



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

**IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS TEMPRANOS EN TUMORES DE CÁNCER DE
MAMA EN RATONES TRANSGÉNICOS Py VT POR MEDIO DE IgM**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESTEFANÍA DE LA GARZA GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. PEDRO ULISES OSTOA SALOMA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MÉXICO, CDMX, ENERO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

**IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS TEMPRANOS EN TUMORES DE CÁNCER DE
MAMA EN RATONES TRANSGÉNICOS Py VT POR MEDIO DE IgM**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESTEFANÍA DE LA GARZA GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. PEDRO ULISES OSTOA SALOMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.
COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MÉXICO, CDMX, ENERO, 2019

OFICIO CPCB/1184/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora 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 6 de agosto del 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **DE LA GARZA GONZÁLEZ ESTEFANIA** con número de cuenta **307026118** con la tesis titulada **Identificación de antígenos tempranos en tumores de cáncer de mama en ratones transgénicos Py VT por medio de IgM**, realizada bajo la dirección del **DR. PEDRO OSTOA SALOMA**:

Presidente: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
Vocal: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
Secretario: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Suplente: DR. JORGE MORALES MONTOR
Suplente: DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 7 de diciembre del 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por la guía y formación para realizar este proyecto maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo con una beca con un número de registro 774592, que me fue otorgada para llevar acabo mis estudios de maestría.

A mi tutor principal: Pedro Ulises Ostoa Saloma, por incorporarme a la realización y guía de este proyecto, así como proporcionar material y equipo necesario para su elaboración y el apoyo con la revisión del mismo.

A mi Comité Tutorial: al Dr. Luis Felipe Jiménez García y al Dr. Abraham Landa Piedra por apoyo con sus comentarios, sugerencias y enseñanzas a lo largo de la trayectoria del proyecto.

Agradecimientos personales

A la Dra. Mariana Díaz Zaragoza por el apoyo con su orientación teórica y práctica a lo largo de la trayectoria del proyecto, así como sus excelentes observaciones.

Al Técnico Académico Ricardo Hernández por el apoyo con el manejo con los ratones PyVT, así como en la elaboración de los inmunoblots-2D.

Al Dr. Ernesto Armando Rodríguez Reyes en su labor en el proceso de trámite de titulación.

Al Técnico Académico José Rafael Cervantes Roldán por el apoyo en el manejo de la ultracentrífuga y equipo de escaneo de geles.

Al Sr. Osvaldo Martínez Garay por el apoyo con el material utilizado para el proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres por el cariño y apoyo incondicional. A mi mamá Irma, por apoyarme no importando la situación. Por escucharme, por ayudarme en la casa en esta etapa independiente. Te amo mucho mamá. A mi papá Rubén, por apoyarme al igual que mi mamá pese a las circunstancias, así como apoyarme con traerme mis cosas y ayudarme en lo necesario. Te amo mucho papá.

A mi esposo Jonathan, eres testigo de mis desvelos, angustias y cosas bonitas a lo largo de esta trayectoria y no sólo este paso importante, si no también años antes de mi formación como bióloga. Gracias por el apoyo, amor y cariño. Te amo mucho.

A mis hermanas Emma e Irma, por el cariño y apoyo a su forma. Por escucharme por alentarme y los buenos ratos :). Las amo. Así mismo agradezco a Uriel mi cuñado por el apoyo.

A mi abuelita Elena por que fue siempre para mi un ejemplo a seguir, de mujer fuerte y humilde. Te agradezco por siempre.

A mis tíos, tías, primos y primas, por su apoyo y cariño.

A mi amiga Celia, por todo el cariño y apoyo tanto en lo profesional como en lo emocional. Te quiero mucho amiga.

A mi amiga Mariana, por tus apoyos y ánimos, además de ser un pilar fuerte para sobrellevar este proceso, realmente me siento agradecida de haberte conocido :). Te quiero mucho amiga.

A mis amigas Tayde e Ingrid, que aunque casi no nos veamos saben que las estimo mucho :).

A mi amigo Omar, si bien los dos estábamos en el mismo proceso consolándonos las penas de la maestría ¡jaja!. Se te estima mucho.

A mis amigos Winter, Rodrigo y Monse (también incluyo a Celia y a Omar) por las salidas en busca de pokémons ¡jajaja!. Se les quiere.

A mis suegros y cuñados, realmente me siento feliz de ser parte de su familia :). Los quiero mucho.

A Susana por ayudarme en todo el proceso emocional a lo largo de la maestría. Gracias por ayudarme a ver lo que no podía ver.

A mis amigas Fernanda, Luisa, Claudia y Adriana por el cariño. Se les quiere.

De manera general amigos de la facultad, prepa, secundaria y primaria (y hasta kínder) que han sido un apoyo e inspiración.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA	4
LISTA DE FIGURAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
Importancia del Cáncer de Mama a nivel mundial y en México.....	9
Cáncer de mama: Generalidades.....	9
Tipos de Cáncer de mama.....	11
Factores de riesgo que contribuyen a desarrollar cáncer de mama.....	12
Prevención y control de cáncer de mama.....	12
Inmunovigilancia.....	12
Sistema inmune innato y Cáncer de Mama.....	13
Antígenos tumorales y Cáncer de Mama.....	14
Inmunoglobulina M. IgM natural y adaptativa en el reconocimiento de antígenos tumorales.....	14
Antígenos de membrana reconocidos por IgM en tumores de cáncer de mama.....	16
Antígeno “middle T” o MT y su papel en la transformación células tumorales.....	17
ANTECEDENTES	21
Ratones transgénicos PyVT.....	21
OBJETIVO GENERAL	22
Objetivos específicos.....	22
METODOLOGÍA	23
Reproducción de ratones transgénicos.....	23
Identificación de ratones portadores del oncogen.....	23
Obtención de suero.....	24
Extracción de tejido mamario.....	24
Extracción y cuantificación de proteína de membrana.....	24
Hidratación de tiras IPG.....	24
Isoelectroenfoco y equilibrio de tiras IPG.....	24
Electroforesis 2D.....	25
Transferencia membrana de nitrocelulosa.....	25
Western blot.....	25
Análisis de inmunoblots-2D.....	25
RESULTADOS	26
Identificación de ratones portadores, obtención de suero y extracción de tejido mamario.....	26
Cuantificación de proteína de membrana de tejido mamario de ratones hembra PyVT.....	27
Inmunoblots-2D.....	27
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	31
LITERATURA CITADA	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Carcinoma ductal *in situ* (American Cancer Society, 2017)

Figura 2. Estructura de IgM. a) IgM monomérica (mIgM). b) IgM pentamérica (Klimovich, 2011).

Figura 3. Genoma del poliomavirus (aproximadamente 5300 pb). La transcripción temprana de los antígenos T, se encuentra en dirección de las manecillas del reloj: LT: antígeno Large T, MT: antígeno Middle T y ST: antígeno Small T, mientras que la transcripción de las proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3) se encuentra en dirección en contra de las manecillas del reloj. ENH es el enhancer que regula la transcripción y replicación y ORI el origen de replicación (Fluck and Schaffhausen, 2009)

Figura 4. Cascada de señalización: transformación a células tumorales por MT. Sitios de unión para la activación de fosfotirosinas e interacción de proteínas con MT (Fluck and Schaffhausen, 2009).

Figura 5. Esquema resumido de cascada de señalización de unión de proteínas con MT (Fluck and Schaffhausen, 2009).

Figura 6. Identificación de hembras portadoras del oncogen MT y extracción de tejido mamario. a) Carril izquierdo corresponde al DNA de una hembra no portadora de oncogen MT (hembra negativa). Carril derecho corresponde al DNA de una hembra portadora del oncogen MT (hembra positiva). De arriba hacia abajo, primer banda correspondiente al oncogen MT (530 pb), segunda banda corresponde al control β actina (220 pb). b) Ubicación del lado derecho de las mamas del ratón. Círculos en azul muestran las ubicaciones de las mamas torácicas extraídas. Círculos en verde muestran las ubicaciones de las mamas inguinales extraídas.

Figura 7. Curva patrón y tabla para la cuantificación de proteína de membrana de tejido mamario de ratones PyVT.

Figura 8. Membranas con total de proteína e inmunoblots-2D. Las membranas del lado izquierdo muestran en azul los spots del total de proteína de cada grupo de edad. Las membranas del lado derecho son los 2D-inmunoblots, el reconocimiento de IgM a la proteína de membrana de los diferentes grupos de edad.

RESUMEN

Las técnicas o herramientas de detección temprana de cáncer, permiten aumentar la sobrevivencia de pacientes y, por consecuencia, una elección de tratamiento eficaz para combatir este padecimiento; por lo que la investigación dirigida a encontrar formas de detectarlo de forma temprana mantiene gran importancia en cáncer. El cáncer de mama ocupa el primer lugar de los cánceres femeninos a nivel mundial, por lo que su detección temprana adquiere gran relevancia.

Los sistemas inmune innato y adaptativo reconocen y eliminan células cancerígenas. Uno de los componentes del sistema inmune es el humoral, como ejemplo, la Inmunoglobulina M (IgM), la cual se encuentra en su forma innata llamada IgM natural y su forma adaptativa llamada IgM adaptativa. Ambas, por el tipo de características que poseen, tienen el potencial de reconocer antígenos tumorales asociados a cáncer de mama. Tomando en cuenta esto, abre la posibilidad de que IgM reconozca antígenos tumorales que se expresen de manera temprana utilizando el modelo de ratón transgénico PyVT, el cual emula las condiciones de desarrollo de la enfermedad; esto con el fin de encontrar antígenos-anticuerpo candidatos a ser considerados como una herramienta de diagnóstico temprano para cáncer de mama.

En esta tesis se describe el perfil reconocimiento de IgM (natural y adaptativa) a antígenos expresados en membrana procedentes de tejido mamario de ratones hembra transgénicos PyVT de la semana 5 y 6 de edad (considerada una etapa crucial de posible expresión de antígenos tumorales tempranos), utilizando 2D-inmunoblots. Los resultados muestran que no hay diferencias entre grupos de edad e individuos, además, un espectro de variabilidad de reconocimiento muy reducido, de tan sólo una reacción antígeno-anticuerpo. Datos no publicados de una hembra de 7 semanas de edad abren la posibilidad de encontrar posibles antígenos-anticuerpo candidatos a ser considerados como herramienta de diagnóstico temprano en cáncer de mama.

ABSTRACT

The early detection techniques or tools of cancer allow increase the survival rate of patients and thus an effective treatment choice to combat the disease; consequently the research aimed to find ways to early detect keeps great importance in cancer. Breast Cancer holds the first place of the female cancers globally, their early detection acquires great relevance.

The innate and adaptive immune system recognizes and eliminates cancer cells. One of the compounds of the immune systems is the humoral, as an example, the Immunoglobulin M (IgM), which it find in their innate form called natural IgM and their adaptive form called adaptive IgM. Both, by the type of the features they possess, they have the potential to recognize breast cancer tumor-associated antigens. Taking into account this, open the possibility that IgM recognize tumoral antigens which are expressed early way, using the model transgenic mouse Py VT, which emulates the development conditions of the disease; in order to find antigens-antibodies candidate to be considered as an early diagnostic tool for breast cancer.

This thesis describes the recognition profile of IgM (natural and adaptive) against membrane antigens expressed coming from mammary tissue of transgenic mice PyVT of five and six weeks old (considered a crucial stage for possible expression of early tumoral antigens), using 2D-immunoblots. The results show there is no differences between age and individual groups, moreover, variability recognition range very poor, of only one reaction antigen-antibody. Unpublished data about a mouse of seven weeks old, open the possibility to find potential candidate antigen-antibodies to be considered as an early diagnostic tool for breast cancer.

INTRODUCCIÓN

Importancia del Cáncer de Mama a nivel mundial y en México

De acuerdo con la OMS en 2012, el cáncer de mama (CaMa) ocupa el primer lugar de los cánceres femeninos a nivel mundial (OMS, 2015). De un millón de casos de cánceres nuevos reportados en la mujer, CaMa ocupa un 18% de los casos (Han *et al.*, 2013). Existe una mayor incidencia de casos por CaMa en países desarrollados que en países en desarrollo y también se destaca una notable diferencia respecto a la tasa de sobrevivencia tomando en cuenta los primeros 5 años de la enfermedad, ya que en países desarrollados la tasa es de un 80% a diferencia de países en desarrollo, la cual es de un 40% (Coleman *et al.*, 2008; Akram *et al.*, 2017). Esta notable diferencia, se debe en gran parte al recurso e infraestructura destinada al mejoramiento de las condiciones de sus sistemas de salud para el diagnóstico oportuno y tratamiento de la enfermedad (Anderson *et al.*, 2008; Akram *et al.*, 2017; INEGI, 2016).

En el caso de México, en 2014 del total de casos de cáncer, 2 de 10 son de CaMa y 3 de cada 10 mujeres con CaMa, llegan a tener un tumor avanzado. En promedio hay 15.24 defunciones por cada 100 mil mujeres, posicionándose en segundo lugar debajo de tumores malignos de cáncer digestivo. CaMa es el tipo de cáncer femenino cuyas tasas de morbilidad muestran los mayores incrementos con la edad, ya que de un 7.43 de un grupo de mujeres de 20 a 29 años de edad (por cada 100 mil mujeres del grupo) llega a un 218.24 del grupo de 60 a 64 años de edad. En promedio cada 2 horas muere una mujer por causa de esta enfermedad (INEGI - CONAPO, 2016; INEGI, 2016, 2017).

La autoexploración, la exploración clínica, ultrasonidos y mamografías o mastografías, son las herramientas más utilizadas en la detección de CaMa en México. Durante tres décadas en México la prueba de detección principal de CaMa en sector de Salud Pública ha sido la mastografía; sin embargo, de acuerdo a datos de la Dirección General de Información en Salud (DGIS), dependencia de la Secretaría de Salud, en 2014 se registraron alrededor de 689 mastógrafos a nivel nacional en instituciones públicas de la salud (INEGI, 2016, 2017), así mismo aunque se le ha dado la suficiente difusión a campañas de salud de prevención y control de la enfermedad, la detección temprana de la enfermedad ha sido un reto, ya que tan sólo del 5 al 10% de los casos en México son detectados de forma temprana y aproximadamente el 90% de los casos se detectan en fases tardías (fase III y IV), a diferencia en EUA el 60% y Reino Unido el 79% de los casos se detectan de forma temprana (Knaul *et al.*, 2009; Díaz-Zaragoza, 2015; ACS, 2008; INSP, 2011; NCIN, 2016; CNGESSR [SSA], 2014; Martínez *et al.*, 2009).

