



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CÉLULAS
CITOTÓXICAS EFECTORAS INFILTRANTES
DE TUMOR EN PACIENTE CON
ADENOCARCINOMA PULMONAR PRODUCTOR DE MUC1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON
ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

JOSÉ AGUSTÍN ATZIN MÉNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
PATRICIA SOFÍA GOROCICA ROSETE

MÉXICO, D.F.

MAYO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Mi agradecimiento expresado de manera especial a los integrantes de mi comité tutorial y para los miembros del honorable jurado.

A la **Dra. Yolanda López Vidal** por su invaluable apoyo en la realización de este proyecto.

A la **Dra. Patricia Gorocica Rosete** por la dedicación y señalamientos que realizo a lo largo de todo el proyecto, gracias a los cuales este proyecto alcanzo su definición final.

Al **Dr. Francisco Javier Sánchez** por sus interesantes observaciones en las evaluaciones tutorales.

Al **Dr. Federico Ávila Moreno** por su minuciosa revisión al trabajo y aportaciones en las evaluaciones tutorales.

Al **Dr. Ricardo Lascurain Ledesma** por sus recomendaciones trascendentales y oportunas en el manuscrito.

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.**

Al **Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada para realizar los estudios de Maestría, con número de registro 13246.

El trabajo realizado durante este estudio lo dedico con mucho cariño por todo su apoyo a María del Rosío Méndez Vásquez, José Atzin García, Opalo Hernández, Atziri Atzin, Leticia Cuevas, María Arenas, Rafael Wong Michell, Silvia Méndez, Lauro Morales y Griselda Morales.

INDICE

Resumen:	1
Abstract:	3
Introducción:	5
Clasificación del cáncer de pulmón.....	5
Factores de riesgo.....	8
Carcinogénesis pulmonar.....	8
Cambios moleculares en cáncer.....	10
Características de las moléculas glicosiladas asociadas a tumores.....	11
Modificaciones en la síntesis de glicanos en neoplasias.....	13
Características de la MUC1.....	16
Comportamiento tumoral asociado a MUC1.....	18
Antecedentes:	20
Justificación:	25
Planteamiento del problema:	25
Hipótesis:	25
Objetivo general:	26
Objetivos particulares:	26
Material y método:	27
Reactivos biológicos.....	27
Muestras biológicas.....	27
Inmunohistoquímica:	28
Desparafinación-Deshidratación.....	30
Recuperación de antígeno.....	31

Bloqueo de peroxidasa endógena	31
Inmunoreacción del anticuerpo	32
Revelado con diaminobencidina 3,3 (DAB	32
Contratinción con hematoxilina.....	33
Montaje de laminillas.....	33
Inmunohistoquímica con sistema de doble tinción.....	33
Evaluación para la inmunotinción.....	35
Digitalización y análisis de imágenes.....	36
Resultados:	37
Discusión:	46
Conclusión:	50
Perspectivas:	51
Bibliografía:	52
Anexos:	73
Anexo 1. Reactivos utilizados.....	73
Anexo 2. Material de laboratorio.....	75

Resumen:

MUC1 es una glicoproteína compleja muy ramificada que se expresa en la parte apical de epitelios normales, la cual cambia su distribución, su estructura y su antigenicidad en células tumorales en varios tipos de adenocarcinoma. La O-glicosilación de la MUC1 en las células neoplásicas está alterada, dando lugar a una MUC1 hipoglicosilada y solo se unen una GalNAc a la serina o treonina de la parte péptica de la molécula, generando el antígeno Tn (GalNAc-Ser/Thr) o una Gal adicional a la GalNAc generando el antígenos Thomsen-Friedenreich también llamado antígeno T (Gal-GalNAc-Ser/Th). La ramificación del antígeno T genera otros antígenos sacarídicos asociados a tumores como algunas variantes del antígeno Lewis como el Lewis^X. El adenocarcinoma es poco antigénico por tener antígenos expresados en células epiteliales de varios tejidos normales, por lo que la presencia de MUC1-Tn o MUC1-T en células neoplásicas puede romper esa tolerancia favoreciendo el infiltrado inflamatorio en la zona del tumor. Se sabe que MUC1-Tn o MUC1-T pueden activar de manera más eficiente la respuesta antitumoral de los linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTL). OBJETIVO. Identificar el fenotipo de células citotóxicas infiltrantes de tumores productores de MUC1-Tn en pacientes con adenocarcinoma pulmonar. MÉTODOS. Se utilizaron cortes histológicos de pulmón de pacientes con adenocarcinoma pulmonar con estadios clínico III y IV, así como, muestras control, de víctimas de traumatismos. Se determinó en las células tumorales el patrón de antígenos tumorales sacarídicos asociados a la forma hipoglicosilada de MUC1 (Tn y T) y a la forma hiperglicosilada de MUC1 (Lewis^X y SL^X); así como, los fenotipos celulares de las células infiltrantes, por medio de inmunohistoquímica, empleando anticuerpos monoclonales (AbM). La evaluación se realizó mediante microscopía de luz y por análisis digital de imágenes. RESULTADOS. Se identificaron 4 variantes histológicas del adenocarcinoma, sin presentarse diferencias significativas en el infiltrado inflamatorio, ni en la expresión de antígenos. Las poblaciones efectoras más importantes fueron: CTL (76.63%), células T CD4+ (30.51%) y células CD57+ (9.74%), con moléculas de activación CD69 (34.47%) y CD25 (8.30%). Hubo una correlación positiva entre MUC1 con los antígenos Tn y Lewis^X pero no para los

antígenos T y sialil lewis^X. Además la expresión de MUC1 correlaciona con los CTL pero no con las demás poblaciones celulares. DISCUSION: MUC1 presente en la superficie de las células neoplásicas muestran cadenas sacarídicas muy cortas con antígeno Tn, pero algunas regiones de la molécula también expresan antígenos Lewis^X que surgen a partir de la ramificación y fucosilación del antígeno T. Lo que indica que la biosíntesis de MUC1 se altera en células tumorales. La marca con AbM anti-T fue muy escasa en las células neoplásicas, por lo que posiblemente en esas células el epitope no se genero o se ramifico para la formación del antígeno Lewis^X. MUC1-Tn puede ser considerada como marcador de pronóstico para pacientes con adenocarcinoma pulmonar porque tiene una correlación positiva con la presencia del infiltrado inflamatorio sobretodo con las CTL.

