without prior antigenic contact and is part of the first-line defense; and adaptive, which develops after antigenic challenge (11). Natural IgM also has a significant function in maintaining tissue homeostasis, promoting the phagocytic clearance of apoptotic cells and preventing infectious and autoimmune diseases (12), and in recognizing and removing precancerous and cancerous cells (13-18).

In the present review, we discuss the function of natural IgM and adaptive IgM in eliminating cancer cells in the early stages of BC and their potential as early diagnostic tools and how, as components of an organism's defense, they can be used to identify TAAs and TACAs.

2. IgM antibodies

IgM, which has μ heavy chains, is the first class of antibody that is synthesized by and appears on the surface of a developing B cell, although many B cells eventually switch to other classes (19). It is also the major class that is secreted into the blood in the early stages of a primary antibody response on initial exposure to an Ag.

IgM is the first line of defense of an organism. In its secreted form, IgM is a pentamer that comprises 5 4-chain units, giving it a total of 10 Ag-binding sites and thus higher valency than the structures of other immunoglobulins (Igs) and allowing it to bind Ags with high avidity (20). Each pentamer contains one copy of another polypeptide chain, called a J (joining) chain (21). IgM regulates B cell development (22), facilitates the clearance of apoptotic cells (23), modulates inflammatory responses (24) and autoimmune diseases (25) and mediates the elimination of cancer cells (13).

The binding of an Ag to a single secreted pentameric IgM molecule initiates the complement system. When the Ag resides on the surface of an invading pathogen, senescent cells, cell debris, or precancerous or cancer cells, this activation marks pathogens and transformed cells for phagocytosis or kills them directly (21).

Natural IgM antibodies. Natural Abs are predominantly IgM and to a lesser extent IgA and IgG (26-28) and are polyreactive and of low affinity (29). Natural IgM circulates in healthy individuals in the absence of exogenous antigenic stimulation or Ag-driven selection (30,31). Natural IgM levels in the serum of newborns and in animals that are grown under sterile conditions on an Ag-free diet do not

differ from those of normal animals (11). Natural IgMs are also in humans (32).

Natural IgM has a significant function in primary defense mechanisms (14,33,34). They participate in the early recognition and elimination of bacterial and viral invaders and altered self-material from an organism, reacting with cell surface receptors and recognizing and removing apoptotic and senescent cells, cell debris and self-Ags (13,33,35-37). Natural IgM auto-Abs help suppress pathogenic IgG auto-Ab responses (38).

Natural IgM is associated with the recognition and removal of precancerous and cancerous cells (13-18). Natural IgM binds preferentially to post-transcriptionally modified cell surface Ags that are tumor-specific, recognizing the conserved structures of carbohydrate epitopes (14,39-42). Carbohydrate epitopes that are recognized by natural IgM are stably expressed in many tumors at various precursor stages. Unlike epitope-based single-peptide chains, glycoepitopes share structural homologies beyond the limits of the protein families; thus, they can crossreact and constitute the preferred targets for natural IgM Abs (35).

Natural IgM is produced by a small subset of B1 cells (CD5⁺) and B cells in the marginal zone (MZ) and do not require affinity maturation to provide early protection (43). B1 cells are B220^{low}IgM^{hi}CD23^{low/-}CD43⁺IgD^{low}, have the characteristics of activated cells, and have greater size and cytoplasmic complexity than B2 cells (44).

Natural IgM Abs are germline-encoded and not affinity-matured. Over 80% of natural IgM Abs are expressed by VH genes of the VH3 family (45) and have low affinity (kDa = 10^{-4} to 10^{-7} mol⁻¹) (46). The strength of the Ag-Ab interaction is enhanced by the potency of IgM in engaging the complement pathway; unlike IgG, a single IgM molecule can bind to C1q and activate the complement cascade (18). Natural IgM is equipped with a λ chain, unlike other Abs (14).

Adaptive IgM antibodies. Adaptive IgM is the first antibody to appear after an immunological challenge, but its production normally falls during the development of the IgG response. Consequently, IgM is generally not considered to have a significant function in long-term immunity, although it is effective in host defense (19,47).

Long-lasting humoral immunity is typically associated with the development of high-affinity Ab and isotype switching (47). For example, IgM that is induced by immunization differs from natural IgM with regard to its structure in the Ag-binding centers, affinity, specificity repertoire and spectrum of functions (11,48). These IgM Abs constitute a small fraction of circulating molecules, are monoreactive, and have higher affinity (10^{-7} to 10^{-11} mol⁻¹), and their variable regions contain point mutations. The half-life of monoreactive IgM is 35 h (45,46).

Adaptive IgM is produced by B2 cells and follicular B cells, which are typical of the adaptive immune response. B2 cells mediate T-dependent reactions of the germinal center (GC) and effect the development of memory cells and high-affinity plasma cells (29). Mature B2 cells produce Ab after being stimulated, expanded, and selected in GCs in the presence of T helper (Th) cells; thus, they are important in the adaptive immune response, representing the first-line defense