Cáncer de Mama: Generalidades

El CaMa es una neoplasia que puede originarse en distintos sitios de las mamas, en la mayoría de los casos se originan en los ductos que transportan la leche o conductos lactíferos (cánceres ductales) y también se puede originar en las glándulas de producción de leche (cánceres lobulillares). En un menor porcentaje se pueden originar cánceres que comienzan en otros tejidos de las mamas, los cuales se denominan sarcomas y linfomas, los cuales no son considerados dentro de los cánceres de mama. La mayoría de los cánceres de mama son carcinomas, el cual es un tipo de cáncer que comienza en las células epiteliales que revisten los diferentes tejidos de la mama, un ejemplo, es el adenocarcinoma, el cual se genera a partir del tejido glandular (American Cancer Society, 2017; Cárdenas *et al.* 2013).

CaMa puede propagarse a través del sistema linfático por medio de ganglios, vasos y líquido linfático, considerando esto, de manera general, los carcinomas se dividen en dos tipos: CaMa no invasivo e invasivo. CaMa no invasivo es aquel que permanece dentro de los lóbulos o conductos que transportan la leche, como por ejemplo, el Carcinoma Ductal *In Situ* (**Fig. 1**), el cual aparece cuando células anormales se desarrollan entre los conductos mamarios, sin embargo no se propaga a otro tejido próximo. *In situ* es una expresión latina que significa “en el lugar”, aunque se ha observado que este cáncer puede llegar a progresar hasta convertirse en un cáncer invasivo, como se ha observado en el caso de Carcinoma Lobular *In Situ*, el cual se considera una etapa previa a un carcinoma invasivo. CaMa invasivo es aquel en donde las células anormales se dispersan a otro tipo de tejidos u órganos, por lo que es aquel que llega a etapas metastásicas. Comúnmente puede propagarse a cerebro, huesos, pulmones e hígado. Un ejemplo de CaMa invasivo es el Carcinoma Ductal Infiltrante, el cual se origina en los conductos mamarios y se propaga hacia las paredes del ducto invadiendo tejido graso y otras partes del cuerpo (Akram *et al.*, 2017).

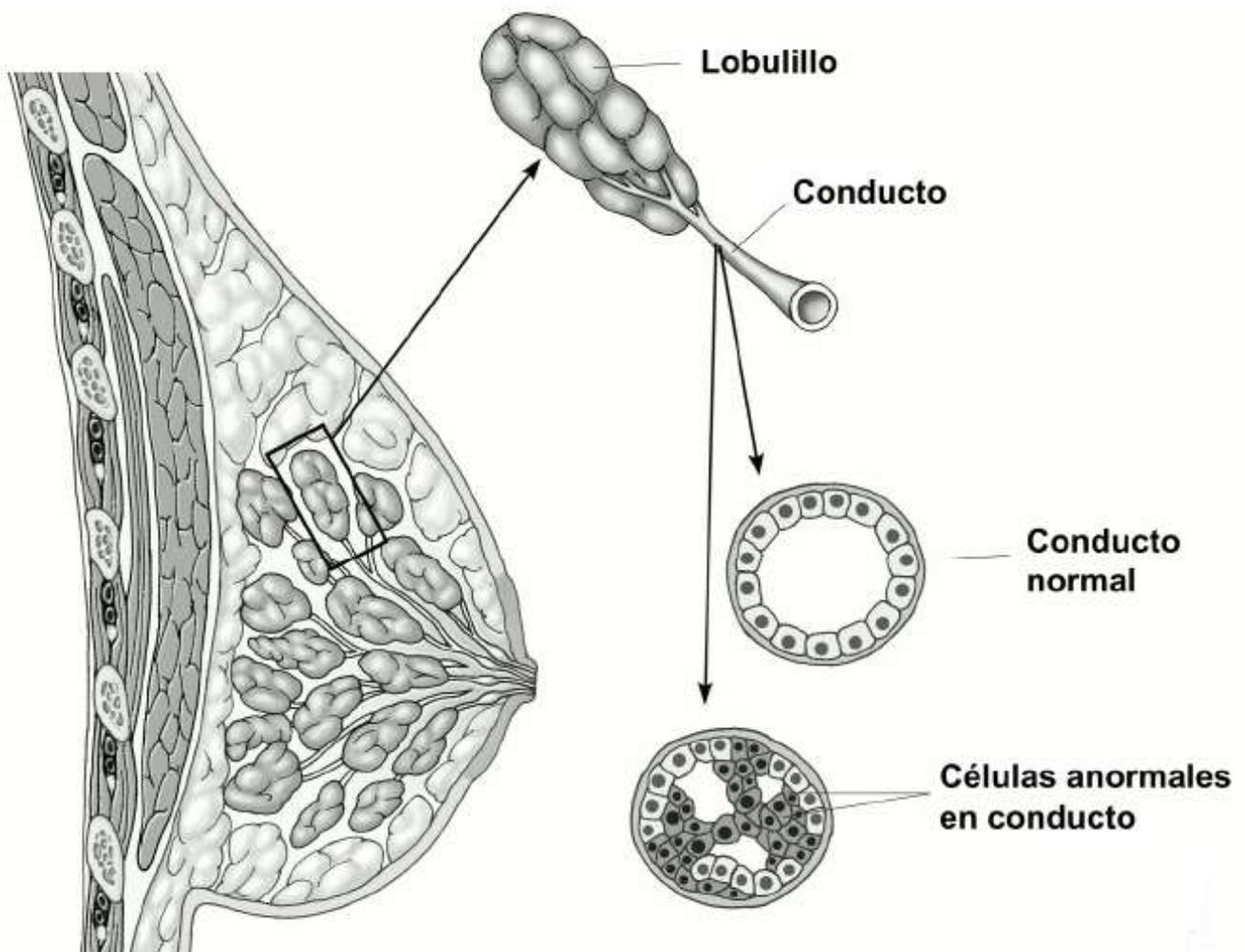


Figura 1. Carcinoma ductal *in situ* (American Cancer Society, 2017)

Tipos de Cáncer de Mama

Para clasificar el estado del CaMa, al igual que otros cánceres, se utiliza la información del tipo de tejido donde se originó, así mismo si este se propaga a otros tejidos, el tamaño del tumor y el grado de vascularización del tumor. La primer clave de clasificación general es el sistema TNM, en el cual se determina propagó a tejidos adyacentes (T), nódulos linfáticos (N) o a otros órganos a nivel metastásico (M). Este esquema de clasificación hace énfasis a la imagenología incluyendo ultrasonidos, mastografías y cortes histológicos. Cabe destacar que dentro de este sistema TNM existen subcategorías más específicas. Una vez que los parámetros TNM son determinados, los estadíos 0, I, II, III, IV son asignados. 0 es el tipo de cáncer no invasivo. El estadío I es la primer etapa de cáncer invasivo, se llega a observar una vascularización temprana y se divide en dos categorías, las cuales son IA y IB. La IA describe un tumor de no más de 2 cm de tamaño, pero no llega a invadir tejido fuera de la mama y el IB cuando comienza a propagarse a nódulos linfáticos a no más de 0.2mm. La categoría II, hay un mayor grado de vascularización que I y también tiene dos categorías, las cuales son IIA y IIB. El estado IIA se describe como cáncer que llega a invadir una microregión de los nódulos linfoides axilares o en nódulos linfoides centinela. El tamaño del tumor se encuentra entre 2 a 5 cm, pero no llega a diseminarse hacia los nódulos linfáticos. El estado IIB tiene las mismas proporciones de tamaño que IIA, pero alcanza diseminarse en nódulos linfoides. El estado III se divide en 3 subtipos: IIIA, IIIB y IIIC. IIIA se describe como un tumor que se encuentra tanto en la mama como también en 4 a 9 nódulos linfoides. IIIB es aquel estado en donde el tumor puede ser de cualquier tamaño, pero causa hinchazón y ulceración en la piel y puede propagarse hasta 9 nódulos linfoides. IIIC se considera CaMa de tipo inflamatorio, el cual se presenta enrojecimiento e hinchazón de la mama, además de que el tumor se extiende arriba de 10 nódulos linfáticos y también puede propagarse a los nódulos claviculares. Por último el estado IV, el cual ya es el estado más avanzado y metastásico de la enfermedad, se describe como el cáncer que se propagó a otros órganos del cuerpo (Akram *et al.*, 2017; Cárdenas *et al.*, 2013).

Las técnicas de expresión génica han permitido entender y clasificar subtipos moleculares de CaMa utilizando biomarcadores, dentro de los cuales se encuentran los que utilizan la presencia o ausencia de receptores de hormona (estrógeno o progesterona) (RH+/RH-) y niveles sobreexpresados del receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y/o copias extras del gen de HER2 (HER2+/HER2-). Existen 4 subtipos moleculares principales los cuales son los siguientes:

-Luminal A (RH+/HER2-). Representa la mayor parte de los casos. Tiende a tener un crecimiento lento y es menos agresivo que otros subtipos. Los tumores de Luminal A se asocia a con un pronóstico favorable, ya que pueden ser candidatos a responder con terapias anti-hormonales.

-Luminal B (RH+/HER2+). Al igual que Luminal A, Luminal B son cánceres ER+ y/o PR+ y además definido por una biomarcador altamente positivo a Ki67 (indicador de que una proporción grande células se encuentra activamente dividiéndose) o HER2. CaMa luminal B está asociado con una pobre tasa de sobrevivencia a diferencia del Luminal A.

-HER2 enriquecido (RH-/HER2+). Este representa el 5% y tiende a propagarse de manera acelerada a diferencia de otros subtipos y está asociado con un pobre pronóstico comparado con RH+.

-Triple negativo (RH-/HER2-). Se llama así debido a que tienen ausente el receptor de estrógeno (RE-), el receptor de progesterona (RP-) y HER2-, tiene un pobre pronóstico de tratamiento a diferencia de otros subtipos (American Cancer Society, 2017).

Factores de riesgo que contribuyen a desarrollar cáncer de mama

Existen factores de riesgo que se asocian ciertas variables del individuo, como por ejemplo la edad (a mayor edad, mayor es el riesgo), la raza (donde se ha visto una mayor incidencia en la población blanca) y la genética (existe un alto riesgo en personas con la mutación hereditaria en los genes BRCA1 y BRCA2). En mujeres, factores como la menarca antes de los 12 años de edad, menopausia después de los 52 años, nuliparidad, primer embarazo después de los 30 años, uso de anticonceptivos hormonales y terapias hormonales de reemplazo en la perimenopausia o posmenopausia por más de 5 años. Otros factores causales se asocian a conductas personales o estilos de vida de la persona como fumar, sedentarismo, la ingesta de bebidas alcohólicas, la alimentación (dieta rica en carbohidratos, baja en fibra y rica en grasas trans) y obesidad. Otros factores causales son la exposición a radiaciones ionizantes y tratamientos de radioterapia en tórax. (Cárdenas *et al.*, 2013; American Cancer Society, 2017).

Prevención y control de cáncer de mama

De acuerdo a la OMS existen dos métodos de detección precoz de CaMa, uno incentiva el conocimiento de los primeros signos de la enfermedad a la población, como ejemplo el fomento de la autoexploración para detectar alguna anomalía, y el otro método es el cribado, el cual es la aplicación sistemática de pruebas de tamizaje en una población aparentemente sin síntomas, como el fomento de chequeos clínicos y el empleo de mastografías a una determinada población con alta probabilidad de tener la enfermedad (WHO, 2007). La Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama establece la detección a través de la autoexploración, la exploración clínica y las mastografías (para la identificación en fase clínica), por lo que ambos métodos se emplean dentro del sistema de salud pública en México, además de que se realizan distintas campañas de información a la población sobre medidas de prevención y control mediante recomendaciones a seguir para mejorar estilos de vida, campañas de concientización para el fomento a la autoexploración y exploración clínica (NOM-041-SSA2-2011, 2011; IMSS, 2015; ISSSTE, 2017), sin embargo el primer método tiene un riesgo predeterminado, debido a que la enfermedad puede ser detectada en fases más avanzadas, por lo que es importante ampliar por un lado, las pruebas de tamizaje que puedan aplicarse en la población ya que existe una alta probabilidad de un mejor pronóstico y una alta tasa de sobrevivencia, así como tratamientos asequibles (Martínez *et al.*, 2009).

Inmunovigilancia

Paul Ehrlich desde 1909, propuso por primera vez la idea de que el sistema inmune participa en la búsqueda y eliminación de células recién transformadas, antes de que sean detectadas clínicamente. A mediados del siglo XX, en 1957 Burnet y Thomas, tomando base evidencia experimental en modelos de ratón donde se rechazaban tumores trasplantados más la idea propuesta por Ehrlich, formularon la teoría de la Inmunovigilancia, la cual fue hasta los años 90 donde adquirió mayor solidez, con estudios en modelos knock-out, validando la existencia de la inmunovigilancia en tumores inducidos. La inmunoedición es un proceso dinámico que describe la relación entre sistema inmune y las células tumorales. Este proceso consta de 3 fases: 1) eliminación: en donde, tanto el sistema innato como adaptativo reconocen y eliminan las células tumorales, 2) equilibrio: donde una población de células malignas son eliminadas y otra parte de células malignas resiste los mecanismos efectores del sistema inmune y 3) escape: donde las células tumorales evaden los mecanismos del sistema inmune (Burnet, 1970; Kim *et al.*, 2007; Töpfer *et al.*, 2011; Ravelli *et al.*, 2017).