Abstract

MUC1 is a high molecular weight O-glycoprotein, which is found on apical membrane in the majority of normal epithelial cells. Numerous alterations of mucin-associated carbohydrates can be detected in neoplastic epithelial tissue mucin-like proteins, and particularly in the antigenicity properties and cellular distribution of MUC1 in patients with lung adenocarcinoma.

The abnormal glycosylation of MUC1 in neoplastic cells is formed for only one GalNAc molecule bound to serine (Ser) or threonine (Thr) on the protein backbone, which generates the Tn antigen (GalNAc-Ser/Thr). Likewise, the binding of the saccharidic residues Gal and GalNAc to Ser or Thr originates the Thomsen-Friedenreich antigen also called T antigen (Gal-GalNAc-Ser/Th). The branching of the antigen T originates several carcinoma-associated oligosaccharides such as Lewis^X antigen. Adenocarcinoma cells are poor antigen because exhibit the same antigens of the majority of epithelial cells. MUC1-Tn or MUC1-T in tumoral cells can break the immune tolerance and produce inflammatory response with infiltrate of immune cells into the area of tumor. It is known that MUC1-Tn or MUC1-T can activate in a more efficient way, the anti-tumor response of cytotoxic T lymphocytes (CTL). OBJECTIVE. To identify the phenotype of infiltrant cytotoxic cells in lung adenocarcinoma of patients, which express hypoglycosylated MUC1. METHODS. Tissue specimens of lung adenocarcinoma from patients in clinical stages III and IV were used. Immunohistochemistry for CD4, CD8, and CD57 markers, and tumor saccharide antigens such as MUC1, Tn, T, Lewis^X, and sialyl-Lewis^X (SL^X) was evaluated by monoclonal antibodies (mAbs) on paraffin embedded tissue sections. RESULTS. Four subtypes of adenocarcinoma were identified, no significant difference was observed in inflammatory cells, or in the expression of tumoral antigens. The number of CD8⁺ cells (76.63%), CD57⁺ cells (9.74%), and CD4⁺ cells (30.51%) increased throughout the tumor peripheral zone. The majority of the cells expressed activation markers CD69 (34.47%) and CD25 (8.30%). There was a correlation between MUC1 either with the Tn antigen or Lewis^X antigen, but not for the T and sialyl-Lewis^X antigens. In addition, the

MUC1 expression also correlated with the CTLs, but not with other cellular populations. DISCUSSION: MUC1 in the surface of tumoral cells shows short sacarídic chains (Tn antigen), but also they express Lewis^X antigens that arise from branching and fucosilation of the T antigen, suggesting altered biosynthesis of MUC1 in tumor cells. The staing of mAbs to T antigen was weak in tumor cells, probably because these cells contain hidden the T antigen with other monosaccharides during the biosynthesis of the Lewis^X antigen. MUC1-Tn can be considered as marker for patients with lung adenocarcinoma, because there is a good correlation with the infiltrated inflammatory CTL.

Introducción:

El cáncer de pulmón es la enfermedad resultante del crecimiento anormal de células en el tejido pulmonar y es una de las principales causas de muerte en el mundo. El cáncer pulmonar es uno de los más frecuentes tanto en México como en la mayoría de los países desarrollados. La tasa de mortalidad para los tumores malignos de tráquea, bronquios y pulmón es de 6.5 por cada 100,000 habitantes ocupara el 13avo lugar en mortalidad, aumentando la incidencia, siendo más frecuente en personas mayores de 65 años (INEGI, 2002). En los últimos 10 años por el aumento en las expectativas de vida de la población esta tasa se ha incrementad a 85.8 por cada 100,000 habitante, lo que provoca una mayor demanda de atención médica especializada habitantes (Franco, 2001). En un reporte del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) se reportó en 2002, el 60% de esos casos de cáncer pulmonar comprendidos entre el periodo de 1983 a 1996 fuerón de adenocarcinomas pulmonares (Medina 2000) y llama la atención que a nivel mundial la incidencia va en aumento, sobre todo en adultos jóvenes de ambos sexos (Green 1993.Torky 1990, Perng 1996).

Clasificación del cáncer de pulmón.

El cáncer pulmonar se clasifica según su origen y su comportamiento clínico en dos grandes grupos: 1) carcinomas pulmonares de células pequeñas (SCLC) y 2) carcinomas pulmonares de células no pequeñas (NSCLC). El SCLC también llamado carcinoma de células en avena es el más asociado al tabaquismo (Rivera 2002 y Keith 2009) y es la forma de cáncer pulmonar más agresiva y generalmente comienza en los conductos aéreos (bronquios). Aunque las células cancerosas son pequeñas, crecen rápidamente y forman tumores grandes. Estos tumores a menudo se diseminan con rapidez a otras partes del cuerpo, incluyendo el cerebro, el hígado y el hueso (Rivera 2002). En cambio el CPCNP es más frecuente y tiene comportamiento menos agresivo y presenta variedades

histológicamente heterogéneas. Se agrupan por razón de que su pronóstico y tratamiento son muy similares.

Las variedades o tipos más comunes de NSCLC son el carcinoma de células epidermoides o escamosas, el carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma. Estos tipos histológicos presentan similitudes en cuanto a los métodos empleados para su diagnóstico, en la fase de desarrollo clínico (estadificación de acuerdo a la clasificación TMN), el pronóstico y el tratamiento.