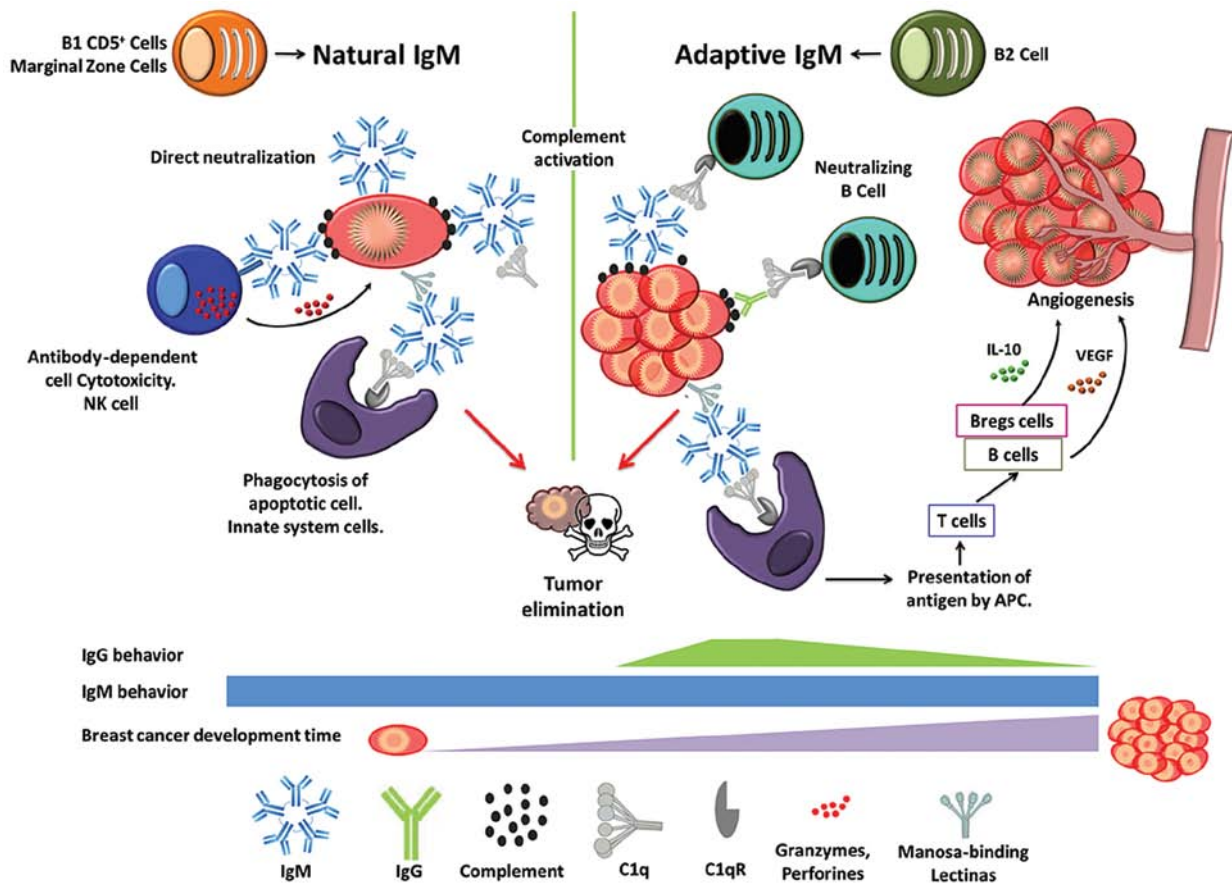


Figure 1. Natural IgM is produced by B1 cells and marginal zone cells, and adaptive IgM is synthesized by B2 cells. Both types of IgM have several functions in the immune response, eliminating tumor cells when they begin to transform (natural IgM) and grow (adaptive IgM). But, when a tumor is established, components of the immune system, such as B cells and adaptive regulatory B cells (Bregs), secrete vascular endothelial growth factor (VEGF) and IL-10, respectively, promoting angiogenesis, inhibiting T cell responses, and accelerating progression, all of which facilitate the spread of neoplastic cells. IgG is present in the early stages of breast cancer but becomes immunosuppressed over time, whereas IgM remains constant.

against most infections and the only form of protection against encapsulated bacteria. The adaptive immune response requires at least 1 week to produce monospecific high-affinity Abs, first generating IgM and then isotype-switching to IgG (49). B2 cells have a B220^{hi}IgM^{int}CD23^{hi}IgD^{hi} phenotype (44).

Fig. 1 shows the various functions of natural and adaptive IgM, as identified in murine models, and how IgM and IgG behave throughout the development of a breast tumor. Natural and adaptive IgM levels are constant from transformation until the tumor is established. Whereas IgG is present only in the initial stages of adaptive immunity, it becomes immunosuppressed when the breast tumor is formed. In innate and adaptive immunity, natural IgM and adaptive IgM, respectively, protect the organism from pathogenic infection, cellular debris, senescence, and transformed cells using many strategies, such as classical complement activation with C1q (50). IgM has been proposed to bind tightly to complement factor C1q (50) and activate the complement cascade (51). It also neutralizes (52-54) and clears apoptotic cells by phagocytosis (55), binding to mannose-binding lectin (MBL), which interacts with apoptotic cells (56), and directs the clearance of immune complexes by binding to the putative Fcα/mR receptor on phagocytes.

Natural and adaptive IgM molecules participate in the recruitment of Ags into secondary lymphoid organs, priming subsequent adaptive immune response (48,57). This mecha-

nism forms the link between the innate and adaptive immune systems. In adaptive immunity, after IgM appears, T and B cells are activated, and adaptive regulatory B cells (Bregs) develop, the immunological mechanisms are damaged, and the relationship between the tumor and immune response shifts toward a state of conditioned immunosuppression (58,59), causing late immune responses to fail to develop strategies that eliminate tumor cells. B cells in the inflammatory infiltrate effect the release of vascular endothelial growth factor (VEGF), promoting angiogenesis and thus accelerating the spread of neoplastic cells through the lymphatics to regional lymph nodes (60). In addition, Bregs produce IL-10, which has suppressive effects on systemic immunity, inhibits T cell responses, and favors the induction of proinflammatory factors and angiogenic molecules (58,61).

3. Immune surveillance: Mechanism to eliminate cancer cells

In 1909, Paul Ehrlich postulated that the immune system not only eliminates pathogenic bacteria but also suppresses the growth of carcinomas with great frequency by generating Abs against malignant cells (35). Fifty years later, Burnet and Thomas revised the topic of natural immune protection against cancer. Burnet proposed that immune tolerance, with regard to

tumor cell-specific neo-Ags, could effect an immunological reaction that prevents the development of cancers, defined as the immune surveillance concept (62,63). Transformed cells are removed by immune surveillance, comprising an immediate immune response that provides Abs against malignant cells and a secondary inherited immune response in which B cells are derived (35,43,64,65). The Ab response is known as the humoral arm of the immune system and is a critical mechanism in the primary and secondary responses against all types of nonself (bacteria, viruses, fungi and cancer) (15).