Sistema inmune innato y Cáncer de Mama

La inmunidad innata es la primer línea de defensa del organismo y dentro de los componentes celulares importantes involucrados en el proceso de inmunoección, se encuentran los linfocitos NK (Natural Killer en inglés), los cuales son células linfoides que provienen del mismo precursor de los linfocitos T, pero no expresan el marcador CD3, ni el reordenamiento para la expresión del Receptor de células T (TCR en sus siglas en inglés). Los linfocitos NK expresan el ligando Fas o Fas-L (en inglés, Factor-associated suicide ligand), el cual es una proteína transmembranal que interacciona con la molécula Fas de las células tumorales, activando la vía intrínseca de la apoptosis; así mismo los linfocitos NK presentan el sistema de perforinas y granzimas para la eliminación de las células tumorales (Kim *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2012; Regueiro *et al.*, 2010). En el caso de pacientes con CaMa, de los cuales no se detectó un progreso de la enfermedad, hubo un incremento en la actividad de estos linfocitos (Carson *et al.*, 2004; Díaz-Zaragoza, 2015), además se ha observado como parte de mecanismo de evasión al sistema inmune, que las células tumorales tienen silenciado la vía intrínseca de la apoptosis (Wang *et al.*, 2017).

La reactividad de las NK se basa en la interacción de receptores inhibidores y activadores, los cuales se clasifican en 3 grupos dependiendo su estructura: 1) KIRs (en inglés, killer-cell immunoglobulin-like receptors), los cuales son receptores inhibitorios específicos para antígenos acoplados a moléculas de MHC de clase I (en inglés Major Histocompatibility Complex) inhibiendo su actividad y activándose al detectar células tumorales sin moléculas MHC-I. Se han reportado deficiencias en la maquinaria de procesamiento para acoplar moléculas MHC-I en células de tumores de CaMa, además de un decremento de la expresión de moléculas de MHC-I (Wang *et al.*, 2017; Töpfer *et al.*, 2011). 2) NCRs (en inglés, natural cytotoxic receptors) son un grupo de receptores activadores e inhibidores como ejemplos NKp46, NKp30 y NKp44, los cuales dependiendo del ligando (generalmente moléculas no clásicas como lípidos, glicolípidos) activan o inhiben la actividad de las NK. 3) Receptores de tipo C lectina, como ejemplo el receptor NKG2D (en inglés, Natural group 2 member D), el cual es uno de los receptores activadores cuyo ligando son proteínas MIC (MIC A y MIC B) y proteínas 1 de unión UL16 (ULBP1 en sus siglas en inglés), las cuales se expresan en células en estrés y células tumorales (Mincheva and Baranov, 2014; Konjevic *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2018). En cortes histológicos procedentes de tumores de CaMa se observó hasta un 20% mayor de expresión de MIC A y MIC B a diferencia de otros cánceres (Ghandially *et al.*, 2017).

Otro componente celular importante, el cual forma el vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa, son las células dendríticas (Dendritic Cells, DC en sus siglas en inglés), las cuales llevan a cabo la presentación de antígeno para la activación de los linfocitos T naïve, los cuales proliferan y se convierten en células efectoras. El antígeno presentado es un péptido lineal procedente de restos celulares tumorales acoplado a moléculas MHC-I para linfocitos T CD8+, los cuales darán lugar como célula efectora a linfocitos T citotóxicos; o también acoplados a moléculas MHC-II para linfocitos T CD4+, los cuales darán lugar a una variedad de linfocitos T cooperadores (Th en inglés) o moduladores de otros linfocitos (Abbas *et al.*, 2012; Regueiro *et al.*, 2010); esta diferenciación de la variedad está influida en función del microambiente tumoral de las citocinas presentes, así mismo, por la maduración de las DCs; ya que se ha observado en tumores de CaMa de pacientes en etapa temprana de la enfermedad, DCs de fenotipo inmaduro (iDCs en inglés), las cuales son incapaces de inducir a linfocitos T y diferenciándolos en linfocitos T reguladores (Treg) los cuales modulan a los linfocitos T citotóxicos CD8+ (Matsuura *et al.*, 2006; Rabinovich *et al.*, 2007; Palucka *et al.*, 2013). En infiltrados de tumores de pacientes con CaMa agresivo, se ha observado una gran contenido de células Treg y Células Supresoras Derivadas mieloides (MDSCs en sus siglas en inglés), las cuales liberan citocinas como IL-10,

IL-35 y TGF- β , promoviendo la tolerancia inmunológica, suprimiendo la actividad citotóxica de linfocitos T CD8+ y NK, promoviendo el crecimiento tumoral y angiogénesis (Ravelli *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

Antígenos tumorales y Cáncer de mama

El CaMa al igual que otros cánceres es una enfermedad heterogénea, debido a que las células tumorales presentan distintas características que las distinguen de una célula sana, como es la inestabilidad de su material genético, la cual se ve reflejado en la expresión de diversas moléculas que se generan de forma anómala o aberrante y en células sanas no se estarían expresando, las cuales pueden ser reconocidas por el sistema inmune (Hanahan and Weinberg, 2011). Estas moléculas se denominan antígenos tumorales o antígenos asociados al tumor (TAAs en sus siglas en inglés), los cuales son clasificados en tres grupos: 1) los neoantígenos, los cuales son péptidos acoplados a la molécula de MHC-I y son derivados de mutaciones genéticas, aberraciones cromosómicas, transformaciones virales y se encuentran totalmente ausentes del genoma del organismo; 2) los auto-antígenos embrionarios o antígenos oncofetales, los cuales son moléculas que se expresan normalmente en etapa fetal pero no adulta, y se expresan de forma excesiva o de manera aberrante; y 3) los auto-antígenos modificados, los cuales tienen distintas modificaciones post traduccionales en sus moléculas y se expresan específicamente en el tumor (Wang *et al.*, 2017; Töpfer *et al.*, 2011), dentro de este grupo puede incluirse uno más específico, los cuales se denominan Antígenos de tipo Carbohidrato Asociados a Tumor (TACAs en sus siglas en inglés), los cuales son el producto de glicosilaciones aberrantes en moléculas que se sobre expresan tales como glicolípidos y glicoproteínas en la superficie células tumorales (Heimburg-Molinari *et al.*, 2011; Cazet *et al.*, 2010a). HER2 es uno de los TAAs más estudiados en cáncer y se encuentra amplificado 39% en CaMa, el cual se asocia a tumores más agresivos, aumento de metástasis y disminución de supervivencia. Al igual que HER2 otros TAAs como MUC1, MAGE y NY-ESO-1 se sobre expresan en CaMa, del mismo modo, también se sobre expresa una diversidad de TACAs como gangliósidos, sialil-Tn y sialil-Lewis, los cuales generalmente se asocian con un pobre pronóstico y disminución de la supervivencia en pacientes con CaMa (Soliman *et al.*, 2017; Sarmiento-Rubiano, 2015; Cazet *et al.*, 2010b).

Inmunoglobulina M. IgM natural y adaptativa en el reconocimiento de antígenos tumorales

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son generados a partir del receptor de las células B (BCR en sus siglas en inglés); cada receptor tiene la capacidad de reconocer antígenos de manera específica, entre ellos antígenos tumorales. Uno de los anticuerpos que reconoce antígenos tumorales es la Inmunoglobulina M o IgM, la cual es el primer isotipo de inmunoglobulina que se expresa en linfocitos B naïve. IgM está formada de cadenas pesadas μ (56 a 60 KDa) de 576 residuos de aminoácidos (aa). La región variable ($V\mu$) contiene alrededor de 124 aa. La región constante está formada por 4 dominios ($C\mu 1$ - $C\mu 4$) y contiene 452 aa. Se expresa como monómero unido a la membrana en el linfocito B (denominada mIgM), el cual se encuentra unido a dos glicoproteínas $Ig\alpha$ (CD79 α) e $Ig\beta$ (CD79 β) como parte central del BCR (**Fig. 2a**), así mismo, se encuentra su forma secretable en forma de pentámero (denominada sIgM), cuyo peso molecular es de aproximadamente 970 KDa, cada monómero se encuentra unido por enlaces disulfuro y cada pentámero posee una unión o cadena J (**Fig. 2b**). En su forma soluble tiene 10 sitios de unión a antígeno por lo que posee una alta avidéz y baja afinidad. Es muy eficaz en la activación del complemento por medio de la vía clásica con C1q, ya que sólo se necesita una molécula de IgM para activarlo, seguido de la neutralización y opsonización (Abbas *et al.*, 2012; Klimovich, 2011).

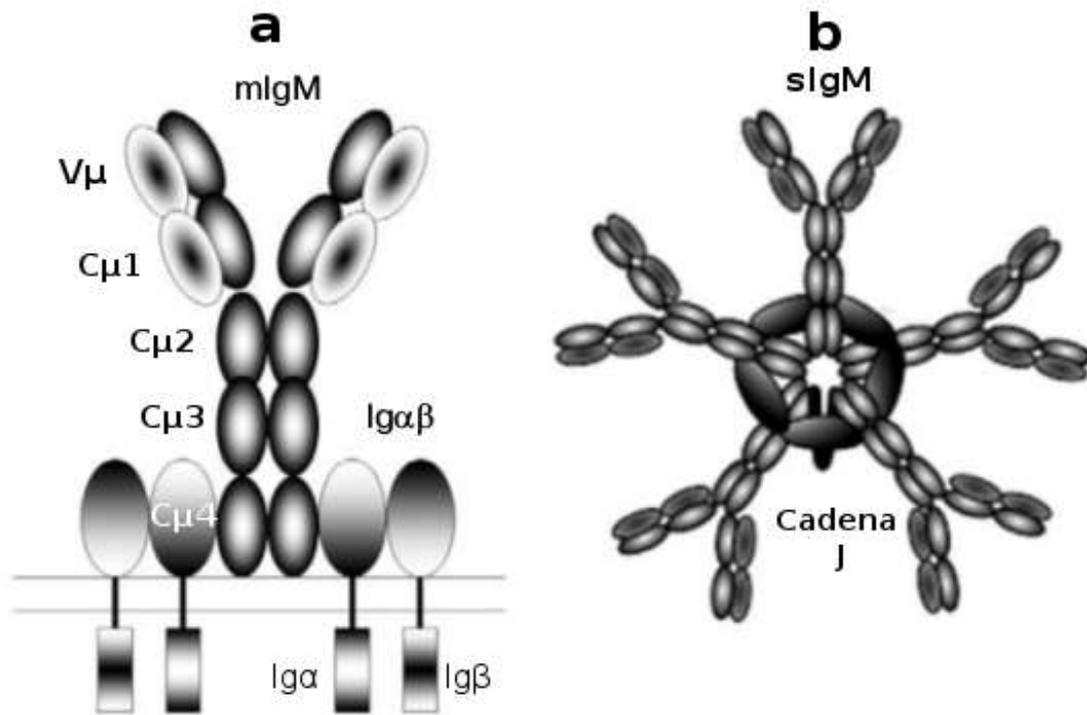


Figura 2. Estructura de IgM. a) IgM monomérica (mIgM). b) IgM pentamérica (Klimovich, 2011).

Existen dos grupos de IgMs las cuales dependen del subtipo de población de linfocitos B que las genere. El subtipo linfocitos B2 o linfocitos B foliculares ($IgM^{low}IgD^{high}CD21^{high}CD23^{high}$) produce IgM denominada adaptativa, ya que se produce en respuesta a un reto antigénico. El antígeno reconocido depende de la respuesta por parte de los linfocitos Th, los cuales activan a los linfocitos B2, por lo que es un tipo de respuesta T dependiente. IgM adaptativa es mono-reactiva y específica a epítopes peptídicos, esto es debido a un proceso de maduración de la afinidad, consecuencia de la hipermutación somática del rearrreglo de los genes que codifican para la región variable del anticuerpo, con el fin de adaptarse al reconocimiento del antígeno presentado (Regueiro *et al.*, 2010; Zouali, 2015). El subtipo células B1 CD5+ o células B-1a (en roedores linfocitos B CD5+ y humanos CD20+ CD43+ CD27+) producen anticuerpos naturales, los cuales se producen sin necesidad a un previo estímulo antigénico, por lo que es una respuesta T independiente (Vas *et al.*, 2013; Regueiro *et al.*, 2010). Se unen preferencialmente a estructuras conservadas como glicoproteínas y glicolípidos de superficie celular. Los linfocitos B1 son los que mayormente producen IgM natural, pero también la producen los linfocitos B de Zona Marginal; ambos no requieren maduración de la afinidad para su producción. IgM natural posee cadenas lambda a diferencia de IgM adaptativa la cual posee cadenas kappa (Vollmers and Brändlein, 2009). IgM natural es el primer anticuerpo que se sintetiza en el recién nacido, por lo que representa la primer línea de defensa del organismo en inmunidad humoral, teniendo desde los primeros años vida del organismo niveles altos de IgM, los cuales disminuyen con la edad, pero manteniéndose presente (Ebrahimnezhad *et al.*, 2017; Griffin *et al.*, 2011; Lobo, 2016). IgM natural se une a los antígenos con baja afinidad ($K_a = 10^5 \text{ L mol}^{-1}$, o menos) a diferencia de IgM adaptativa ($K_a = 10^7\text{-}10^{11} \text{ L mol}^{-1}$) esto debido por la especificidad (Zouali, 2015; Zhou *et al.*, 2007), además de ser poli-reactiva, es decir, que simultáneamente se unen a diferentes tipos de antígenos no relacionados estructuralmente, tanto antígenos procedentes de agentes infecciosos, como antígenos propios de tipo carbohidrato de los grupos sanguíneos ABO, glicoproteínas y glicolípidos modificados post-traduccionalmente productos de glicosilaciones aberrantes, los cuales reflejan un perfil recurrente de células en estrés, células en estado pre y apoptótico y células tumorales (Ebrahimnezhad *et al.*, 2017; Zouali, 2015; Griffin *et al.*, 2011). IgM natural tiene un efecto citotóxico en células tumorales reconociendo TACAs y

TAAAs producidas en la superficie celular del tumor, ya que se encuentra presente a lo largo del desarrollo del tumor (Brändlein *et al.*, 2003; Díaz-Zaragoza, 2014; Manson *et al.*, 2005; Shishido *et al.*, 2012). Tanto IgM natural como adaptativa participan en el proceso en el reconocimiento de TAAAs y TACAs, participando así mismo en reclutamiento de antígenos, como también en la eliminación de células tumorales por medio de la activación del complemento, neutralización e inducción de apoptosis (Shishido *et al.*, 2012; Díaz-Zaragoza *et al.*, 2015a). El sistema inmune elimina el desarrollo de carcinomas proporcionando anticuerpos contra células tumorales (Brändlein *et al.*, 2003; Vollmers and Brändlein, 2005; Vollmers and Brändlein, 2009).