De acuerdo con la clasificación de la OMS (WHO) en 2004, el adenocarcinoma de pulmón presenta diversos tipos, subtipos y variantes. Pueden presentarse desde lesiones preinvasivas hasta lesiones malignas. Inicialmente en forma de adenoma (un tumor glandular que es benigno) y generar las diversas formas malignas.

Tipos

1. Adenocarcinomas (subtipos mixtos)
2. Adenocarcinoma acinar
3. Adenocarcinoma papilar
4. Carcinoma bronquioalveolar
 - a. Mucinoso
 - b. No mucinoso
 - c. Mezcla de mucinoso y no mucinoso o indeterminado
5. Adenocarcinoma sólido con producción de mucina

Variantes

- Adenocarcinoma fetal bien diferenciado.
- Adenocarcinoma mucinoso (coloide)
- Cistoadenocarcinoma mucinoso.
- Adenocarcinoma de células en anillo de sello.
- Adenocarcinoma de células claras.

Los adenocarcinomas representan un 29,4% de todos los tipos de cáncer de pulmón. El adenocarcinoma se desarrolla a partir de las células epiteliales y

células de las glándulas bronquiales y se localiza principalmente en los bordes del pulmón (nódulos pulmonares) en el 75% de los casos y está constituido por células binucleadas productoras de mucinas en el 80% de los casos. Con frecuencia el tumor se desarrolla lentamente y no suele causar síntomas en sus estadios iniciales; como resultado, el adenocarcinoma a menudo se descubre y diagnostica en estadios avanzados. (Rivera et al., 2002).

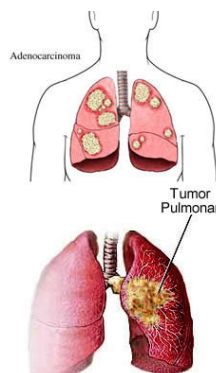


Figura 1. **Localización del adenocarcinoma pulmonar**

El criterio diagnóstico se basa principalmente en la arquitectura del tejido. La mayoría de los casos el diagnóstico se basa en pequeñas biopsias que en ocasiones no permite observar toda la arquitectura del tejido, creando problemas en el diagnóstico, por lo que el diagnóstico se establece en base a la identificación de marcadores tumorales por técnicas histoquímicas que ayudan a esclarecerlo (figura 1)(Rivera 2002).

El Comité Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC) y la Union Internacional Contra el Cáncer (CCIU) adoptaron en 1997 el Sistema Internacional de Estadificación para el Cáncer de Pulmón. El AJCC designó 4 estadios mediante la clasificación TNM: tumor primario (T), ausencia o presencia de metástasis a ganglio linfático regional (N) y ausencia o presencia de metástasis a distancia (M) (Mountain 1997, Edge 2010).

El estadio I se divide en dos categorías según el tamaño del tumor: IA (T1, N0, M0) y IB (T2, N0, M0). El estadio II se divide en dos categorías según el tamaño del tumor y según el estado ganglionar: IIA (T1, N1, M0) y IIB (T2, N1, M0). T3. N0 se cambió del estadio IIIA de la versión de 1986 del sistema de estadificación al estadio IIB de la última versión del 2007. La metástasis ipsilateral intrapulmonar en

un lóbulo que no sea el de la lesión primaria se debe clasificar como lesión M1 (estadio IV).

Factores de riesgo.

El factor de riesgo se define como toda aquella circunstancia o situación que aumenta las probabilidades de una persona de contraer una enfermedad. En general los factores de riesgo para el cáncer pulmonar son diversos, pero destacan: tabaquismo (responsable del 90% de los casos en varones y del 55-80% de los casos entre las mujeres en los países de mayor incidencia), exposición a radiación, gas radón; contaminantes ambientales (debido a la inhalación de partículas suspendidas catalogadas pm10), malos hábitos alimenticios; exposición a compuestos químicos como asbestos, arsénico, cloruro de vinilo, cromato de níquel, clorometilo de éter, entre otras sustancias; en cuanto a los marcadores de riesgo (que son características de la persona que no pueden modificarse) se involucran inmunodeficiencias primarias o secundarias, edad avanzada y susceptibilidad genética (Nyberg 1998, Lam 1999, Knaapen 2004, Pfeifer 2004). Para el caso del adenocarcinoma aún no se conoce con certeza la etiología (Hackshaw 1997), pero se encuentra asociado lesiones cicatrizales en pulmón producto de inflamación crónica en los pacientes, como la asbestosis y la tuberculosis (Heintz 2010, Engels 2009). Con frecuencia estas lesiones cicatrizales genera una reacción dermoplástica es decir proliferación del tejido fibrogénico dentro de o adyacente a la zona de inflamación crónica como parte del proceso de reparación.

Carcinogénesis pulmonar.

Durante la carcinogénesis del adenocarcinoma pulmonar se presentan cambios morfológicos, moleculares y bioquímicos parcialmente definidos. Un adenoma es un tumor epitelial benigno cuya estructura interna es semejante al de una glándula. Es frecuente que puedan desarrollarse hasta adeocarcinomas o tumores

de células epiteliales malignos. Se plantea que algunos eventos que tienen su base en alteraciones celulares y moleculares dan origen al adenocarcinoma que van desde lesiones preneoplásicas hasta lesiones malignas, destacando entre ellas:

- *Metaplasia escamosa*: Es el cambio de un epitelio maduro por otro maduro más resistente como es el escamoso poliestratificado. En ciertas ocasiones la metaplasia implica una regresión en la especialización o maduración de las células hacia formas más primitivas para más tarde madurar hacia otra clase de células. Esto puede ocurrir como una respuesta fisiológica a cierto tipo de cambios o bien formar parte de los fenómenos que suelen acompañar a la transformación epitelial neoplásica en cáncer.
- *Displasia*: Es una anomalía en el aspecto de las células debido a los disturbios en el proceso de la maduración de la célula. Puede presentarse en 3 grados (leve, moderada y severa), que van desde una simple distorsión epitelial del área metaplásica hasta cambios citológicos de evidente proliferación, con atipia e imágenes de mitosis, siendo difícil de separar del carcinoma.
- *La hiperplasia adenomatosa atípica*: es reconocida como la lesión precursora del adenocarcinoma y muchas veces acompaña a la neoplasia plenamente desarrollada. Histológicamente, es una proliferación de los neumocitos que revisten los espacios alveolares, sin inflamación del estroma acompañante, hallazgo que le diferencia de los cambios reactivos inflamatorios. Esta lesión no altera la arquitectura pulmonar, por tanto no es infiltrante, este hallazgo es fundamental en el diagnóstico diferencial con el adenocarcinoma bronquioloalveolar, el cual suele ser difícil de establecer.
- *Carcinoma in situ*: Es la lesión de máxima alteración epitelial escamosa, siempre en la superficie, sin superar la membrana basal.