Innate immunity is the first line of defense and stimulates secondary adaptive immune responses (66), relying on Toll-like receptors (TLRs), which recognize pathogen-associated molecular patterns. These specific patterns are conserved and repetitive structures, such as carbohydrates on glycoproteins and glycolipids (eg, lipopolysaccharides) that are expressed independently of mutational events (67) and detected independently of T cells (35).

4. Autoantibodies and tumor-associated antigens in breast cancer

BC is a heterogeneous disease with tumors that express a variety of aberrant proteins (68). Natural and adaptive IgM can perceive foreign TAAs that undergo post-translational modifications, and natural IgM mediates the destruction of tumor tissues that recognize TAAs (69). The presence of post-translational modifications, such as glycosylation, phosphorylation, oxidation, and proteolysis, can induce immune responses by generating a new epitope, inducing its presentation by major histocompatibility complex (MHC) molecules and stimulating T cell receptors (70,71). Such modified proteins are wrongly localized, mutated, insufficiently folded, or aberrantly expressed and are associated with carcinogenic processes (eg, cell cycle progression, signal transduction, proliferation and apoptosis) (70,71). Cell surface glycans that are secreted into the serum by malignant cells provide a mechanism of tracking tumor burden. Many malignant cells, but not normal cells, overexpress CD20, ECFR and HER2, rendering them commonly used diagnostic markers, but not for early diagnosis (42,72).

Aberrant proteins have been used since the 1970's in serological studies in BC patients that have suggested that some portion of positive sera contains Abs that are directed toward TAAs, but they did not specify the type of Ab. The serum of 28 patients with BC showed positive fluorescence against breast carcinoma cells that were grown by tissue culture, while that of donors was negative (73). In another study, the serum from BC patients was tested for reactivity to a human breast tumor cell line; 45% of patients had complement-fixing Abs compared with 13% that had benign breast disease (74). In contrast, the serum of 55 BC patients of all ages and stages of disease harbored significantly elevated IgA levels and decreased IgG content vs. the control group (75). Ig levels are significantly lower in breast tissue compared with benign tissue, except for adaptive IgM, which is consistently higher in BC tissue of patients with stage I and II disease (76).

There are several blood tests that identify tumor Ags at high levels in patients with metastatic disease, but they are too insensitive for use in the early detection and diagnosis

of BC (68). TAAs have modulate transmembrane signaling, which is required for proliferation, invasion and metastasis of tumor cells (72). Natural and adaptive IgM against TAAs can be measured as an early sign of BC *in vivo* and detect the disease earlier than current methods; furthermore, natural IgM is detected in the asymptomatic stages of cancer, up to 5 years before disease onset (77). Although there are IgG-based diagnostic biomarkers for BC that are under development and although hundreds of self-Ags and TAAs that are recognized by auto-Abs have been identified, no definitive Ab-based serological markers for the early diagnosis of BC exist.

Auto-Abs against TAAs in the serum of BC patients can be easily detected and are inherently stable, persisting in the serum for long periods, since they generally do not undergo proteolysis, as do other polypeptides (71).

5. IgM antibodies directed against breast cancer tumor antigens

Both IgM types must be considered to develop a tool for an early diagnosis once the tumor has been established, since natural and adaptive IgM has direct cytotoxic effects on tumor cells. Certain IgM Abs have been isolated from the tumors of patients, since they eliminate tumors by inducing apoptosis *in vivo* (25,43) through the domain-independent pathway of cell death, binding to surface receptors that induce cell stress (13). Following, we discuss several types of IgM Abs that are used in the diagnosis of BC.

FC-2.15. FC-2.15 is a murine monoclonal IgM Ab that was raised against human BC. FC-2.15 recognizes BC cells and certain normal cells, such as peripheral polymorphonuclear granulocytes (PMNs); specifically, the carbohydrate moiety of certain glycoproteins mediates the *in vitro* lysis of Ag-2.15⁺ cells by human complement. FC-2.15 induces antitumor responses and reversible neutropenia. In an analysis of epitope specificity, FC-2.15 specifically recognized terminally exposed Lewis^x trisaccharide but not sialyl-Lewis^x, Lewis^a, trifucosylated Lewis^y, blood groups Ag A and B, globo H, or gangliosides. Lewis^x in its mostly O-linked is present in BC cells.

In contrast to other monoclonal Abs against carbohydrates, which have affinity constants of 10³ to 10⁵ M⁻¹, FC-2.15 has an affinity constant of 6.9x10⁷ M⁻¹, which might explain its potent effects *in vivo*. The presence of Lex epitopes on BC cells and peripheral PMNs explains the antitumor responses and neutropenia that were observed in a trial of FC-2.15. Neutropenia was inconsequential to the patients, although >90% of PMNs disappeared from the peripheral blood, and the neutropenia resolved rapidly after mAb infusion was halted, with the appearance of juvenile myeloid forms after repeated courses of mAb, as myeloid precursors are not lysed by FC-2.15 (78).

Natural IgM antibody SC-1. The natural IgM Ab SC-1 was isolated from a patient with signet-ring cell carcinoma of the stomach (79). SC-1 binds to a tumor-specific carbohydrate epitope of decay acceleration factor-B (DAF; also called CD55), which is specifically expressed in the membrane of stomach carcinoma cells, and induces apoptosis by crosslinking the receptor *in vitro* and in experimental *in vivo* systems (35,80). The apoptotic effects of two novel sorafenib analogs, SC-1

and SC-43, in eliminating BC cells were examined. Sorafenib, SC-1 and SC-43 induced apoptosis, concurrent with down-regulation of p-STAT3 and its downstream proteins, cyclin D1 and survivin, dose-dependently in BC cell lines (HCC-1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231, MDA-MB-453, SK-BR3 and MCF-7). SC-1 and SC-43 also stimulated apoptosis through SHP-1-dependent STAT3 inactivation and had more potent apoptotic effects than sorafenib in human BC cells (81).