Antígenos de membrana reconocidos por IgM en tumores de cáncer de mama

FC-2.15 es un anticuerpo monoclonal IgM murino, el cual reconoce una fracción de carbohidrato O-glicano del trisacárido Lewis^x (también llamado Lex) de ciertas glicoproteínas de adhesión en tumores de CaMa. Lex se encuentra normalmente presente en proteínas como las selectinas de granulocitos polimorfonucleares (PMN). FC-2.15 induce una respuesta anti-tumoral y neutropenia reversible (Capurro *et al.*, 1998, 1999; Díaz-Zaragoza, 2015; Díaz-Zaragoza *et al.*, 2015b).

SC-1 es una IgM natural, la cual fue aislada de pacientes con carcinoma de estómago. SC-1 reconoce un epítotope de carbohidrato específico de la glicoproteína DAF-B (en sus siglas en inglés Decay Acceleration Factor-B), el cual se expresa en membrana de células cancerosas del estómago e induciendo apoptosis. SC-1 induce apoptosis en células de CaMa a través de la inactivación p-STAT3 SHP-1-dependiente y tiene efectos más potentes que sorafenib en células de CaMa humano (Vollmers and Brändlein, 2006; Liu *et al.*, 2013; Díaz-Zaragoza, 2015; Díaz-Zaragoza *et al.*, 2015b).

PAM-1 es una IgM monoclonal aislada de un paciente con carcinoma de estómago; reconoce una variante de CFR-1 (Receptor de factor de crecimiento de fibroblastos ricos en cisteínas), la cual es una glicoproteína integral que regula la transcripción de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano o HER1) y FGFR (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos), los cuales se sobre-expresan en células tumorales. La unión de PAM-1 a CFR-1 induce apoptosis *in vitro* e *in vivo* en células de tumores con CaMa. La presencia de CFR-1/PAM-1 puede ser utilizada como herramienta de diagnóstico y agente terapéutico para lesiones epiteliales pre-cancerosas y cancerosas en CaMa (Pohle *et al.*, 2004; Brandlëin *et al.*, 2004; Díaz-Zaragoza, 2015; Díaz-Zaragoza *et al.*, 2015b).

GRP78 (proteína reguladora de glucosa de 78 KDa) es una chaperona de la familia HSP, la cual juega un papel importante manteniendo la homeostasis celular participando en el ensamblaje de complejos proteínicos en retículo endoplasmático. Es una proteína que en condiciones normales se encuentra en citoplasma, pero frente condiciones patológicas como en cáncer, se encuentra en la membrana celular. SAM-6 es una IgM monoclonal, la cual reconoce una fracción de un O-glicano de una variante modificada postraduccionalmente de GRP78, la cual tiene un peso molecular de 82 KDa en CaMa. Así mismo se une a lipoproteínas oxidadas de baja densidad (LDL), induciendo endocitosis y favoreciendo su acumulación para posteriormente llevarse a cabo apoptosis (Rauschert *et al.*, 2008; Brandlëin *et al.*, 2007; Díaz-Zaragoza, 2015; Díaz-Zaragoza *et al.*, 2015b).

Las mucinas (MUC) son una familia de glicoproteínas con elevado peso molecular expresadas normalmente en superficie de células epiteliales. Existen mucinas asociadas a membrana como son la 1 y 16; la mucina 1 (MUC1) o Mucina Epitelial Polimórfica (PEM en sus siglas en inglés) es una glicoproteína con un peso molecular aproximado de 250-500 KDa se

encuentra asociada en membrana y constituye uno de los componentes de los ductos mamarios de las células de tejido glandular normal. En CaMa esta proteína se encuentra altamente glicosilada y se sobre expresa casi en un 90% de los casos. MUC16 se encuentra normalmente en epitelio de la superficie ocular, tracto respiratorio superior y mesotelio de algunas cavidades de los órganos reproductores (Gallegos *et al.*, 2008; Sarmiento-Rubiano, 2015). IgM reconoce epítopes de MUC1 (CA15.3 y CA27.29) y MUC16 (CA125), los cuales son los más estudiados en cáncer de ovario que en CaMa. IgM que reconoce los epítopes de MUC1 puede controlar la diseminación tumoral (Adluri *et al.*, 1999; Díaz-Zaragoza, 2015; Díaz-Zaragoza *et al.*, 2015b).

Los gangliósidos son una familia de glicoesfingolípidos complejos que contienen uno o varios residuos de ácido siálico. Son abundantes en membrana plasmática de neuronas de diversas proteínas, aunque se encuentran en menor proporción en otros tipos celulares. Tienen una función en la interacción célula-célula (Cazet *et al.*, 2010b; Rabinovich, 2004). IgM reconoce glicoesfingolípidos como GD2, GM2 y Lewis^Y, los cuales se sobre-expresan de forma aberrante en CaMa. IgM tiene un efecto citotóxico (Monzavi-Karbassi *et al.*, 2007; Ragupathi *et al.*, 2005; Pashov *et al.*, 2009; Díaz-Zaragoza, 2015; Díaz-Zaragoza *et al.*, 2015b).

Los antígenos carcinoembrionicos (CEA en sus siglas en inglés) son glicoproteínas oncofetales ancladas a membrana que se sobre expresa en CaMa un 50% de los casos, aunque no es específico y llega a expresarse en mayor proporción en carcinoma ductal que en lobular. IgM reconoce a estos antígenos (Conry *et al.*, 2000; Albanopoulos *et al.*, 2000; Díaz-Zaragoza, 2015; Díaz-Zaragoza *et al.*, 2015b).

Existen diferentes carbohidratos con estructura similar a la de los antígenos de grupos sanguíneos, los cuales se llegan a expresar en varios cánceres, como es el caso del antígeno oncofetal sialil-Tn (sTn), el cual es uno de los blancos utilizados para vacunas terapéuticas y se ha observado que su expresión ha sido detectada en etapas tempranas de carcinogénesis. Se encuentra anclado a membrana de ciertas glicoproteínas de células con CaMa. IgM reconoce al antígeno sialil-Tn (Gilewski *et al.*, 2007; Munkley, 2016).

Antígeno “middle T” o MT y su papel en la transformación de células tumorales

El genoma del poliomavirus consiste de 5 kb (5300 pb) de dsDNA circular, el cual contiene un origen de replicación, una región enhancer encargada en la regulación de la transcripción y replicación del virus, genes que codifican en la transcripción temprana para la formación de los antígenos T y genes que codifican en la transcripción tardía para la formación de las proteínas de la cápside del virus (VP1, VP2 y VP3). Para la síntesis de los antígenos T, se lleva a cabo un splicing del RNA produciendo los transcritos de mRNA, los cuales darán lugar a tres antígenos T (**Fig. 3**). Unos de los antígenos T son los antígenos “Large-T” (LT) y “Small-T” (ST), los cuales promueven la iniciación de síntesis de DNA viral y subsecuente el cambio en la transcripción tardía para la formación de la cápside viral en la célula infectada, así mismo, participan en la regulación del ciclo lítico del virus. Otro de los antígenos importantes es “Middle-T” o MT, el cual es un mitógeno potencial y tiene la capacidad de convertir células del tejido mamario normales a estado canceroso (Zhou *et al.*, 2011; Fluck and Schaffhausen, 2009; Gottlieb and Villareal, 2001; Nelson and Cox, 2005).

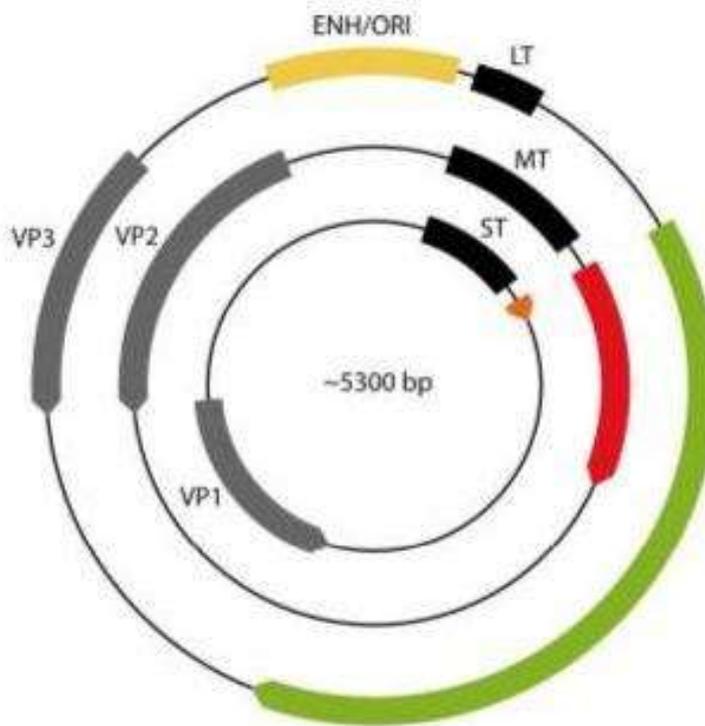


Figura 3. Genoma del poliovirus (aproximadamente 5300 pb). La transcripción temprana de los antígenos T, se encuentra en dirección de las manecillas del reloj: LT: antígeno Large T, MT: antígeno Middle T y ST: antígeno Small T, mientras que la transcripción de las proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3) se encuentra en dirección en contra de las manecillas del reloj. ENH es el enhancer que regula la transcripción y replicación y ORI el origen de replicación (Fluck and Schaffhausen, 2009)

El antígeno MT del poliovirus murino es una proteína de 421 aminoácidos, con un aparente peso de 55 KDa. MT es el principal regulador tanto de la replicación del DNA viral y la transcripción temprana y tardía de genes del virus, además es una proteína que no tiene una actividad catalítica, sino más bien que interviene con proteínas que participan en varias vías de señalización de crecimiento, proliferación celular, sobrevivencia y apoptosis. Posee una región C-terminal que se asocia fuertemente con membranas intracelulares, una región común con el antígeno ST y una región N-terminal la cual se localiza en dirección hacia la parte interna de la célula infectada (Zhou *et al.*, 2011; Fluck and Schaffhausen, 2009; Gottlieb and Villareal, 2001; Nelson and Cox, 2005).

En el proceso de transformación de las células, la región N-terminal de MT une dos subunidades de la Fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A en sus siglas en inglés), la cual es una proteína trimérica y es relevante en el contexto de cáncer, ya que tiene una función como supresor tumoral. Una vez realizada la unión entre MT y PP2A, este complejo proteínico se une a una proteína de la familia src de tirosincinasas (PTKs en sus siglas en inglés), usualmente pp60c-src o pp62c-yes (también algunos miembros de c-Fyn), la cual una vez activada, fosforila un cierto número de tirosinas de MT. Tres de estas fosfotirosinas actúan como sitios de unión para el dominio SH2 (Dominio Src 2 Homólogo) o dominios PTB (dominios de unión de fosfotirosina) de ShcA (Proteína de transformación SHC, Y250), PI3K (cinasa fosfoinositol 3, Y315), la proteína fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1, Y322). Una actúa en una serina en el caso de la proteína 14-3-3 (S257) y en esta unión se ha observado que permite la multimerización de MT (Zhou *et al.*, 2011; Fluck and Schaffhausen, 2009; Gottlieb and Villareal, 2001; Nelson and Cox, 2005).

ShcA es una molécula adaptadora que se une a Grb2, esta unión permite el reclutamiento de proteínas adicionales tales factor de intercambio de guaninas (GEF) Sos1 y Gab1. Gab1 es una proteína implicada en el señalamiento de algunos factores de crecimiento receptores de citocinas. Al unirse Gab1 y Sos1, se activa Ras la cual desencadena la activación de Raf y MEK lo cual tiene como resultado la translocación nuclear de miembros de la familia de cinasas (ERK's/JNK) proteínas activadas por mitógenos (MAPK) y subsecuentemente la activación transcripcional de *fos*, *jun* o *myc*, genes implicados en la proliferación, sobrevivencia y crecimiento celular (**Fig. 4 y 5**) (Zhou *et al.*, 2011; Fluck and Schaffhausen, 2009; Gottlieb and Villareal, 2001; Nelson and Cox, 2005).

Por otro lado, PI3K posee una subunidad reguladora p85, la cual tiene papel importante con el RTK (Receptor de tirosina cinasa), esta subunidad se une a MT en la fosfotirosina 315, desencadenando la activación de PI3K y a su vez activando una pequeña GTPasa Rac, así mismo por otro lado la activación de PDK1 (proteína fosfoinositido dependiente de cinasa-1), la cual induce la activación de Akt como al igual de PI3K/p85. La suma de estos eventos provoca el bloqueo de la apoptosis de las células transformadas, la producción de nuevos lípidos regulados por Akt, promueve la división celular y la inducción de síntesis de proteínas (**Fig. 4 y 5**) (Zhou *et al.*, 2011; Fluck and Schaffhausen, 2009; Gottlieb and Villareal, 2001; Nelson and Cox, 2005).

La fosforilación de la tirosina 322 conlleva la unión de PLC- γ 1 a MT en donde se ha observado un incremento en la fosforilación de PLC- γ 1 y un incremento en la producción de moléculas mensajeras de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) mediante la hidrólisis de fosfatidilinositol bifosfato (PIP2). DAG activa a Proteínas serin-treonina cinasas pertenecientes de la familia de Proteínas Cinasas C (PKC en sus siglas en inglés), las cuales poseen un rol importante dentro de crecimiento y diferenciación celular. IP3 interviene en la apertura de canales de calcio teniendo una función importante en el tráfico vesicular y regulación de estrés debido a la presión osmótica (**Fig. 4 y 5**). Se ha observado que MT se une también a proteínas como TAZ, la cual es un regulador transcripcional, así mismo, regula la diferenciación de células troncales, promueve la proliferación y tiene funciones en la tumorigénesis en CaMa y HSC70, la cual es una chaperona 70 de choque térmico y se ha observado que compite con PP2A (**Fig. 4**) (Zhou *et al.*, 2011; Fluck and Schaffhausen, 2009; Gottlieb and Villareal, 2001; Nelson and Cox, 2005).