Cambios moleculares en cáncer.

Existen numerosos reportes acerca de los cambios moleculares que se presentan en las células en las primeras etapas de transformación neoplásica y que pueden ser de utilidad como marcadores tumorales en poblaciones de alto riesgo. Estos cambios frecuentemente se asocian al comportamiento de los tumores como la migración tisular, el reconocimiento o la evasión de la respuesta inmune contra tumores (Franklin 2000). Algunos cambios también son utilizados como marcadores tumorales utilizados en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del paciente.

Al respecto, se han descrito diversas modificaciones en las estructuras sacarídicas como parte del proceso de alteraciones moleculares en el cáncer. Por ejemplo, síntesis incompleta, acumulación de precursores, neosíntesis, así como cambios en la organización de carbohidratos de membrana (Singhal, 1990). Entre los principales cambios moleculares están los presentados en las glicoproteínas tipo mucinas, los proteoglicanos y los glicolípidos de la superficie celular (Singhal, 1990). Otros factores que se cree son indispensables para la progresión del tumor es la inhibición de genes claves tales como el gen supresor de tumor p16 y el FHIT. La inactivación del gen p53 y la activación de la telomerasa producen el cambio en el proceso de progresión neoplásica desde lesión premaligna hacia la maligna. Mucho del avance en el delineamiento de este tipo de lesiones se da a nivel molecular, pues histológicamente diferenciarlas puede llegar a ser muy difícil. Molecularmente, se considera que hay pérdida inicial de la inhibición del oncogén k-RAS, prácticamente en todas las lesiones; pérdida de la heterocigocidad de los cromosomas 3p, 9p y 17p en aquellas lesiones con atipia de moderada a severa y acumulación de la proteína p53, la cual se observa hasta en la mitad de las lesiones severas.

Características de las moléculas glicosiladas asociadas a tumores.

Las moléculas glicosiladas se caracterizan por la naturaleza de la unión que presenten entre la parte proteica o lipídica y el carbohidrato. Existen varios tipos de glicanos (figura 2), los más comunes son los N-glicanos, que son complejos macromoleculares formados a partir de un precursor sintetizado en el retículo endoplásmico rugoso (RER). La mayoría de las glicoproteínas presentan glicosilación de tipo N, caracterizada por la unión de la cadena oligosacáridica a la secuencia peptídica, la que se establece mediante un enlace entre N-acetilglucosamina (GlcNAc) y un residuo de asparragina. Las enzimas encargadas en unir los carbohidratos a las proteínas se conocen de manera general como glicosiltransferasas (GTs) pero cada una es específica para cada tipo de azúcar incorporada (Van den Steen, 1998b). Existen más de 100 GTs y su expresión dependen de los estímulos, la estirpe celular, la fase del ciclo celular y al grado de diferenciación (Chandrasekaran 2006, Freire, 2002). Los N- glicanos son formados a partir de un precursor sintetizado en el RER. A diferencia de la N-glicosilación, se han identificado diferentes tipos de O-glicosilación. La más frecuente se encuentra determinada por la unión de un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a serinas o treoninas presentes en el esqueleto polipeptídico. Este tipo de glicosilación se conoce como glicosilación tipo mucina, debido a que determina la unión de las numerosas cadenas oligosacáridicas presentes en las mucinas (glicoproteínas de muy alto peso molecular que recubren la superficie de diferentes tipos celulares). Una proteína puede presentar únicamente carbohidratos con uniones de tipo N, o únicamente carbohidratos con uniones de tipo O, así como una combinación de carbohidratos con ambos tipos de uniones (Varki, 2009). Dentro de las alteraciones moleculares más notorias de las células cancerosas, se encuentra la expresión de antígenos producidos por O-glicosilación incompleta (Brockhausen, 1999), los cuales han constituido la base de diferentes procedimientos de diagnóstico oncológico y están siendo evaluados en protocolos de inmunoterapia activa específica del cáncer (Danishefsky and Allen, 2000).

Las cadenas oligosacáridicas están constituidas por tres sectores principales: a) el núcleo o *core*, región donde se encuentran los carbohidratos más cercanos al sitio de unión con la cadena peptídica, b) el “esqueleto”, que determina la longitud de la cadena carbohidrata, y c) la región periférica, donde las ramificaciones de la estructura sacarídica genera algunos antígenos de importancia en las neoplasias como los antígenos de grupo sanguíneo.

Todos los oligosacáridos con uniones de tipo N presentan el mismo *core*, independientemente de cuál sea el tipo de elongación que ocurra posteriormente en la cadena de sacarídica. Ello se debe a que la N-glicosilación comienza con la síntesis de Glc3Man9GlcNAc2- Dolicolfofato, el cual es transferido en bloque a la cadena péptidica naciente en el retículo endopásmico. La complejidad estructural de las cadenas oligosacáridicas de tipo O es mucho mayor comparada con las de tipo N y ello ya se pone de manifiesto por la existencia de ocho tipos diferentes de *core* carbohidratos en la O-glicosilación, a partir de los cuales ocurre la elongación de la cadena oligosacáridica (Van den Steen et al. 1998). Contrariamente a lo que sucede en el inicio de la N-glicosilación, en la O-glicosilación los carbohidratos son transferidos individualmente a la cadena polipeptídica.