Monoclonal IgM antibody PAM-1. The fully human germline-encoded monoclonal IgM Ab PAM-1 was isolated from a patient with gastric carcinoma. The blockade of growth factor receptors, such as EGFR and FGFR, which are often overexpressed in malignant cells, led to starvation and cell death. PAM-1 binds to CFR-1 (cysteine-rich fibroblast growth factor receptor). The post-transcriptionally modified CFR-1/PAM-1 receptor is expressed in nearly all epithelial cancers of every type and origin and in the precursor stages but not in healthy tissue. The binding of PAM-1 induces apoptotic events *in vitro* and *in vivo* (35,80).

CFR-1/PAM-1 receptor expression in the precancerous stages of BC was analyzed by immunohistochemistry and compared with normal breast tissue and adenocarcinomas. The CFR-1/PAM-1 receptor was expressed in nearly all precancerous stages and carcinomas, whereas normal breast tissue was negative. The unique expression of this CFR-1/PAM-1 receptor renders PAM-1 Ab an ideal diagnostic tool and therapeutic agent for precancerous and cancerous epithelial lesions in BC (16).

Natural IgM antibody SAM-6. The levels of cell surface-associated chaperone GRP78 are high in BC cells. GRP78 is a ubiquitously expressed member of the heat-shock protein 70 (HSP70) family and governs cellular homeostasis by preventing stress-induced apoptosis. In malignant cells, which are permanently exposed to environmental stress, GRP78 is overexpressed, and its levels increase in the cytoplasm and on the cell membrane (41). Thus, GRP78 promotes tumor proliferation, survival, metastases and resistance to many therapies.

The fully human monoclonal IgM Ab SAM-6 binds to a new variant of GRP78, which has a molecular weight of 82 kDa. The epitope is an O-linked carbohydrate moiety that is specific to malignant cells (13). SAM-6 is internalized through endocytosis and mediates the lethal accumulation of oxidized lipoproteins, followed by apoptosis. Modified protective molecules, such as GRP78-SAM-6, are excellent targets for specific Abs that can neutralize the protective effects of tumor cells, disable mechanisms of drug resistance, and directly kill cancer cells by inducing apoptosis (13,41).

SAM-6 induces apoptosis and the accumulation of neutral and polar lipids in tumor cells but not normal cells. The non-physiological intracellular accumulation of neutral lipids, such as triglycerides and cholesterol, is cytotoxic and can lead to lipoptosis (35,65). SAM-6 binds to a cell surface receptor on malignant cells and oxidized low-density lipoprotein (LDL). Shortly after the internalization of Ab/oxidized LDL/receptor complexes and the formation of lipid depots, cytochrome *c* is released by mitochondria and subsequently, the initiators caspase-8 and caspase-9 and effectors caspase-3 and caspase-6 are activated. Thus, SAM-6 induces a near-intrinsic

form of apoptosis by overfeeding malignant cells with lipoproteins (80,82).

Murine monoclonal IgM antibody 3EL.2. Mammary serum Ag (MSA) belongs to the molecular family of breast mucins (MUCs) and is a macromolecular glycolic protein with a molecular weight of >300,000 kDa. MSA is targeted by the murine monoclonal IgM Ab 3EL.2. The diagnostic value of MSA in identifying BC has been studied in 56 healthy patients and 43 subjects with benign BC, in whom this Ag was abnormally elevated. Thus, 3EL.2 is useful in the clinic, is a good indicator of the extent of disease, and might have significant prognostic value (83).

P10s. Abs that recognize such glycosphingolipids (GSLs) as GD2, GM2 and Lewis^y (Le^y) mediate complement-dependent cytotoxicity and have been suggested to be more cytotoxic to tumor cells than Abs that recognize proteins Ag or TACAs (84), which kill tumor cells by Ab-dependent cellular cytotoxicity. Carbohydrate mimetic peptides (CMPs) of TACAs induce IgM that targets TACAs in BC.

Preexisting ganglioside-reactive IgM has been detected in normal healthy individuals. Circulating gangliosides from tumors might be perceived as danger signals by the host's immune system, as evidenced by the endogenous antiganglioside immune response to gangliosides. Then, endogenous IgM against gangliosides might facilitate the elimination of these signals in BC in order to restore the immune competence of the host (69).

P10s-WRYTAPVHLGDG, a CMP that induces primarily weak anti-GD2 IgM responses that are crossreactive with several gangliosides, including GD3, GM2 and GD1a, has been developed. P10s was derived from a sequence (P10-GVVWRY-TAPVHLGDG) that was selected by panning a peptide library against the GD2-binding mAb ME36.1. The P10 peptide mediates antitumor responses (85). This sequence was further optimized by molecular modeling to overlap its binding interface more with the ME36.1 paratope, thus yielding P10s (86).

Anti-mucin IgM. MUCs are highly glycosylated proteins that are expressed in cancers of epithelial origin in an underglycosylated form and have been used to develop several tests for cancer detection. MUCs are components of mammary cell-cell junctions and mediate ICAM-1-initiated signal transduction. Polymorphic epithelial mucin (PEM, or MUC1 with different epitopes: CA 15.3 and CA 27.29) and MUC16 (CA 125) are the most extensively studied MUCs, although the latter is more frequently used for ovarian cancer than for BC.

Recent evidence indicates that MUC-1 Ag induces apoptosis in T-lymphocytes, providing insight into the mechanisms of escape from immune surveillance by tumors (87).

MUC1 was examined to determine the incidence of naturally occurring MUC1 Ab in patients with early BC and correlate these Abs in pretreatment serum to disease outcome. IgG and IgM against MUC1 were measured by ELISA in pretreatment serum samples from 154 patients with BC and 302 controls. A positive test result for both anti-MUC1 IgG and IgM in pretreatment serum was associated with a significant benefit for disease-specific survival in BC patients. Patients with early

BC with a natural humoral response to MUC1 are less likely to develop metastases and have better disease-specific survival. MUC1 Abs may control hematogenic tumor dissemination and outgrowth by aiding in the destruction of circulating or established MUC1-expressing tumor cells (88,89).