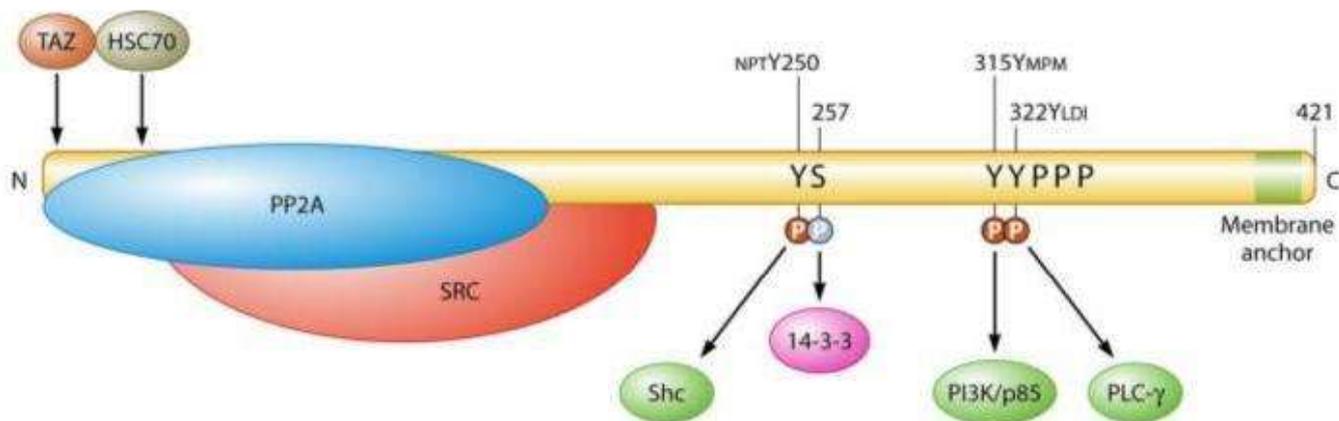


Figura 4. Cascada de señalización: transformación a células tumorales por MT. Sitios de unión para la activación de fosfotirosinas e interacción de proteínas con MT (Fluck and Schaffhausen, 2009).

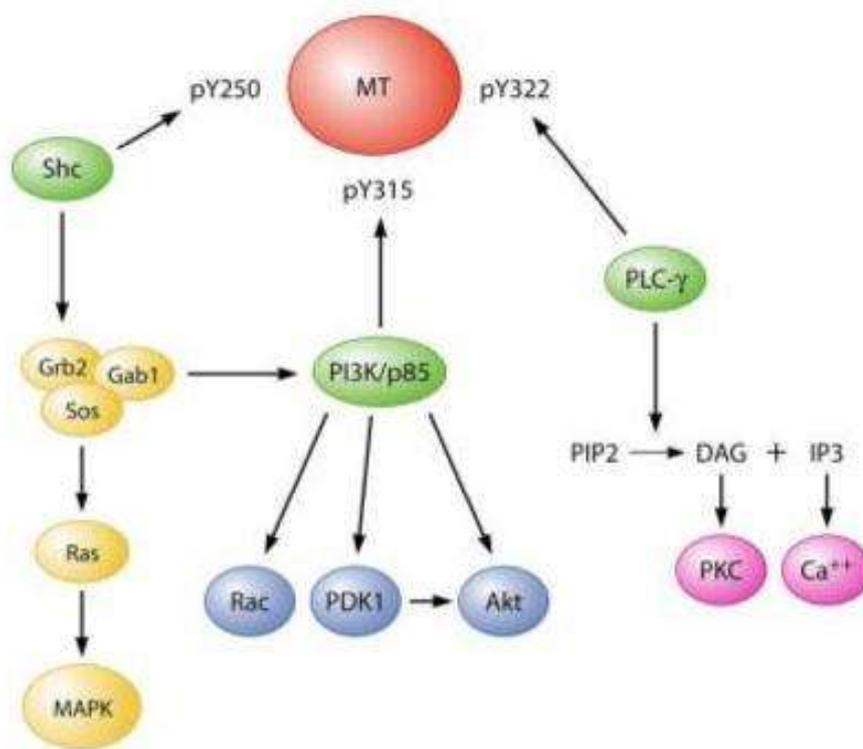


Figura 5. Esquema resumido de cascada de señalización de unión de proteínas con MT (Fluck and Schaffhausen, 2009).

ANTECEDENTES

Ratones transgénicos PyVT

En la investigación para la detección y tratamiento del CaMa se utilizan modelos murinos; uno de ellos es el modelo de ratones transgénicos FVB/N-Tg (MMTV-PyVT) 634Mul/J (ratones transgénicos PyVT), los cuales expresan el oncogen de MT. Como anteriormente se mencionó, MT induce la transformación de células del tejido mamario a estado tumorigénico (Guy *et al.*, 1992). MT se expresa en glándulas mamarias bajo el control del promotor MMTV (Mouse mamary tumor virus) principalmente en glándulas mamarias, pero también en glándulas salivales, ovarios, epidídimo, y con alta frecuencia en etapas metastásicas en pulmón. Una diferencia entre el modelo de ratones transgénicos PyVT y humanos, es que en humanos la mayoría de los tumores son receptores de estrógeno positivos (RE+), mientras que la mayoría de los tumores desarrollados en los ratones transgénicos PyVT son receptores de estrógeno negativos (RE-) o poseen bajos niveles de RE-, son receptores de progesterona negativos (RP-) y además de bajos niveles de p53 (Maglione *et al.*, 2001). En tumores metastásicos en este modelo se extienden a pulmón, mientras que en humanos, el cáncer se extiende a diferentes órganos (Fluck and Schaffhausen, 2009; Zagozdzon *et al.*, 2012). Este modelo emula el desarrollo de CaMa, desde etapas iniciales a estadios finales de la enfermedad, además se observó que la expresión potencial del oncogen MT se genera a partir de la semana 5 de edad (Zagozdzon *et al.*, 2012), así mismo, se desarrollan lesiones no invasivas (Maglione *et al.*, 2001).

Cabe destacar la importancia del papel de IgM en el reconocimiento de antígenos producidos por la células tumorales en CaMa dentro de las primeras etapas de desarrollo de la enfermedad. Las características IgM y el tipo de antígenos reconocidos expresados en CaMa, tienen el potencial de ser utilizados como herramienta de diagnóstico temprano (Díaz-Zaragoza *et al.*, 2014, 2015a, 2015b). En su mayoría los antígenos reconocidos se asocian a proteínas de membrana, por lo que se pretende identificar el perfil de reconocimiento de IgM hacia los antígenos expresados en CaMa murino utilizando el modelo de ratón transgénico PyVT, a partir de la 5° semana de edad la cual muestra ser una etapa crucial para el reconocimiento temprano de antígenos tumorales.

OBJETIVO GENERAL

Describir el patrón de reconocimiento de los anticuerpos IgM hacia antígenos de membrana expresados en cáncer de mama murino de ratones hembra transgénicos PyVT, a partir de una posible etapa de reconocimiento temprano de antígenos tumorales; para obtener un antígeno (o antígenos) candidato(s) para ser utilizado(s) como una posible herramienta para el diagnóstico temprano.

Objetivos específicos

- Obtener tejido mamario y suero de ratones hembra transgénicos PyVT portadores del oncogen MT que desarrollarán cáncer de mama y ratones no portadores.
- Comparar y detectar diferencias entre los patrones de reconocimiento de IgM hacia antígenos de membrana expresados en tejido mamario de ratones hembra transgénicos PyVT, a partir de la posible etapa de reconocimiento temprano de antígenos tumorales en adelante.

METODOLOGÍA

Reproducción de ratones transgénicos

Se utilizaron ratones hembra transgénicas FVB/N-Tg (MMTV-PyVT) 634Mul/J de 5 y 6 semanas de edad, las cuales fueron criadas en la Unidad de Modelos Biológicos (UMB) del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Todos los experimentos con ratones se llevaron a cabo de acuerdo al código de ética y normas de la UMB del Instituto de Investigaciones Biomédicas: <https://www.biomedicas.unam.mx/servicios/unidad-de-modelos-biologicos/>.

Identificación de ratones portadores del oncogen

Para determinar si los ratones portan el oncogen MT, se obtuvo una muestra proveniente de la punta de la cola de los ratones de 3 a 5 mm aproximadamente, la cual se extrajo DNA para amplificarlo utilizando PCR (en inglés Polymerase Chain Reaction). Se utilizaron dos técnicas diferentes de extracción de DNA.

- Fenol - Cloroformo: Los reactivos utilizados y las muestras se mantuvieron a 4°C. Las muestras se lisaron mecánicamente y homogeneizaron en una solución de Urea 6M, se centrifugaron a 4500 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo de 1.5 mL y se centrifugó con la misma cantidad de fenol líquido. Al sobrenadante se le incorporó 200 µL cloroformo y posteriormente se centrifugó. Con cloroformo se forman dos fases divididas por una película de proteínas; la fase superior se recuperó y se centrifugó nuevamente, pero con la misma cantidad en cloroformo. Se tomó la fase superior y se centrifugó con el doble de la cantidad de alcohol etílico 100% y 10µL de acetato de sodio 3M pH 5.2. Se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet, el cual se lavó 2 veces con 200 µL de etanol al 70%. Se dejó secando por 30 min. El precipitado formado se resuspendió con 50 µL de H₂O libre de nucleasas y un µL de RNAsa.

- Extracción de DNA utilizando columnas: Se agregó una solución de digestión Master Mix para cada muestra, del Kit-Wizard SV Genomic DNA Purification System (Nuclei Lysis Solution, 0.5M EDTA pH 8, Proteinasa K (20mg/mL) y RNAsa A solution (4mg/mL)). Las muestras se dejaron a baño maría a 55 - 56°C por toda la noche. Se retiraron del baño maría y se centrifugaron a 5000 rpm por 2 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregó Buffer Wizard SV Lysis; se agitó unos segundos y se transfirió a una columna Wizard SVA Minicolumn Assemble, la cual posee un tubo colector y un tubo con una matriz. Se centrifugó a 14000 rpm por 3 min y se retiró el sobrenadante del tubo colector. Se realizaron 4 lavados con la solución de lavado CWA con etanol al 96%, donde se centrifugó a 14000 rpm por un min, retirando el eluido del tubo colector entre cada lavado. Una vez retirado el último eluido, se centrifugó 2 min para secar la matriz. La columna se colocó encima de un tubo eppendorf y se le agregó H₂O libre de nucleasas para centrifugar y se almacenó a -20°C.

Una vez obtenido el DNA, se procedió a amplificarlo utilizando PCR con el Kit de reactivos Axygen Bioscience (Buffer 10X (20 mM Tris-HCl un pH 8.0, 100 mM KCl, 0.5% Tween 20, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT y 50% de glicerol), dNTP (100mM de concentración total, 25mM por cada dNTP), cloruro de magnesio (MgCl₂) y la TAQ DNA polimerasa (756 pb) 500 unidades). A esta mezcla se agregaron los primers de β actina como control (Forward: 5'-GGAGGTCATCACTATTGGCAACGAG-3' y Reverse: 5'-TGTTTACGGATGTCAACGTCACACT-3') y los de PyVT (Sigma, 384 5'-GGGAAGCAAGTACTTCACAAGG y 385 5'-GGAAAGTCACTAGGAGCAGGG). La mezcla de reacción se incubó en el termociclador (Bio-

Rad MyCycler Thermal Cycler). Una vez obtenida la muestra amplificada, se corrió en un gel de agarosa (1%) y se observó el gel en distintos equipos (Typhoon 9500, KODAK Gel Logic 100 System y transiluminador UV) para la identificación de ratones portadores.

Obtención de suero

Los ratones hembra PyVT se sangraron por última vez por la arteria coccígea media de la cola a la 5° y 6° semana postnatal. La sangre se refrigeró a 4°C por 30 min como mínimo para coagulación; se centrifugó y el suero se almacenó a -80°C hasta su uso.

Extracción de tejido mamario

Los ratones PyVT se sacrificaron a la 5° y 6° semana postnatal (un ratón hembra portador del oncogen MT y uno no portador, por cada semana de edad correspondiente). Cada ratón fue anestesiado al introducirlos en un recipiente con hielo seco y se dislocaron cervicalmente. Se extirpó el tejido mamario completamente (los 3 pares de mamas torácicas y 2 inguinales) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Extracción y cuantificación de proteína de membrana

Se realizó un pool de todos los pares de mamas y cada muestra se homogeneizó mecánicamente con 1 mL de PBS pH 7.4 y 10 µL de inhibidor de proteasas (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (100X)), hasta obtener un extracto homogéneo. El extracto se centrifugó a 1537.25 xg por 15 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo ultracentrífuga de policarbonato (mod. 3556430: 16 x 76 mm), el cual se colocó al rotor 90Ti (Beckman Counter). Las muestras se ultracentrifugaron a 100,214 xg por una hora a 4°C. Se conservó el pellet y fue resuspendido con 100 µL de amortiguador de lisis (Urea 6M, Tiourea 2M, 2% CHAPS, 2% anfólinas pH 3-10 (Bio-Lyte), DTT 50mM, 2% v/v NP-40 y Triton x-100 al 1.5%).

Se cuantificó proteína realizando una curva de calibración utilizando como referencia concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) y utilizando el método de Bradford con el espectrofotómetro (Multiskan FC lector de microplacas, Thermo Scientific).

Hidratación de tiras IPG

Una vez cuantificada la proteína, se hidrataron tiras IPG (tiras IPG lineales de 7 cm de pHi de 3-10, GE Healthcare) con 100 µg de proteína por tira, en una solución aforada a 125 µL con el buffer de lisis más 0.001% azul de bromofenol. Los 125 µL de la solución se colocaron cuidadosamente sin formar burbujas, a lo largo de un carril de la bandeja de hidratación, y se colocó encima la tira cuidadosamente para dejarla absorber por 30 minutos. Las tiras se cubrieron con aceite mineral y se dejaron hidratar toda la noche.

Isoelectroenfoque y equilibrio de tiras IPG

Para separar las proteínas en una dimensión (de acuerdo a su punto isoeléctrico), las tiras una vez hidratadas, se colocaron en el equipo de isoelectroenfoque (Protean IEF Cell, BioRad) y se dejaron hasta alcanzar 4000 V y 10000 VH.