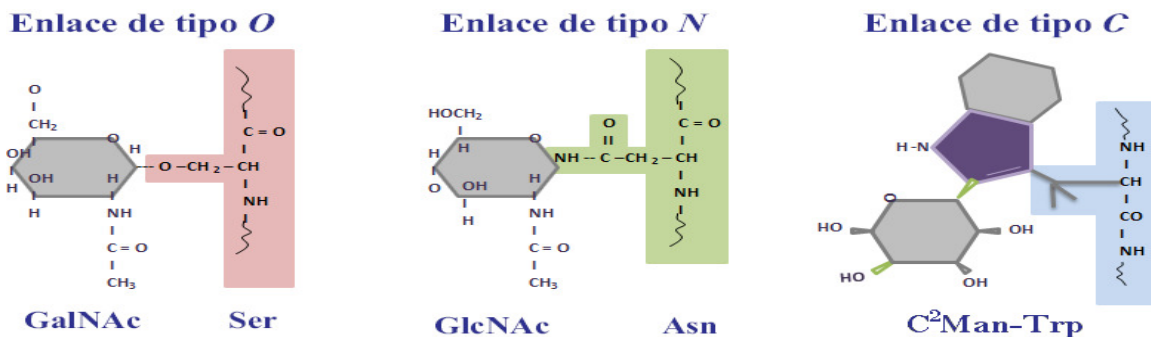


Figura 2. **Tipos de enlace de oligosacáridos a proteínas.** Enlace tipo O donde la GalNAc esta unida a residuos de Serina o Treonina. Enlace tipo N, en el cual la GlcNAc es unida a un residuo de Asparagina. Enlace tipo C donde la Manosa es unida al Carbono 2 de un residuo de Triptofano (C²Man-Trp).

En los O-glicanos la estructura básica formada entre la GalNAc-Serina o Trionina se conoce como antígeno Tn y este es el sustrato para varias GTs, a partir del cual se forman δ cores que dan lugar a la mayor parte de las estructuras O-

glicosiladas. La unión de una Galactosa (Gal) con una GTS específica (galactosiltransferasa) al antígeno Tn genera el disacárido Gal β 1,3GalNAc α -Ser/Thr conocido como antígeno Thomsen-Friedenreich (antígeno T).

En los antígenos tumorales es común encontrar 4 de los 8 tipos de *cores* (figura 2 y 3). Del *core* 1 característico del antígeno T (Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr) se forma el *core* 2 por la acción de la GlcNAc-T, pero en ocasiones y dependiendo de la activación de una Sialiltransferasa se une en lugar de la galactosa(Gal) un ácido sialico (NeuAc α 2-3) dando lugar al sialil-Tn. Este residuo de ácido sialico es una señal terminal de la biosíntesis, ya que no se pueden adicionar ningún otros carbohidratos a la estructura sialil-Tn, para generar una cadena sacarídica más larga. En cambio para formar el *core* 3 se adiciona una GlcNAc con enlace β 1-3 en el antígeno Tn (GalNAc-Ser/Thr) dando la estructura (GlcNAc β 1-Tn) de la cual se deriva el *core* 4 cuando se adiciona de una segunda GlcNAc sobre el antígeno Tn pero con enlace β 1,6 (GlcNAc β 1,6GlcNAc β 1,3-Tn), (Vaky, 2009). La estructura de las cadenas de carbohidratos con uniones de tipo O varía según el tipo celular y el tejido, pero en el cáncer el conjunto de GTs se encuentran alteradas tanto en su patrón como en su nivel de expresión (Vaky 2009). De los *cores* 2 y 3 se genera un grupo muy importante de antígenos tumorales (antígeno Lewis) por la adición de una fucosa. Este antígeno también están expresado en antígenos de grupos sanguíneos en células de sanguíneas normales (figura 3).

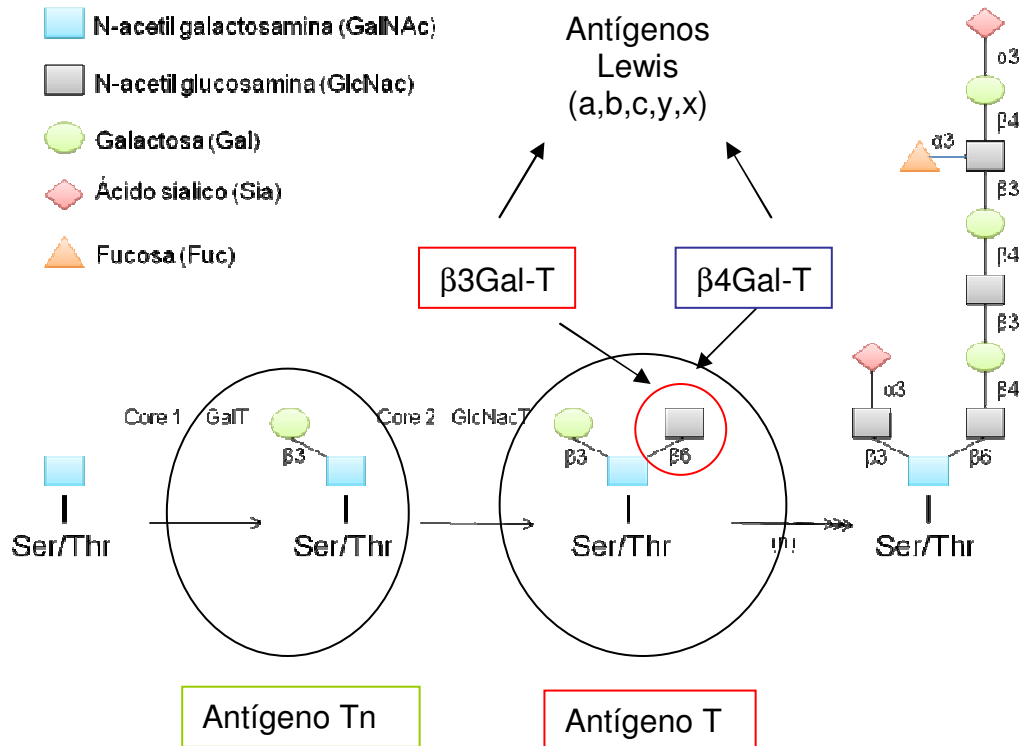


Figura 3. **Síntesis de los O-glicanos core 1 y core 2.** La síntesis de O-glicanos esta regulada por la actividad de la enzima Gal-T para el core 1 y para el core 2 por la enzima GlcNAc-T. La biosíntesis adicional de O-glicanos pueden contener grupos lactosaminicos (Gal β 1,4-GlcNAc), con ácido sialico o con fucosas(esquema modificado de Vaky 2009).