MUC1 is a high-molecular-weight molecule with multiple tandem repeats (VTSAPDTRPAPGSTAP-PAHG). The most immunogenic motif is APDTRPA, which harbors the epitope that is recognized by various monoclonal Abs, normal sera and cytotoxic T-cells. Mice that are vaccinated with MUC1 peptide that contains 1.5 tandem repeats and is conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH) and mixed with QS-21 induce high-titer Ab (but no evidence of T-cell immunity) against MUC1 and MUC1-expressing tumor cells. Furthermore, these vaccinations conferred protection to these mice when they were challenged with MUC1-expressing tumor cells (90).

Anti-CEA IgM. Carcinoembryonic Ag (CEA) was described in 1965 and was the first tumor Ag to be identified. CEA is a glycoprotein that belongs to the Ig family of genes and is detected in the serum of cancer patients by radioimmunoassay or ELISA. However, its clinical value is limited due to a high false-positive rate in normal populations and its low diagnostic sensitivity and specificity. Elevated CEA levels are not specific for BC (50% of cases), CEA is expressed in many types of neoplasia and is detected by anti-CEA IgM. Nevertheless, in breast tumors, CEA is more prevalent in ductal versus lobular carcinomas. CEA is found in patients with ductal carcinoma in situ, suggesting that it is an early marker of tumorigenesis (91,92).

I antigen and IgM antibodies. The ABH blood group Ags, which are expressed in normal epithelial cells, are down-regulated in various carcinomas. BC cells produce I Ag or I Ag-like substances that influence serum anti-I. I Ags are precursors to ABH and accumulate in cancer cells. The levels of I Ag rise in the serum of individuals with breast carcinoma, based on their anti-I scores and IgM concentrations. These alterations in cold hemagglutinins could be a host response to the production of I Ag by BC cells and is thus important in understanding immune modulation of breast carcinoma. However, the concentration of IgM in patients with BC was similar to that of controls (93).

Anti-malignin antibodies in serum (AMAS). Malignin is a 10-kDa polypeptide in the cytoplasmic and outer membranes of all malignant cells. Anti-malignin Ab (AMA) is an IgM that is spontaneously produced by the host against the oncoprotein malignin when neoplastic transformation occurs; because AMAs are IgM molecules, they are an indicator of 'early' transformation that is useful for the early detection of cancer.

Elevated AMA serum concentrations have been measured using a commercial reagent. The AMA test has a sensitivity and specificity of 95% on first determination and >99% on repeat measurements and is a promising diagnostic tool for the early detection of cancer, the monitoring of treatment responses, and the screening of asymptomatic populations (94).

In tumor marker assays with AMAs, CEA (CA15-3, CA19-9 and CA125) and biopsies were examined following a suspicious mammogram to determine whether tumor markers

aided in the diagnosis and could be used to monitor residual disease. In the present study, by AMA test, 3 of 154 healthy volunteers were AMA-positive. After further examination, 2 were positive for cancer and 1 had a history of ulcerative colitis. Tumor biopsies of 43 suspicious patients by mammography revealed that 32 were cancerous and 11 were benign by pathology. Furthermore, 31 of 32 cancer patients were positive for AMA versus 4 of 11 pathological benign cases (95).

Sialyl Tn antigen and IgM antibodies. Several structurally similar blood group-related carbohydrate Ags, including Thomsen-Freidenreich (TF), Tn, and sialyl Tn (sTn), that are attached to the protein backbones of glycoproteins are promising targets, based on their widespread distribution on the cell surface of human tumors. The disaccharide sTn [NeuAca (2-6) GalNAca-0-Ser/ Thr] is O-linked with serine and threonine residues on mucins. Greater sTn expression in tumors might be linked to a poorer prognosis in BC. Abnormal glycosylation of tumor cell MUCs results in shorter and fewer carbohydrate chains, increasing the exposure of Ags, such as sTn, which might upregulate sTn in tumors compared with normal cells.

The induction of IgM and IgG against synthetic sTn(c) was measured before and after immunization with clustered sTn-KLH [sTn(c)-KLH] conjugate plus QS-21 in 27 patients with BC, all of whom developed significant IgM and IgG titers against sTn(c). Furthermore, IgM reactivity against LSC tumor cells was observed in patients, indicating the production of IgM and IgG. Thus, immunization with sTn(c)-KLH conjugate plus QS-21 is well tolerated and immunogenic in high-risk patients with BC (96).

IgM and IgG complexes. The occurrence of circulating immune complexes (CICs) is considered a marker of tumor burden. CICs are formed by Abs or Ags with and without complement. CICs that comprise two classes of Ig (Ig-Ig) or an Ig class of and C3 (Ig-C) are collectively referred to as two-component-determined CICs (TCICs). Ig/Ig TCICs may reveal alterations in immune regulation in patients. IgM and IgG TCICs were measured in the sera of patients with BC, in whom IgM/IgG TCICs and IgG/IgM TCICs were detected. Downregulation of IgM/IgG TCICs was a common feature in patients, whereas IgG/IgM TCIC levels were significantly higher, lower, or unchanged with respect to the control. Total serum IgM differed significantly in BC patients (1.20±0.94 mg/ml) vs. healthy controls (0.99±0.53 mg/ml). These results suggested that IgM and IgG TCICs have a significant function in immune regulation during the course of malignancies and are hallmarks of cancer pathogenesis. Decreased IgM/IgG TCIC levels, accompanied by IgG/IgM-TCICs, constitute a peculiar trait in malignancies (97).