Las tiras se equilibraron con dos lavados de 10 minutos. Ambos lavados se utilizó una solución Urea 6M, 0.375M Tris-HCl pH 8.8, 2% SDS y 20% glicerol; sólo que para el primer lavado agregando 2% (w/v) DTT y el segundo 2.5% (w/v) iodo-acetamida.

Electroforesis 2D

La separación de las proteínas en dos dimensiones (agregando peso molecular), la tiras se colocaron sobre geles de acrilamida (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, 10-20%, Bio-Rad) y se sometieron a electroforesis a 100 V por aproximadamente 2 horas en una cámara húmeda (Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad) en buffer de Tris-glicina-sulfato dodecil de sodio (25 mM Tris, pH 8.3, 250 mM glicina y 0.01% SDS).

Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (7 x 10 cm, GE Healthcare Amersham™ Protran™ NC Nitrocellulose Membranes: Rolls) en una cámara húmeda (Mini Trans-BlotCell, Bio-Rad) a 100 V por 1 hora y 10 minutos con buffer de Tris-glicina-metanol (Tris 25 mM pH 8.3, 250 mM glicina y 20% v/v metanol). Terminando la transferencia, la membrana se lavó con solución de 12 mM HCl (llamada sensitizer) y posteriormente se tiñó con la misma solución junto con CPTS (copper(II) phthalocyanine-3,4',4'',4'''- tetrasulfonic acid tetrasodium salt), una vez teñida la membrana el colorante se retiró y se procedió a escanear la membrana (HP Scanjet G4050). Las imágenes digitalizadas se conservaron a una resolución de 300 dpi en formato TIFF. Las membranas se destiñeron con una solución Eracer (50 mL 0.2 M KCl + 40.8 mL 0.2 M NaOH pH 12.5) y posteriormente se lavaron 10 minutos con sensitizer.

Western Blot

Una vez terminado el lavado con sensitizer, la membrana se bloqueó con 20 mL de una solución de PBS-Tween 20 (0.3%) y 5% leche descremada baja en grasas (Blotto, non-fat dry milk: sc-2324) durante toda la noche. Se retiró la solución y se incorporó el suero del ratón a una dilución 1:300 con las mismas concentraciones de PBS-Tween 20 y leche durante 8 horas a 4°C. Se hicieron lavados con PBS-Tween 20 (4 lavados de 10 min) y se incorporó el anticuerpo secundario (goat anti-IgM mouse, ZIMED) a una dilución de 1:1250, sólo con PBS-Tween 20 por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se hicieron lavados con PBS-Tween 20 (5 lavados de 8 minutos) y se revelaron con DAB-PBS-Tween 20 (3,3'-Diaminobenzidina; 0.5 mg/mL; 10 minutos) y 10 µL de peróxido de hidrógeno 30%. Las membranas se lavaron con H₂O MilliQ, se secaron con papel filtro y se digitalizaron.

Análisis de inmunoblots-2D

Las imágenes digitalizadas de cada membrana son los inmunoblots-2D; tomando como referencia el análisis reportado en 2009 por Ostoa-Saloma. Cada inmunoblot-2D fue digitalizado utilizando escáner (HP Scanjet G4050) a una resolución de 300 dpi en formato TIFF tomando los mismos parámetros de intensidad y contraste de luz para cada uno. Se obtuvieron duplicados de imágenes de cada membrana, es decir, la primer imagen digitalizada muestra los puntos o spots del total de proteínas de membrana obtenidas (separadas por peso molecular y punto isoeléctrico), mientras que la segunda imagen muestra del total de proteínas, sólo las proteínas que IgM reconoce, es decir, los antígenos reconocidos por IgM. Se seleccionó una imagen proveniente del total de proteína, la cual tuviese una mejor calidad y cantidad de spots, la cual se utilizó como referencia para acoplar en Adobe Photoshop los spots que tenían en común en la mayoría de inmunoblots-2D. Una vez acoplados los spots de los inmunoblots-2D, se obtuvieron los pesos moleculares (PM) y puntos isoeléctricos (pI).

RESULTADOS

Identificación de ratones portadores, obtención de suero y extracción de tejido mamario

Se identificaron hembras portadoras del oncogen MT (hembras positivas) y hembras no portadoras (hembras negativas) de las semanas 5 y 6 de edad. La **figura 6a** muestra un ejemplo del gel de identificación de una hembra negativa y una positiva.

Se obtuvo suero y se extrajo todo los pares de mamas (3 pares de mamas torácicas y 2 pares de mamas inguinales). La **figura 6b** muestra la ubicación ventral lateral derecha de los pares de mamas extraídas de cada ratón.

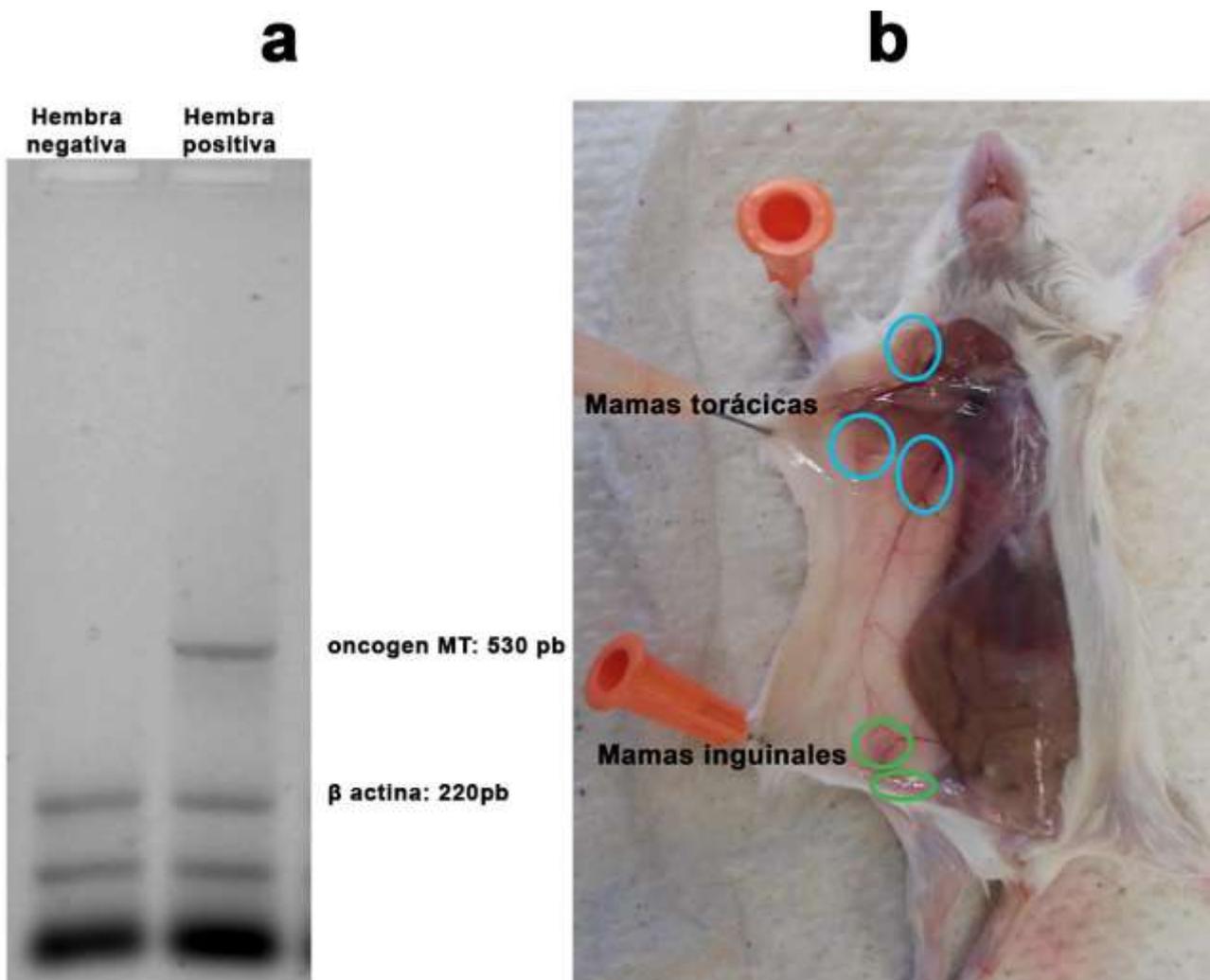


Figura 6. Identificación de hembras portadoras del oncogen MT y extracción de tejido mamario. a) Carril izquierdo corresponde al DNA de una hembra no portadora de oncogen MT (hembra negativa). Carril derecho corresponde al DNA de una hembra portadora del oncogen MT (hembra positiva). De arriba hacia abajo, primer banda correspondiente al oncogen MT (530 pb), segunda banda corresponde al control β actina (220 pb). b) Ubicación del lado derecho de las mamas del ratón. Círculos en azul muestran las ubicaciones de las mamas torácicas extraídas. Círculos en verde muestran las ubicaciones de las mamas inguinales extraídas.

Cuantificación de proteínas de membrana de tejido mamario de ratones hembra PyVT

Una vez obtenida la proteína de membrana, se cuantificó tomando como referencia una curva patrón con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA); se obtuvo un coeficiente de correlación de $R^2=0.9859$ (fig. 7). Se utilizó un μL de la solución de proteína de cada ratón y se obtuvieron las concentraciones, para ajustarlas a la ecuación y obtener 100 μg de proteína.

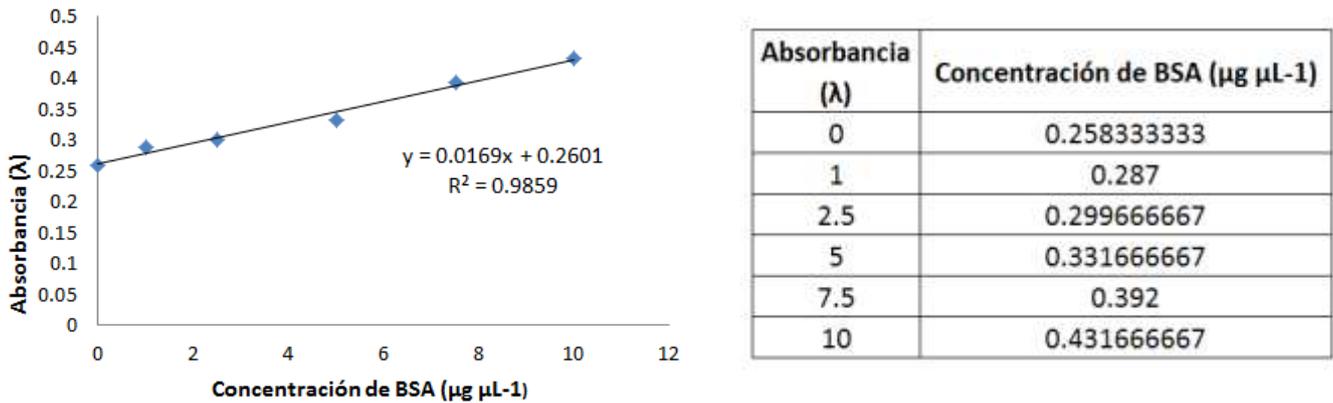


Figura 7. Curva patrón y tabla para la cuantificación de proteína de membrana de tejido mamario de ratones PyVT.

Inmunoblots-2D

Se analizaron 4 inmunoblots-2D (semana 5 y 6 junto con controles de cada grupo de edad), los cuales fueron elaborados por el técnico del laboratorio (M. en C. Ricardo Hernández). Las imágenes de las membranas se acoplaron en photoshop junto con las imágenes resultado del total de proteína de cada inmunoblot-2D (fig. 8).

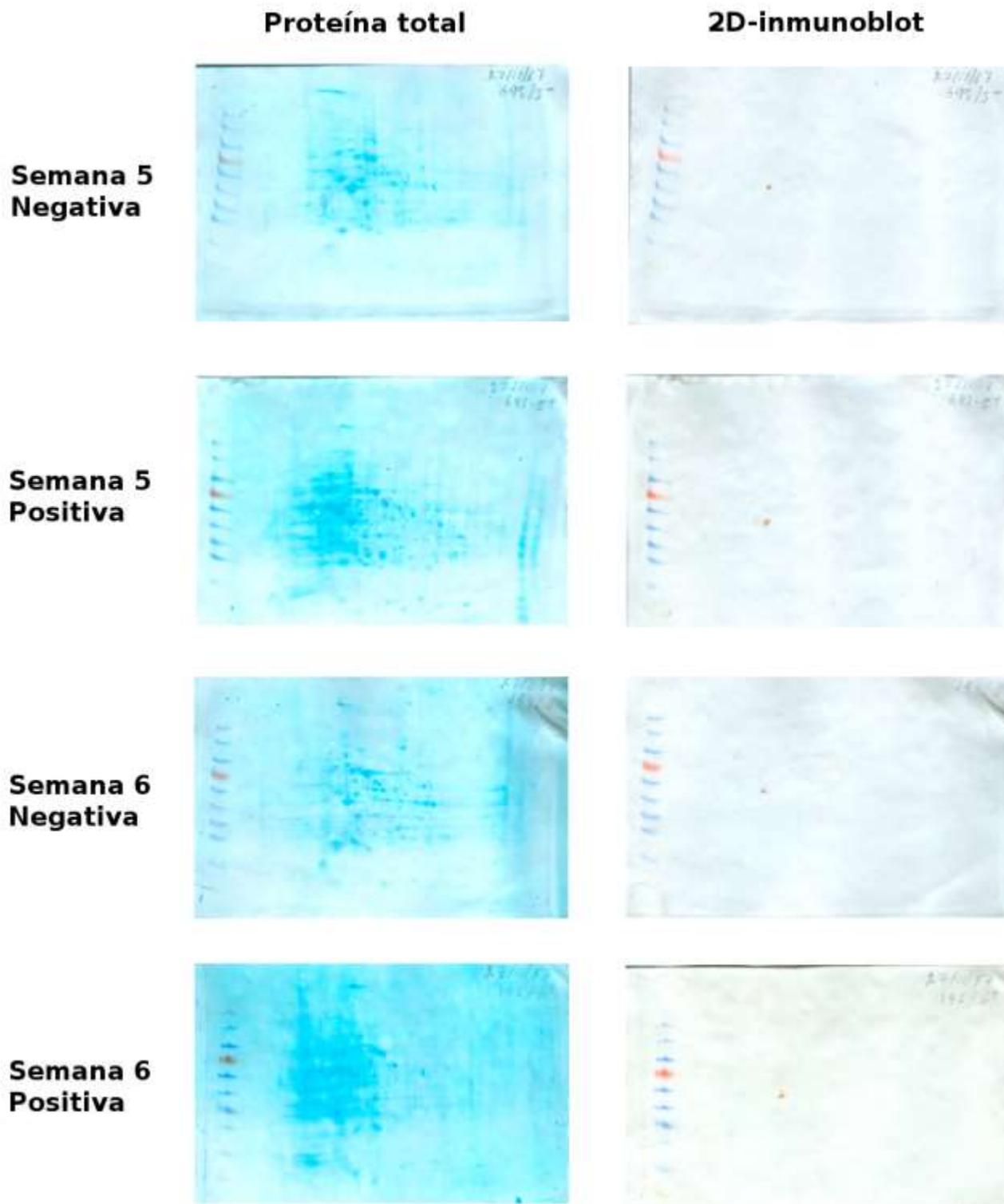


Figura 8. Membranas con total de proteína e inmunoblots-2D. Las membranas del lado izquierdo muestran en azul los spots del total de proteína de cada grupo de edad. Las membranas del lado derecho son los 2D-inmunoblots, el reconocimiento de IgM a la proteína de membrana de los diferentes grupos de edad.