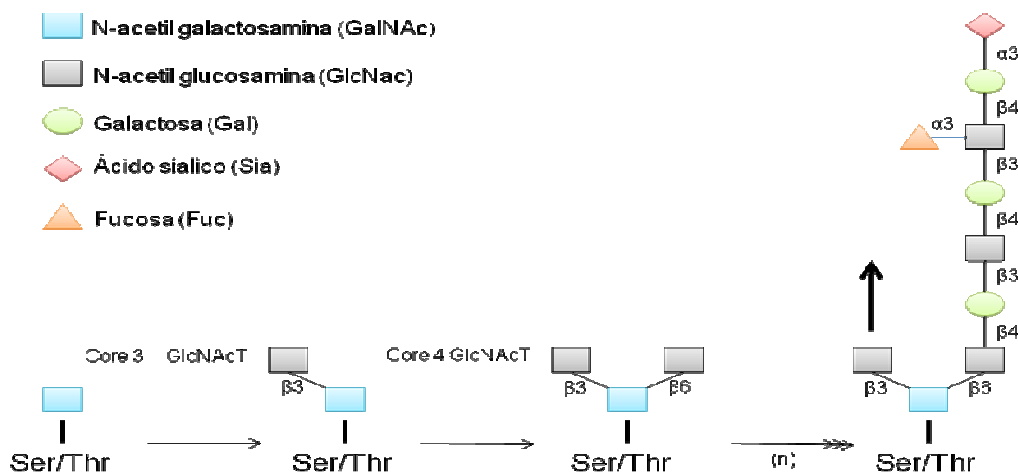


Figura 4. **Síntesis de O-glicanos core3 y core 4.** La síntesis depende de la actividad de la enzima GlcNAc-T. Además la biosíntesis de estos O-glicanos puede formar estructuras similares a una antena como en el core 2. La unión se lleva acabo de manera subsecuente flecha vertical (esquema modificado de Vaky 2009).

Modificaciones en la síntesis de glicanos en neoplasias.

Como consecuencia de la transformación maligna ocurren cambios muy importantes en la glicosilación (Varki, 2009), esto obedece a alteraciones en la codificación de las GTs, las cuales realizan la modificación normal de antígenos en el desarrollo humano. Se ha comprobado que la mayoría de las células neoplásicas desarrollan una elongación incompleta de las cadenas sacarídicas con uniones de tipo O, formando estructuras menos complejas. Esto determina que algunos tipos de *core*, que en las células normales se encuentran enmascarados por la adición de otros carbohidratos, queden expuestos en la superficie celular, resultando en la formación de nuevos antígenos asociados al cáncer (figura 3). Los mejor caracterizados son los antígenos Tn, T y sialil-Tn, presentes en más del 90% de los carcinomas, por lo que son considerados Antígenos Asociados a Tumor (TAAs) (Brockhausen I, 1999, Peracaula 2008). Tn y T también pueden expresarse en los linfomas de células T (Medina. 1999). Más recientemente, fueron identificadas otras dos estructuras asociadas a carcinomas en humanos que corresponden a cadenas truncadas de O-glicanos: el *core* 6 (Medina. 1999) y el antígeno Tn (Meichenin. 2000) algunos de estos antígenos han mostrado ser biomarcadores tempranos de malignidad. De acuerdo con las características del proceso de O-glicosilación, la expresión celular de una estructura de glicosilación incompleta, como Tn, muy probablemente corresponda a una alteración cualitativa o cuantitativa en la expresión de GTs responsables de la O-glicosilación de proteínas (Brockhausen I, 1999), o a la disponibilidad de sustratos mucínicos accesibles a las mismas.

Es posible que ante la agresión carcinogénica las células alteradas no expresen algunas GTs, por ejemplo, la que adiciona Gal y/o GalNAc de Tn, que tiene lugar en la elongación normal de las cadenas glicosídicas de tipo O.

Otro mecanismo que puede conducir a la acumulación de la estructura Tn en las células malignas puede estar influenciado por la secuencia peptídica de la proteína. Se han identificado diferentes genes que codifican mucinas humanas,

algunos de los cuales tienen expresión diferencial entre las células normales y las cancerosas, lo que conduce a la formación de mucinas con patrón de glicosilación aberrante (Moniaux et al. 2001). Esta expresión diferencial puede ocurrir en el proceso de transformación hacia la neoplasia. De hecho existen numerosos reportes donde se sugiere que hay una desregulación en la expresión de los genes de mucinas, entre ellas MUC1, MUC3, MUC4, MUC11, MUC12 durante la carcinogénesis (Sandra J. 2001).

Características de la MUC 1.

En los O-glicanos tipo mucina es común encontrar modificaciones estructurales durante procesos inflamatorios y neoplásicos. Las mucinas son uno de los principales componentes de moco, está codificada por 20 genes diferentes. La expresión de cada gen MUC es específica para el órgano, tejido y tipo celular. Las mucinas asociadas a membrana son MUC1, MUC3, MUC4, MUC11 y MUC12. Algunas tienen una expresión altamente regulada como MUC1 y MUC4 y se expresan de manera alterada cuantitativamente así como cualitativamente en tumores de diferentes orígenes histológicos, por lo cual se pueden utilizar con fines diagnósticos y pronósticos (Nakamori S, 1994). Las mucinas MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 y MUC7 son secretadas por las células epiteliales de diversos tejidos con neoplasias [Ho 1995, Reis 1997, Reis 1999, PERRAIS 2001, Lesuffeur 1994, Aksoy 2000, Guillem 2000, Ohgami 1999, Yu 1996).