6. Conclusions

Certain IgMs, natural and adaptive, have been isolated from the tumors of patients with cancer; they eliminate BC tumors through various mechanisms, such as apoptosis and complement. Natural IgM has a direct cytotoxic effect on tumor cells, it recognizes tumor-modified cell surfaces that develop during tumorigenesis, and it activates complement to destroy nascent transformed cells. The first Ig that is produced after an immune

challenge is adaptive IgM, which must be considered as an early diagnostic tool. Auto-Abs that target TAAs could serve as molecular signatures for the early diagnosis and prognosis of patients with BC by serology to increase the sensitivity and specificity of diagnostic markers for BC patients. Most studies have focused on the development of IgG-like biomarkers for BC treatment; however, IgG is subject to immunoregulation, which can manifest as immunosuppression, whereas natural IgM is not. IgM as a diagnostic tool can be coupled with early mammography, magnetic resonance imaging, or Doppler ultrasound to detect cancer.

Acknowledgements

Financial support was provided by Grants #151747 (P.O.-S.) from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México and #IN201715-3 (P.O.-S.) from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPITT), DGAPA Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). M. Díaz-Zaragoza acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) and the Program in Biological Sciences, UNAM. We thank Jorge Lopez for his support with the writing of this manuscript.

References

1. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G and Hartwell L: The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 3: 243-252, 2003.
2. Levenson VV: Biomarkers for early detection of breast cancer: What, when, and where? *Biochim Biophys Acta* 1770: 847-856, 2007.
3. Panieri E: Breast cancer screening in developing countries. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 26: 283-290, 2012.
4. Desmetz C, Mange A, Maudelonde T and Solassol J: Autoantibody signatures: Progress and perspectives for early cancer detection. *J Cell Mol Med* 15: 2013-2024, 2011.
5. WHO/Early detection of cancer. <http://www.who.int/cancer/detection/en/>.
6. Lu H, Goodell V and Disis ML: Humoral immunity directed against tumor-associated antigens as potential biomarkers for the early diagnosis of cancer. *J Proteome Res* 7: 1388-1394, 2008.
7. Disis ML, Pupa SM, Gralow JR, Dittadi R, Menard S and Cheever MA: High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 15: 3363-3367, 1997.
8. Carter P, Smith L and Ryan M: Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocr Relat Cancer* 11: 659-687, 2004.
9. WHO/Breast cancer: prevention and control. <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>.
10. Díaz-Zaragoza M, Hernández R and Ostoa-Saloma P: 2D immunoblots show differential response of mouse IgG and IgM antibodies to antigens of mammary carcinoma 4 T1 cells. *Cancer Cell Int* 14: 9, 2014.
11. Klimovich VB: IgM and its receptors: Structural and functional aspects. *Biochemistry (Mosc)* 76: 534-549, 2011.
12. Reynolds AE, Kuraoka M and Kelsoe G: Natural IgM is produced by CD5⁺ plasma cells that occupy a distinct survival niche in bone marrow. *J Immunol* 194: 231-242, 2015.
13. Vollmers HP and Brändlein S: Natural antibodies and cancer. *N Biotechnol* 25: 294-298, 2009.
14. Brändlein S, Pohle T, Ruoff N, Wozniak E, Müller-Hermelink HK and Vollmers HP: Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res* 63: 7995-8005, 2003.
15. Vollmers HP and Brändlein S: The 'early birds': Natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histol Histopathol* 20: 927-937, 2005.
16. Brändlein S, Eck M, Ströbel P, Wozniak E, Müller-Hermelink HK, Hensel F and Vollmers HP: PAM-1, a natural human IgM antibody as new tool for detection of breast and prostate precursors. *Hum Antibodies* 13: 97-104, 2004.
17. Vollmers HP and Brändlein S: Death by stress: Natural IgM-induced apoptosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27: 185-191, 2005.
18. Manson JJ, Mauri C and Ehrenstein MR: Natural serum IgM maintains immunological homeostasis and prevents autoimmunity. *Springer Semin Immunopathol* 26: 425-432, 2005.
19. Racine R, McLaughlin M, Jones DD, Wittmer ST, MacNamara KC, Woodland DL and Winslow GM: IgM production by bone marrow plasmablasts contributes to long-term protection against intracellular bacterial infection. *J Immunol* 186: 1011-1021, 2011.
20. Bendtzen K, Hansen MB, Ross C and Svensson M: High-avidity autoantibodies to cytokines. *Immunol Today* 19: 209-211, 1998.
21. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P: *Molecular Biology of the Cell. B Cells and Antibodies*. 4th edition. Garland Science, New York, NY, 2002.
22. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH and Kim CH: Cutting edge: Direct suppression of B cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 175: 4180-4183, 2005.
23. Shaw PX, Hörkkö S, Chang MK, Curtiss LK, Palinski W, Silverman GJ and Witztum JL: Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest* 105: 1731-1740, 2000.
24. Zhang M, Austen WG Jr, Chiu I, Alicot EM, Hung R, Ma M, Verna N, Xu M, Hechtman HB, Moore FD Jr, et al: Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3886-3891, 2004.
25. Ray SK, Putterman C and Diamond B: Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: A paradigm for autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2019-2024, 1996.
26. Casali P and Schettino EW: Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* 210: 167-179, 1996.
27. Coutinho A, Kazatchkine MD and Avrameas S: Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 7: 812-818, 1995.
28. Panda S and Ding JL: Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J Immunol* 194: 13-20, 2015.
29. Lopes-Carvalho T and Kearney JF: Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev* 197: 192-205, 2004.
30. Madi A, Hecht I, Bransburg-Zabary S, Merbl Y, Pick A, Zucker-Toledano M, Quintana FJ, Tauber AI, Cohen IR and Ben-Jacob E: Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 14484-14489, 2009.
31. Merbl Y, Zucker-Toledano M, Quintana FJ and Cohen IR: Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest* 117: 712-718, 2007.
32. Schettino EW, Chai SK, Kasaian MT, Schroeder HW Jr and Casali P: VHDJH gene sequences and antigen reactivity of monoclonal antibodies produced by human B-1 cells: Evidence for somatic selection. *J Immunol* 158: 2477-2489, 1997.
33. Bohn J: Are natural antibodies involved in tumour defence? *Immunol Lett* 69: 317-320, 1999.
34. Boes M: Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 37: 1141-1149, 2000.
35. Vollmers HP and Brändlein S: Natural IgM antibodies: From parias to parvenus. *Histol Histopathol* 21: 1355-1366, 2006.
36. Baumgarth N: The double life of a B-1 cell: Self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 11: 34-46, 2011.
37. Nagele EP, Han M, Acharya NK, DeMarshall C, Kosciuk MC and Nagele RG: Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS One* 8: e60726, 2013.
38. Boes M, Schmidt T, Linkemann K, Beaudette BC, Marshak-Rothstein A and Chen J: Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of self-reactive IgM. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1184-1189, 2000.
39. Hensel F, Brändlein S, Eck M, Schmidt K, Krenn V, Kloetzer A, Bachi A, Mann M, Müller-Hermelink HK and Vollmers HP: A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody. *Lab Invest* 81: 1097-1108, 2001.