En todos los inmunoblots-2D se muestra una reacción antígeno-anticuerpo marcado (spot), la cual tiene un peso aproximado de 37 KDa y un punto isoeléctrico de 5 en la escala de pH; por lo que no hubo diferencias entre los grupos de edad y entre grupos de hembras positivas y negativas.

DISCUSIÓN

CaMa es uno de los cánceres femeninos más frecuentes a nivel mundial (OMS, 2015), manteniendo una mayor incidencia de los casos en países desarrollados, aunque por otro lado, manteniendo una notable diferencia con respecto a la tasa de sobrevivencia en países en desarrollo; esto en gran medida influye por la detección oportuna de la enfermedad (Anderson *et al.*, 2008; Coleman *et al.*, 2008; Akram *et al.*, 2017).

En México son pocos los casos detectados de forma temprana, a pesar de los esfuerzos realizados en campañas de fomento a la auto-exploración, chequeos médicos y empleo de mastografías en la población (INEGI, 2016); sigue siendo un reto detectar la enfermedad en las primeras etapas, por lo que herramientas o técnicas que puedan reconocer señales de advertencia de la enfermedad en un estado aparentemente asintomático, mantienen una gran ventaja; por lo que es necesario abordar a fondo en la investigación de herramientas o técnicas asequibles y de bajo costo para su producción, para proporcionar un diagnóstico temprano de la enfermedad y así aumentar la probabilidad de un pronóstico favorable y un tratamiento eficaz (WHO, 2007; Martínez *et al.*, 2009).

Los biomarcadores no invasivos son más factibles para utilizarlos como herramientas para la detección de las primeras fases de CaMa; entre ellos, los biomarcadores serológicos los cuales tienen una alta sensibilidad de detección. Estos biomarcadores detectan diversos compuestos de suero producto de alteraciones ocasionadas por el cáncer, como puede ser ADN, ARN, proteínas circulantes. Un ejemplo específico, son los utilizados para el reconocimiento de compuestos sialilados modificados en lípidos y glicoproteínas presentes en CaMa derivados de alteraciones en la maquinaria post-traducciona (Li *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

Los ratones PyVT portan el oncogen MT, el cual tiene la capacidad de transformar a células de tejido mamario en estado normal a estado tumorigénico, esto debido a la alteración que ejerce el antígeno MT en vías implicadas de proliferación celular, crecimiento, supervivencia y apoptosis (Guy *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 2011; Fluck and Schaffhausen, 2009; Gottlieb and Villareal, 2001). Este modelo murino fue propuesto para el proyecto debido a que emula las condiciones de desarrollo de la enfermedad de CaMa, es decir, desde el inicio de la enfermedad hasta fases metastásicas; así mismo tomando en cuenta el tipo de características que IgM posee en el reconocimiento de TAAs y TACAs; abre la posibilidad de encontrar alguno o algunos que sean reconocidos de manera temprana y que podrían ser considerados como una herramienta de diagnóstico temprano en esta enfermedad (Díaz-Zaragoza *et al.*, 2014; 2015^a; 2015^b; Díaz-Zaragoza, 2015).

Existen biomarcadores serológicos utilizando la Inmunoglobulina G (IgG), los cuales por el tipo de características de este anticuerpo tienen una respuesta fuerte y durable contra antígenos tumorales asociados a CaMa (Richichi *et al.*, 2014), sin embargo, la respuesta se produce en etapas avanzadas, además de que se ha observado inmunosupresión de esta inmunoglobulina en modelo de ratón 4T1 y también en mujeres con CaMa (Llanes-Fernández *et al.*, 2006; Díaz-Zaragoza *et al.*, 2015^a; Rodríguez and Padilla, 2008), además de que se ha observado que IgM a diferencia de IgG, presenta amplio panorama de reconocimiento de antígenos en las primeras etapas de la enfermedad; por lo que comparando, IgM tiene mayor potencial de reconocer antígenos tumorales de forma temprana (Díaz-Zaragoza, 2015; Díaz-Zaragoza *et al.*, 2015^a).

Se esperaba encontrar un patrón de reconocimiento variable de las imágenes de los inmunoblots-2D de hembras portadoras del oncogen MT respecto al de hembras no portadoras, ya que IgM podría reconocer los TAAs o de forma específica los TACAs, que se generarán de las células transformadas a diferencia de las células de las hembras no portadoras, así mismo, se esperaba obtener diferencias entre los grupos de semanas de edad. Se presentó una reacción antígeno-anticuerpo (spot) en común en los inmunoblots-2D; la cual aproximadamente tiene un peso molecular de 37 KDa y un punto isoeléctrico de 5 en la escala de pH, además de ser un antígeno proteico asociado a membrana celular, debido al tipo de protocolo que se empleó para extraer proteína de membrana.

Cabe señalar puntos importantes del experimento con respecto a las expectativas: primero, el patrón de reconocimiento entre individuos de cada grupo de edad se hizo con 2 ensayos para cada uno (experimental y control). Es necesario obtener un volumen de muestra mayor entre los grupos de edad para observar si este tipo de patrón se produce de forma general, ya que se ha observado que el patrón de reconocimiento de IgM puede tener variaciones entre individuos. Esto se ha observado en CaMa de modelo murino de ratones BALB/c con células 4T1 implantadas (Díaz-Zaragoza *et al.*, 2014). En este estudio, el patrón de reconocimiento se basó utilizando a IgM considerada como anticuerpo natural (antes de la implantación de células 4T1) e IgM adaptativa (después de la implantación), en donde se observó una diversidad de spots antes y después de la implantación (Díaz-Zaragoza, 2015; Díaz-Zaragoza *et al.*, 2015a). Este modelo murino emula las condiciones metastásicas de la enfermedad, por lo que el reconocimiento se realizó en un tiempo relativamente corto, ya que este modelo se caracteriza por la velocidad con la que puede formarse el tumor primario (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2000). En el caso de los ratones PyVT al ser un modelo en el que muestra las condiciones de desarrollo de la enfermedad de CaMa, es de esperarse que el reconocimiento de antígenos se lleve tiempo después, además no se podría distinguir en los resultados la reacción antígeno-anticuerpo entre IgM natural e IgM adaptativa, por lo que se podría considerar la participación en conjunto, ya que se ha comprobado que ambas pueden proveer protección inmune completa, aunque en diferente locación y tiempo (Díaz-Zaragoza, 2015; Baumgarth *et al.*, 2000). Además otro punto en consideración, es la poca variabilidad obtenida, la cual radica en que se limitó a extraer específicamente proteína de membrana, reduciendo el espectro de reconocimiento.

El segundo punto, es el patrón de reconocimiento con respecto a la edad, ya que sólo se observa entre la semana 5 y 6 de edad, esto con el fin de observar el patrón generado donde hay cambios en las células transformadas, debido a que la quinta semana de edad forma una etapa crítica ya que hay lesiones no invasivas en tejido mamario y MT se expresa de forma potencial (Maglione *et al.*, 2001; Zagodzdon *et al.*, 2012). Datos no publicados de una hembra portadora de 7 semanas de edad, arrojan que posiblemente el cambio en el reconocimiento se genere después, por lo que abre la posibilidad de encontrar al o a los antígenos-anticuerpo candidatos a ser considerados como una herramienta de diagnóstico temprano. IgM natural tiene la capacidad de reconocer cambios mínimos en las estructuras de varios glico-epitopes modificados post-traduccionalmente, producto de glicosilaciones aberrantes de células en estado pre-canceroso y células cancerosas (Brändlein *et al.*, 2003 Vollmers and Brändlein, 2006), así mismo también participa en su eliminación, por lo que este tipo de reconocimiento posiblemente se esté generando después de la semana 6 de edad en ratones transgénicos PyVT. Por otro lado también se ha observado que IgM natural reconoce fracciones de péptidos localizados en el carboxilo terminal de diversas proteínas (Sokoloff *et al.*, 2001), así mismo participa en el reconocimiento y eliminación de células senescentes, restos celulares, células en estado pre y apoptótico (Ebrahimnezhad *et al.*, 2017; Zouali, 2015; Griffin *et al.*, 2011; Vollmers and Brändlein, 2009), tomando en cuenta el proceso de inmunoección en donde diversas células están siendo eliminadas por diversos componentes celulares y humorales (Töpfer *et al.*, 2011; Ravelli *et al.*, 2017).

Los resultados muestran el patrón de reconocimiento de IgM a antígenos asociados a membrana durante la semana 5 y 6 de edad de los ratones PyVT. Aunque los resultados no arrojan lo esperado con relación a encontrar posibles antígenos candidatos para considerarlos como una posible herramienta de diagnóstico temprano de la enfermedad de CaMa, dan un indicio a investigar al respecto, ya que posiblemente el reconocimiento se esté presentando después de la semana 6 de edad.

CONCLUSIONES

Los resultados describen patrón de reconocimiento de IgM a antígenos asociados a membrana de las semanas 5 y 6 de edad en ratones transgénicos PyVT. Se presentó una reacción antígeno-anticuerpo (spot) en común en los inmunoblots-2D, el cual tiene un peso molecular aproximado de 37 KDa y un punto isoeléctrico de 5 a la escala de pH.

Posiblemente el reconocimiento de IgM a antígenos tumorales, se esté llevando después de la semana 6 de edad, por lo que es necesario investigar al respecto, para encontrar el posible o posibles antígenos candidatos que sean considerados como herramienta de diagnóstico temprano de la enfermedad de CaMa.

LITERATURA CITADA

- Abbas A., A. Lichtman y S. Pillai. (2012). *Inmunología celular y molecular*. Séptima edición, Barcelona: Elsevier.
- Adluri S., T. Gilewski, S. Zhang, V. Ramnath, G. Ragupathi and P. Livingston. (1999). Specificity analysis of sera from breast cancer patients vaccinated with MUC1-KLH plus QS-21. *Breast Journal Cancer*, 79: 1806-1812.
- Akram M., M. Iqbal, M. Daniyal and A. U. Khan. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research / BioMed Central*, 50: 1-23.
- Albanopoulos K., A. Armakolas, M. Konstadoulakis, E. Leandros, E. Tsiompanou, S. Katsaragakis, D. Alexiou and G. Androulakis. (2000). Prognostic significance of circulating antibodies against carcinoembryonic antigen (anti-CEA) in patients with colon cancer. *American Journal Gastroenterology*, 95: 1056-1061.
- American Cancer Society [ACS]. (2008). *Breast Cancer Facts & Figures 2007 - 2008*. Atlanta: www.cancer.org/downloads/STT/BCFF-Final.pdf
- American Cancer Society. (2017). *Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018*. Atlanta: American Cancer Society, Inc: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2017-2018.pdf>
- Anderson B., C. Yip, R. Smith, R. Shyyan, S. Sener, A. Eniu, *et al.* (2008). Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries: overview of the breast health global initiative global summit 2007. *Cancer*, 113: 2221-43.
- Baumgarth N., O. C. Herman, G. C. Jager, L. E. Brown, L. A. Herzenberg and J. Chen. (2000). B-1 and B-2 Cell-derived Immunoglobulin M Antibodies Are Nonredundant Components of the Protective Response to Influenza Virus Infection. *Journal Experimental Medicine*, (192) 2: 271-280.
- Brändlein, S., T. Pohle and N. Ruoff. (2003). Natural IgM antibodies and immune surveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Research*, 63: 7995–8005.
- Brändlein S., M. Eck, P. Ströbel, E. Wozniak, H. Müller-Hermelink, F. Hensel and H. Vollmers. (2004). PAM-1, a natural human IgM antibody as new tool for detection of breast and prostate precursors. *Human Antibodies*, 13: 97-104.
- Brändlein S., N. Rauschert, L. Rasche, A. Dreykluft, F. Hensel, E. Conzelmann, H. Müller-Hermelink and H. Vollmers. (2007). The human IgM antibody SAM-6 induces tumor-specific apoptosis with oxidized low-density lipoprotein. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6: 326-333.
- Burnet F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research*, 13: 1–27.
- 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 Immunology Immunotherapy*, 45: 334-339.
- Capurro M., C. Ballaré L. Bover, P. Portela and J. Mordoh. (1999). Differential lytic and agglutinating activity of the anti-Lewisx monoclonal antibody FC-2.15 on human polymorphonuclear neutrophils and MCF-7 breast tumor cells. *In vitro and ex vivo studies*. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 48: 100-108.
- Cárdenas J., E. Bargalló, A. Erazo, E. Maafs y A. Poitevein. (2013). *Consenso Mexicano sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario*. Quinta revisión. Colima, México.
- Carson W., C. Shapiro, T. Crespín, L. Thornton and B. Andersen. (2004). Cellular Immunity in Breast Cancer Patients Completing Taxane Treatment. *Clinical Cancer Research*, 10: 3401-3409.