En general se les caracteriza por ser proteínas de membrana con cola citoplasmática con dominios transmembranales conservada o secretoras (Engelmann, 2001). La función de las mucinas es proteger las células epiteliales del daño o contra patógenos. Se expresan en las superficies epiteliales del aparato respiratorio, gastrointestinal, reproductivo y extensiones de otros órganos (Rose 1992). Las mucinas son clasificadas por su esqueleto de proteína o apomucina, el cual tiene una región conocida como número variable de repetición en tándem (VNTR) donde se encuentran los sitios de de N y O-glicosilación. La región VNTR están compuestas por la secuencia de aminoácidos

PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA. La glicosilación de la MUC1 de tejido normal se extiende a través de toda apomucina encubriendo a la región VNTR., dicha VNTR tiene 5 posibles sitios de O-glicosilación. Las GTs y glicosidasas adicionan o eliminan algunos residuos de carbohidratos, respectivamente. Los carbohidratos en la MUC1 le dan una mayor rigidez y protege al péptido de cambios causados por solventes, además son los responsables de la elongación y ramificación de la molécula (Schumman 2000,2003).

Como ya se mencionó, la expresión de MUC1 está altamente desregulada en neoplasias, pero su mecanismo aún no está bien esclarecido. Su expresión está alterada, tanto cuantitativamente como cualitativamente, dependiendo del tejido en el que se exprese y de los factores hormonales presentes (Hey 1994, Hewetson 1997). Algunas citocinas también regulan la expresión de MUC1 como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gamma (IFN- γ) (Lagow 2002, Reddy 2003), al activar a los factores de transcripción llamados STATs (Gaemers, 2001), principalmente STAT3 (Yuan, 2004).

MUC1 se expresa de manera normal en células epiteliales ductuales en diversos tejidos inclusive en pulmón en personas sanas de manera altamente glicosilada (Leroy, 2002, Liu 2002, Sengupta 2001, Copin 2002, Lopez 2001, Ho 1993,1995, Gipson, 1998). MUC1 tiene varias funciones probables, tales como su participación en la reparación de áreas de ulceración en el intestino (Wright, 1990), o bien asociándola con la diferenciación de células epiteliales en órganos de humano tales como el pulmón (Guzman, 1996). El gen que codifica para MUC1 humana se localiza a largo del brazo del cromosoma 1 (1q21-24) y tiene de 4-7kb (kilobases) de longitud. El gen MUC1 tiene 7 exones de los cuales se generan 2 variantes o isoformas. Las isoformas transmembranales generadas por splicing alternativo designadas MUC1/Y y MUC1/X. La isoforma MUC1/X tan pronto como es sintetizada sufre autoproteólisis entre la glicina (G) y la serina (S) de la secuencia GSVVV que se encuentra dentro del un dominio conservado de 110 aa conocido como módulo SEA (sea urchin sperm protein) (Levitin ,2005), esto ocasiona

que la MUC1 sea secretada y por lo tal se encuentra en el suero de pacientes con cáncer de mama de estadio II (Hayes 1986).

Comportamiento tumoral asociado a MUC1.

Algunos antígenos sacarídicos participan también en la diseminación del tumor. Es común que algunos O-glicanos tipo mucina asociados a neoplasias generados por la ramificación de residuos de GlcNAc presenten antígenos asociados a grupos sanguíneos como el antígeno Lewis (Gal β 1-3GlcNAc-Fucos α 1-3Gal-O-Ser/Thr) o algunas de sus variantes estructurales como la A, B, X, Y o Z, (Dube, 1987, Osinaga 2007; Ugorski 2002; Croce 2001), así como el Sialil Lewis^x (NeuNAc α 2-3Gal β 134(Fuc α 1-3)GlcNAc3-O-Ser/Thr). El antígeno Lewis (Le) se expresa de manera normal en diferentes etapas de diferenciación de células sanguíneas y son importante durante la migración leucocitaria normal (Ugorski 2002). Durante los procesos neoplásicos, estas moléculas pueden sufrir modificaciones (Thurin 2002, Ugorski 2002; Ishikawa 1997) o aumentan su expresión en relación al progreso del tumor (Kawaguchi, 2007). En general las modificaciones en las estructuras sacarídicas afectan significativamente las propiedades físicas, tales como la carga y la masa de la proteína (Burchell, 2001). En el caso del Sia-Le^x y el Sia-Le^a que son las formas sialiladas del antígeno Lewis en condiciones normales que expresan en células sanguíneas, pero son sobreexpresadas en algunas neoplasias y su presencia favorecen la diseminación de las células tumorales ya que son ligandos naturales para las selectinas E (CD62E) y para la selectina P (CD62P), ambas moléculas de adhesión son expresadas en células endoteliales activadas durante el proceso inflamatorio (Ugorski, 2002; Kannagi, 2004, Sozzani, 2008).

Los residuos de ácidos siálicos proporcionan carga negativa por lo tanto pueden alterar la capacidad de unión de la proteína. Además el ácido siálico puede ser reconocido como un ligando para receptores tipo lectina como el SIGLEC en células dendríticas, así como otros receptores de la familia de las selectinas, por

ejemplo, el bloqueo las ramificaciones de oligosacáridos en las mucinas aumenta el número de ligandos de células cancerosas hacia los macrófagos (Sakamaki 1995). La adición de un ácido sialico a la cadena oligosacaridica es una señal de terminación en la biosíntesis de las glicoproteínas, debido a que no existe ninguna GTs que pegue carbohidratos sobre ácidos sialicos. De hecho la presencia del ácido sialico unido con enlace $\alpha 2,6$ en glicoproteínas de la superficie celular de células neoplásicas, permite una buena interacción de la célula con el colágeno de la matriz extracelular y disminuye la adhesión célula-célula, por lo que estos fenómnos se asocian a incrementar la capacidad de invasión de las células (Lin,2002). Esto se ha visto en las mucinas de cáncer de colón dende el aumento en la sialilación de la molécula se asocia con su potencial metastásico (Bresalier 1996, Itzkowitz 1992).