40. Hensel F, Hermann R, Schubert C, Abé N, Schmidt K, Franke A, Shevchenko A, Mann M, Müller-Hermelink HK and Vollmers HP: Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis. *Cancer Res* 59: 5299-5306, 1999.
41. Rauschert N, Brändlein S, Holzinger E, Hensel F, Müller-Hermelink H-K and Vollmers HP: A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Lab Invest* 88: 375-386, 2008.
42. Kobata A and Amano J: Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours. *Immunol Cell Biol* 83: 429-439, 2005.
43. Milner ECB, Anolik J, Cappione A and Sanz I: Human innate B cells: A link between host defense and autoimmunity? *Springer Semin Immunopathol* 26: 433-452, 2005.
44. Merino MC and Gruppi A: Origen y desarrollo de linfocitos B1, una población celular involucrada en defensa y autoinmunidad. *Med (Buenos Aires)*: 165-172, 2006.
45. Notkins AL: Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol* 25: 174-179, 2004.
46. Zhou Z-H, Tzioufas AG and Notkins AL: Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *J Autoimmun* 29: 219-228, 2007.
47. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F and Radbruch A: Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 23: 367-386, 2005.
48. Baumgarth N, Chen J, Herman OC, Jager GC and Herzenberg LA: The role of B-1 and B-2 cells in immune protection from influenza virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 252: 163-169, 2000.
49. Carsetti R, Rosado MM and Wardmann H: Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 197: 179-191, 2004.
50. Ogden CA, Kowalewski R, Peng Y, Montenegro V and Elkon KB: IgM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity* 38: 259-264, 2005.
51. Quartier P, Potter PK, Ehrenstein MR, Walport MJ and Botto M: Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *Eur J Immunol* 35: 252-260, 2005.
52. Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H and Zinkernagel RM: Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286: 2156-2159, 1999.
53. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA and Chen J: B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med* 192: 271-280, 2000.
54. Jayasekera JP, Moseman EA and Carroll MC: Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. *J Virol* 81: 3487-3494, 2007.
55. Chen Y, Khanna S, Goodyear CS, Park YB, Raz E, Thiel S, Grönwall C, Vas J, Boyle DL, Corr M, *et al*: Regulation of dendritic cells and macrophages by an anti-apoptotic cell natural antibody that suppresses TLR responses and inhibits inflammatory arthritis. *J Immunol* 183: 1346-1359, 2009.
56. Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha MR, Madsen HO, Borrias-Essers MC, Ryder LP, Koch C and Garred P: Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol* 33: 2853-2863, 2003.
57. Boes M, Esau C, Fischer MB, Schmidt T, Carroll M and Chen J: Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *J Immunol* 160: 4776-4787, 1998.
58. Rodríguez RC and Padilla CR: Compromiso del Sistema Inmune en Pacientes con Cáncer de Mama. *Cancerología* 3: 191-197, 2008 (In Spanish).
59. Zhang X: Regulatory functions of innate-like B cells. *Cell Mol Immunol* 10: 113-121, 2013.
60. Coronella JA, Spier C, Welch M, Trevor KT, Stopeck AT, Villar H and Hersh EM: Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J Immunol* 169: 1829-1836, 2002.
61. Llanes-Fernández L, Alvarez-Goyanes RI, Arango-Prado MC, Alcocer-González JM, Mojarrieta JC, Pérez XE, López MO, Odio SF, Camacho-Rodríguez R, Guerra-Yi ME, *et al*: Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients. *Breast* 15: 482-489, 2006.
62. Burnet FM: Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 7: 3-25, 1971.
63. Dunn GP, Old LJ and Schreiber RD: The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21: 137-148, 2004.
64. Karin M, Lawrence T and Nizet V: Innate immunity gone awry: Linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 124: 823-835, 2006.
65. Vollmers HP and Brändlein S: Natural IgM antibodies: The orphaned molecules in immune surveillance. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 755-765, 2006.
66. Hoebe K, Janssen E and Beutler B: The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 5: 971-974, 2004.
67. Janeway CA Jr: Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54: 1-13 1989; reprinted in *J Immunol* 191: 4475-4487, 2013.
68. Molina R, Barak V, van Dalen A, Duffy MJ, Einarsson R, Gion M, Goike H, Lamerz R, Nap M, Sölétormos G, *et al*: Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biol* 26: 281-293, 2005.
69. Monzavi-Karbassi B, Hennings LJ, Artaud C, Liu T, Jousheghany F, Pashov A, Murali R, Hutchins LF and Kieber-Emmons T: Preclinical studies of carbohydrate mimetic peptide vaccines for breast cancer and melanoma. *Vaccine* 25: 3022-3031, 2007.
70. Anderson KS, Ramachandran N, Wong J, Raphael JV, Hainsworth E, Demirkan G, Cramer D, Aronson D, Hodi FS, Harris L, *et al*: Application of protein microarrays for multiplexed detection of antibodies to tumor antigens in breast cancer. *J Proteome Res* 7: 1490-1499, 2008.
71. Tan HT, Low J, Lim SG and Chung MCM: Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *FEBS J* 276: 6880-6904, 2009.
72. Shishido SN, Varahan S, Yuan K, Li X and Fleming SD: Humoral innate immune response and disease. *Clin Immunol* 144: 142-158, 2012.
73. Priori ES, Seman G, Dmochowski L, Gallager HS and Anderson DE: Immunofluorescence studies on sera of patients with breast carcinoma. *Cancer* 28: 1462-1471, 1971.
74. Chan SP, Maca RD, Levine PH and Ting RC: Immunologic studies of human breast cancer. I. Serum reactivity against a lymphoid cell line (Belev) derived from a breast cancer patient as detected by complement-fixation test. *J Natl Cancer Inst* 47: 511-517, 1971.
75. Roberts MM, Bathgate EM and Stevenson A: Serum immunoglobulin levels in patients with breast cancer. *Cancer* 36: 221-224, 1975.
76. Roberts MM, Bass EM, Wallace IW and Stevenson A: Local immunoglobulin production in breast cancer. *Br J Cancer* 27: 269-275, 1973.
77. Fernández Madrid F: Autoantibodies in breast cancer sera: Candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis. *Cancer Lett* 230: 187-198, 2005.
78. Capurro M, Bover L, Portela P, Livingston P and Mordoh J: FC-2.15, a monoclonal antibody active against human breast cancer, specifically recognizes Lewis(x) hapten. *Cancer Immunol Immunother* 45: 334-339, 1998.
79. Hensel F, Hermann R, Brändlein S, Krenn V, Schmausser B, Geis S, Müller-Hermelink HK and Vollmers HP: Regulation of the new coexpressed CD55 (decay-accelerating factor) receptor on stomach carcinoma cells involved in antibody SC-1-induced apoptosis. *Lab Invest* 81: 1553-1563, 2001.
80. Pohle T, Brändlein S, Ruoff N, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP and Vollmers HP: Lipoptosis: Tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation. *Cancer Res* 64: 3900-3906, 2004.
81. Liu CY, Tseng LM, Su JC, Chang KC, Chu PY, Tai WT, Shiau CW and Chen KF: Novel sorafenib analogues induce apoptosis through SHP-1 dependent STAT3 inactivation in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 15: R63, 2013.
82. Brändlein S, Rauschert N, Rasche L, Dreykluft A, Hensel F, Conzelmann E, Müller-Hermelink HK and Vollmers HP: The human IgM antibody SAM-6 induces tumor-specific apoptosis with oxidized low-density lipoprotein. *Mol Cancer Ther* 6: 326-333, 2007.
83. Verring A, Clouth A, Ziolkowski P and Oremek GM: Clinical usefulness of cancer markers in primary breast cancer. *ISRN Pathol* 2011: 817618, 2011. doi.org/10.5402/2011/817618.
84. Ragupathi G, Liu NX, Musselli C, Powell S, Lloyd K and Livingston PO: Antibodies against tumor cell glycolipids and proteins, but not mucins, mediate complement-dependent cytotoxicity. *J Immunol* 174: 5706-5712, 2005.