- Cazet A., S. Julien, M. Bobowski, M. Krzewinski-Recchi, A. Harduin-Lepers, S. Groux-Degroote and P. Delannoy. (2010a). Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydrate Research*, 345: 1377–1383.
- Cazet A., S. Julien, M. Bobowski, J. Burchell and P. Delannoy. (2010b). Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Research*, (12) 204: 13p.
- Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva [CNEGSR], Secretaría de Salud [SSA]. (2014). Cáncer de mama. Recuperado el 9 de septiembre de 2016, de: http://cnegrs.salud.gob.mx/contenidos/Programas_de_Accion/cancermama/introduccio_n_CM.html
- Coleman M., M. Quaresma, F. Berrino, J. Lutz, R. Angelis, R. Capocaccia, *et al.* (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncology*, 9: 730–56.
- Conry R., K. Allen, S. Lee, S. Moore, D. Shaw and A. LoBuglio. (2000). Human autoantibodies to carcinoembryonic antigen (CEA) induced by a vaccinia-CEA vaccine. *Clinical Cancer Research*, 6: 34-41.
- 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 International*. 14: 9p.
- Díaz-Zaragoza M. (2015). Análisis de variabilidad de la respuesta inmune humoral del carcinoma ductal de la mama en un modelo experimental murino. Tesis Doctoral. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México.
- Díaz-Zaragoza M., R. Hernández-Ávila, T. Govensky, L. Mendoza, D. Meneses-Ruiz and P. Ostoa. (2015a). Comparison patterns of 4T1 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: 1050-1058.
- Díaz-Zaragoza M., R. Hernández, R. Viedma, D. Arenas and P. Ostoa-Saloma. (2015b). Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer (Review). *Oncology Reports*, (1106) 4: 1106-1114.
- Ding H., X. Yang and Y. Wei. (2018). Fusion Proteins of NKG2D/NKG2DL in Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, (19) 177: 14p.
- Ebrahimnezhad S., M. Jazayeri, S. Hassanian and A. Avan. (2017). Current status and prospective regarding the therapeutic potential of natural antibodies in cancer therapy. *Journal Cell Physiology*, 232: 2649- 2652.
- Fluck M. and B. Schaffhausen. (2009). Lessons in Signaling and Tumorigenesis from Polyomavirus Middle T Antigen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73: 542–563.
- Gallegos I., R. Coutiño, G. Martínez y P. Hernández. (2008). Marcadores glicosilados en Cáncer de mama. *Revista de Educación Bioquímica*, (27) 2: 52-59.
- Ghandially H., L. Brown, C. Lloyd, L. Lewis, A. Lewis, J. Dillon, R. Sainson, J. Jovanovic, N. Tigue, D. Bannister, L. Bamber, V. Valgue-Archer and R Wilkinson. (2017). *British Journal of Cancer*, 116: 1208-1217.
- Gilewski T., G. Ragupathi, M. Dickler, S. Powell, S. Bhuta, K. Panageas, R. Koganty, J. Chin-Eng, C. Hudis, L Norton. (2007). Immunization of high-risk breast cancer patients with clustered sTn-KLH conjugate plus the immunologic adjuvant QS-21. *Clinical Cancer Research*, 13: 2977-2985.
- Gottlieb K. and L. Villareal. (2001). Natural Biology of Polyomavirus Middle T Antigen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, (65) 2: 288–318.
- Griffin D., N. Holodick and T. Rothstein. (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. *Journal Experimental Medicine*, 208: 67–80.

Han S., Q. Guo and T. Wang. (2013). Prognostic significance of interactions between ER alpha and ER beta and lymph node status in breast cancer cases. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*, 14: 6081–6084.

Hanahan D. and R. A. Weinberg. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674.

Heimburg-Molinario J., M. Lum, G. Vijay, M. Jain, A. Almogren, K. Rittenhouse-Olson. (2011). Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. *Vaccine*, 29: 8802–8826.

Instituto Médico del Seguro Social [IMSS]. (2015). Cáncer de Mama. Publicación del 15 de Julio de 2015. Recuperado el 7 de febrero de 2018: <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-mama>

Instituto Nacional de Salud Pública [INSP]. (2011). Detección temprana y manejo integral del cáncer de mama Manual dirigido para personal de medicina y enfermería del primer nivel de atención. Primera edición, Morelos, México. Estadística en México.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2016). “Estadísticas a propósito del...Día mundial de la lucha contra el Cáncer de Mama (19 de octubre)” Datos Nacionales. Aguascalientes, México.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2017). “Estadística a propósito del día Mundial contra el cáncer (4 de Febrero)” Datos Nacionales. Aguascalientes, México.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI] - Consejo Nacional de Población [CONAPO]. (2016). Estadísticas de Mortalidad. Cubos dinámicos: Proyecciones de la Población 2010-2050. México.

Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado [ISSSTE]. (2017). Consejos saludables para detectar el cáncer de mama. Publicación del 2 de Octubre de 2017. Recuperado el 7 de febrero de 2018: <https://www.gob.mx/issste/articulos/consejos-saludables-para-detectar-el-cancer-de-mama>

Kim R., M. Emi and K. Tanabe. (2007). Cancer immunoediting from surveillance to immune escape. *Immunology*, 121: 1-14.

Klimovich V. (2011). IgM and Its Receptors: Structural and Functional Aspects. *Biochemistry*, (76) 5: 534-549.

Knaut F., G. Nigenda, R. Lozano, O. Arreola, A. Langer y J. Frenk. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México*; 51 suplemento 2: S335-S344. Presenta las tendencias de mortalidad por este tumor y los problemas de cobertura, acceso y aceptación, tanto del tratamiento como de la detección temprana.

Konjević G., A. Vuletić and K. Mirjacić. (2016). Natural killer cell receptors: alterations and therapeutic targeting in malignancies. *Immunology Research*, 64: 25-35.

Li G., J. Hu and G. Hu. (2017). *Biomarker Studies in early Detection and Prognosis of Breast Cancer*. [Translational Research in Breast Cancer: Biomarker Diagnosis, Targeted Therapies and Approaches to Precision Medicine]. Springer, (1026) 2: 27-47.

Liu C., L. Tseng, J. Su, K. Chang, P. Chu, W. Tai, C. Shiao and K. Chen. (2013). Novel sorafenib analogues induce apoptosis through SHP-1 dependent STAT3 inactivation in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 15: R63.

Llanes-Fernández L., R. Álvarez-Goyanes, M. Arango-Prado, J. Alcocer-González, J. Mojarrieta, X. Pérez, M. López, S. Odio, R. Camacho-Rodríguez, M. 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: 482-489.

Lobo P. I. (2016). Role of Natural Autoantibodies and Natural IgM Anti-Leucocyte Autoantibodies in Health and Disease. *Frontiers in Immunology (Open Access)*, 7: 198.

- Maglione J., D. Moghanaki, L. Young, C. Katherine, L. G. Ellies, S. O. Joseph, B. Nicholson, R. D. Cardiff and C. L. MacLeod. (2001). Transgenic Polyoma middle-T model pre-malignant mammary disease. *Cancer Research*, 61: 8298-8305
- Manson J., C. Mauri, and M. Ehrenstein. (2005). Natural serum IgM maintains immunological homeostasis and prevents autoimmunity. *Springer Seminars in Immunopathology*, 26: 425–432.
- Martínez G., P. Uribe y M. Hernández. (2009). Políticas públicas para la detección del cáncer de mama en México. *Salud Pública de México*, 51: S350-S360.
- Matsuura, K., Y. Yamaguchi, H. Ueno, A. Osaki, K. Arihiro and T. Toge. (2006). Maturation of dendritic cells and T-cells response in sentynel lymph nodes from patients with breast carcinoma. *Cancer*, 106: 1227-36.
- Mincheva L. and V. Baranov. (2014). Cancer exosomes and NKG2D receptor-ligand interaction: Impairing NKG2D-mediated cytotoxicity and anti-tumour immune surveillance. *Seminars in Cancer Biology*, 28: 24-30.
- Monzavi-Karbassi B., L. Hennings , C. Artaud, T. Liu, F. Jousheghany, A. Pashov, R. Murali, L. Hutchins and T. Kieber-Emmons. (2007). Preclinical studies of carbohydrate mimetic peptide vaccines for breast cancer and melanoma. *Vaccine*, 25: 3022-3031.
- Munkley J. (2016). The Role of Sialyl-Tn in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, (17) 275: 9p.
- National Cancer Intelligence Network and Cancer Research UK [NCIN]. (2016). Routes to diagnosis of cancer by stage, 2012-2013 workbook (link is external). London: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/breast-cancer/diagnosis-and-treatment#ref-1>
- Nelson D. and M. Cox. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Forth edition.
- Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011. (2011). Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. *Diario Oficial*. Segunda sección. México. Recuperado el 7 de febrero de 2018: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/equipoMedico/normas/NOM_041_SSA2_2011.pdf
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015). Cáncer. Nota descriptiva N°297. Recuperado el 2 de enero de 2017, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- 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. *Journal Immunology Methods*, 351: 46–54
- Pulaski B. A. and S. Ostrand-Rosenberg. (2000). Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*, 20.2.1-20.2.6.
- Paluck K., L. Coussens and J. O´Shaughnessy. (2013). Dendritic Cells, Inflammation and breast Cancer. *Cancer Journal*, 19: 6p.
- Pashov A., B. Monzavi-Karbassi and T. Kieber-Emmons. (2009). Immune surveillance and immunotherapy: Lessons from carbohydrate mimotopes. *Vaccine*, 27: 3405-3415.
- Pohle T, S. Brändlein, N. Ruoff, H. Müller-Hermelink, H. Vollmers and H.P. Vollmers. (2004). Lipoptosis: Tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation. *Cancer Research*, 64: 3900-3906.
- Rabinovich G. (2004). *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. Un nexo entre la investigación biomédica y práctica clínica*. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

- Ragupathi G., N. Liu, C. Musselli, S. Powell, K. Lloyd and P. Livingston. (2005). Antibodies against tumor cell glycolipids and proteins, but not mucins, mediate complement-dependent cytotoxicity. *Journal Immunology*, 174: 5706-5712.
- 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 a target for antibody-based therapy. *Laboratory Investigation*, 88: 375-386.
- Ravelli A., G. Roviello, D. Cretella, A. Cavazzoni, A. Biondi, M. R. Cappelletti, L. Zanotti, G. Ferrero, M. Ungari, F. Zanconati, A. Bottini, R. Alfieri, P. G. Petronini and D. Generali. (2017) Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility (review). *Tumor Biology*, 8p.
- Regueiro J., C. López, S. González y E. Martínez. (2010). *Inmunología: Biología y patología del sistema inmunitario*. Editorial Médica Panamericana. Madrid España.
- Richichi B., B. Thomas, M. Fiore, R. Bosco, H. Qureshi, C. Nativi, O. Reunader and L. BenMohamed. (2014). A Cancer Therapeutic Vaccine based on Clustered Tn-Antigens Mimetics induces Strong Antibody-Mediated Protective Immunity. *Angewandte Chemie International Edition*, 53: 11917-11920.
- Rodríguez R. and C. Padilla. (2008). Compromiso del Sistema Inmune en pacientes con Cáncer de Mama, 3: 191-197.
- Sarmiento-Rubiano L. (2015). Tumor associated antigens and its potential use in cancer therapy. *Salud Uninorte. Barranquilla*, (31) 1: 119-138.
- Shishido, S., S. Varahan, K. Yuan, X. Li, and S. Fleming. (2012). Humoral innate immune response and disease. *Clinical Immunology*, 144: 142–158.
- Sokoloff A. V., I. Bock, G. Zhang, S. Hoffman, J. Dama, J. J. Ludtke, A. M. Cooke and J. A. Wolf. (2001). Specific Recognition of Protein Carboxy-Terminal Sequences by Natural IgM Antibodies in Normal Serum. *Molecular Therapy*, 3: 821-830.
- Soliman C., E. Yuriev and P. Ramsland. (2017). Antibody recognition of aberrant glycosylation on the surface of cancer cells. *Current Opinion in Structural Biology*, 44: 8p.
- Töpfer K., S. Kempe, N. Müller, M. Schmitz, M. Bachmann, M. Cartellieri, G. Schackert and A. Temme. (2011) Tumor evasion from T cell surveillance. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 91847: 19p.
- Vas J., C. Grönwall and G. Silverman. Fundamental roles of the innate-like repertoire of natural antibodies in immune homeostasis. *Frontiers in immunology*, 4: 8p.
- Vollmers H. and S. Brändlein. (2006). Natural IgM antibodies: The orphaned molecules in immune surveillance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58: 755 – 765.
- Vollmers H. and S. Brändlein. (2009). Natural antibodies and cancer. *New Biotechnology*, 25: 5p.
- Vollmers H. and S. Brändlein. (2005). The “early birds”: natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histology and Histopathology*, 20: 927-937.
- Wang M., C. Zhang, Y. Song, Z. Wang, Y. Wang , F. Lou, Y. Xu, Y. Zhao, Z. Wu and Y. Wu. (2017). Mechanism of immune evasion in breast cancer. *OncoTargets and Therapy*, 10: 1561-1573.
- World Health Organization [WHO]. (2007). *Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes: early detection*.
- Zagozdzon A., P. O’Leary, J. Callanan, J. Crown, W. Gallagher and R. Zagozdzon. (2012). Generation of a new bioluminescent model for visualisation of mammary tumor development in transgenic mice. *Biomedical Central Cancer*, 12: 209.
- Zhang Z., M. Wuhler and S. Holst. (2018). Serum sialylations changes in cancer. *Glycoconjugate Journal*, 35: 139-160.

Zhou Z., A. Tzioufas and A. Notkins. (2007). Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *Journal of Autoimmunity*, 29: 219-228

Zhou A., N. Ichnaso, A. Adamareck, V. Zila, J. Forstova, N. Dibb and S. Dilworth. (2011). Polyomavirus Middle T-Antigen Is a Transmembrane Protein That Binds Signaling Proteins in Discrete Subcellular Membrane Sites. *Journal of Virology*, (85) 7: 3046–3054.

Zouali M. (2015) Natural Antibodies. In: eLS. John Wiley & Sons, 12p.