85. Wondimu A, Zhang T, Kieber-Emmons T, Gimotty P, Sproesser K, Somasundaram R, Ferrone S, Tsao CY and Herlyn D: Peptides mimicking GD2 ganglioside elicit cellular, humoral and tumor-protective immune responses in mice. *Cancer Immunol Immunother* 57: 1079-1089, 2008.
86. Pashov A, Monzavi-Karbassi B and Kieber-Emmons T: Immune surveillance and immunotherapy: Lessons from carbohydrate mimotopes. *Vaccine* 27: 3405-3415, 2009.
87. Hadden JW: The immunology and immunotherapy of breast cancer: An update. *Int J Immunopharmacol* 21: 79-101, 1999.
88. von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten AA, Kenemans P, Snijdwint FG, Kok A, Van Kamp GJ, Paul MA, Van Diest PJ, Meijer S and Hilgers J: Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J Clin Oncol* 18: 574-583, 2000.
89. Gilewski T, Adluri S, Ragupathi G, Zhang S, Yao TJ, Panageas K, Moynahan M, Houghton A, Norton L and Livingston PO: Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clin Cancer Res* 6: 1693-1701, 2000.
90. Adluri S, Gilewski T, Zhang S, Ramnath V, Ragupathi G and Livingston P: Specificity analysis of sera from breast cancer patients vaccinated with MUC1-KLH plus QS-21. *Br J Cancer* 79: 1806-1812, 1999.
91. Conry RM, Allen KO, Lee S, Moore SE, Shaw DR and LoBuglio AF: Human autoantibodies to carcinoembryonic antigen (CEA) induced by a vaccinia-CEA vaccine. *Clin Cancer Res* 6: 34-41, 2000.
92. Albanopoulos K, Armakolas A, Konstadoulakis MM, Leandros E, Tsiompanou E, Katsaragakis S, Alexiou D and Androulakis G: Prognostic significance of circulating antibodies against carcinoembryonic antigen (anti-CEA) in patients with colon cancer. *Am J Gastroenterol* 95: 1056-1061, 2000.
93. Dube VE, Haid M, Chmiel JS and Anderson B: Serum cold agglutinin and IgM levels in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 4: 105-108, 1984.
94. Botti C, Martinetti A, Nerini-Molteni S and Ferrari L: Anti-malignin antibody evaluation: A possible challenge for cancer management. *Int J Biol Markers* 12: 141-147, 1997.
95. Thornthwaite JT: Anti-malignin antibody in serum and other tumor marker determinations in breast cancer. *Cancer Lett* 148: 39-48, 2000.
96. Gilewski TA, Ragupathi G, Dickler M, Powell S, Bhuta S, Panageas K, Koganty RR, Chin-Eng J, Hudis C, Norton L, *et al*: Immunization of high-risk breast cancer patients with clustered sTn-KLH conjugate plus the immunologic adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res* 13: 2977-2985, 2007.
97. Yang TC, Li H, Huang GN and Wang SY: Detection of IgM and IgG complexes provides new insight into immune regulation of patients with malignancies: A randomized controlled trial. *Int Immunopharmacol* 7: 1433-1441, 2007.