Antecedentes:

La respuesta inmune específica contra el tumor reconoce y destruye muchas células malignas. En estos casos, el sistema inmunológico reconoce antígenos mutados, oncoembrionarios o virales asociados al tumor que generalmente despiertan una respuesta inmunológica débil. En el caso de la MUC1 que es un TAA debido a que se expresan tanto en tejidos normales como en tejidos neoplásicos, por tal razón no es reconocidas por el sistema inmune, debido a que se presenta tolerancia en contra de ese antígeno. Algunos TAAs como MUC1 puede expresar epitopes antigénicos cuando presentan modificaciones estructurales y exponen estos epitopes modificados o bien en los mismos cambios estructurales pueden quedar expuestos epitopes que estaban anteriormente ocultos.

La expresión de MUC1 en la superficie de las células está incrementada prácticamente en todos los adenocarcinomas. La sobreexpresión o la expresión aberrante de MUC1 en tumores tiene diferente significado clínico dependiendo del tejido donde se expresa y el grado de glicosilación. Por ejemplo, la expresión aumentada de MUC1 hiperglicosilada en cáncer de colon, carcinoma ductal invasivo de páncreas, coloangiocarcinomas invasivo de hígado, carcinoma celular renal, cáncer gástrico, adenocarcinomas de esófago y cáncer de vejiga correlacionan con un pobre pronóstico (Yonezawa 1997, Leroy 2002)(Kocer 2004, Bladus 1998).

Hay reportes indicando que MUC1 hipoglicosilada puede activar la respuesta inmune debido a que estas estructuras incompletas genera nuevos epitopes el antígeno Tn y antígeno T (MUC1-Tn y MUC1-T (Stepensky, 2005), por lo que se han convertido en posibles blancos terapéuticos para algunos tipos de cáncer (Springer, 1988, 1989; Srinivasan, 2008). La MUC1 hipoglicosilada activa al sistema inmune adaptativo cuando las células dendríticas (DC) presentan de antígeno peptídico hacia las células T CD4+ en el contexto de las molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y MHC- II (Hiltbold, 1998, Vlad 2002).

La activación de los linfocitos T con el complejo MHC-I-MUC1-Tn o MHC-I-MUC1-T podría darse de la de la siguiente manera:

- 1.- La combinación carbohidrato-epitope del péptido puede ser un glicopéptido reconocido específicamente por las células T (Vlad 2002).
- 2.- La adición de glicanos puede alterar la conformación del péptido y puede dar como resultado el que no se acomode el péptido en la hendidura de la molécula de MHC-I, evitando la presentación adecuada del peptido.
- 3.- La glicosilación de MUC1 puede afectar la unión con anticuerpos anti- MUC1 (Barnd 1998).

Aunque MUC1 potencialmente genera tolerancia, en ocasiones esta se rompe y dar lugar a una respuesta inmunológica natural en situaciones especiales como en la lactación y el embarazo. Esto se ha confirmado por el hallazgo de anticuerpos anti-MUC1 en altas cantidades. Esto es relevante porque durante el embarazo y la lactancia existe un bajo riesgo de desarrollar cáncer de mama, por lo se considera que estos anticuerpos pueden ser protectores para mujeres con predisposición a cáncer de mama. Además en mujeres con cáncer de mama que se les induce la producción o que tienen niveles altos de IgG anti-MUC1, tienen pronósticos clínicos más favorables (Jerome 1996). Hay datos que indican que la respuesta inmunológica anti-MUC1 puede generarse en individuos sanos y apunta hacia la hipótesis de que una fuerte respuesta inmunológica anti-MUC1 puede prevenir el crecimiento del tumor. En algunos pacientes con cáncer de páncreas y mama, las células B son importantes en el control del tumor cuando se encuentran altos niveles de MUC1 en circulación (Plate 1999). Los pacientes con mejor pronóstico son los que tienen niveles altos de anticuerpos contra MUC1 hipoglicosilada (Von Mensdorff, 1996, Von, 2000). En base a estos antecedentes, se han desarrollado diferentes vacunas experimentales contra MUC1 y solo han sido probadas con éxito en ratones (Lofhouse 1997, Lees 1999, Musselli, 2002). Por tal razón se estudia a esta molécula para identificado epítopes antigénicos en pacientes con cáncer. Algunos epitopos identificados están restringidos para la molécula MHC-I (HLA-A2) que presenta el epítopo con secuencia LLLLTVLTV de MUC1 para

activar específicamente a los LTC en pacientes con mieloma múltiple (Choi 2005, Brossar 1999). Otros epítomos también restringidos a moléculas del MHC-I como HLA-A2 están en la región VNTR (STAPPVHNV y STAPPHGV)(Brossar 1999, Apostolopoulos 1997) y SAPDNRPAL (Pisarev, 2005).

A pesar que la mayoría de los tumores que expresan TAAs son poco inmunogénicos, se han encontrado infiltrados de células mononucleares con fenotipos de activación en la mayoría de los tumores sólidos, lo que demuestra una posible respuesta del huésped contra estos tumores. Estos infiltrados son heterogéneos y se componen de fagocitos mononucleares, linfocitos de diferentes subtipos y poblaciones minoritarias de mastocitos, células plasmáticas, etc. El Infiltrado linfocitario es definido como los linfocitos intraepiteliales localizados en la periferia de la masa tumoral. El significado del infiltrado inflamatorio intra y peri tumoral en cáncer es controversial porque no siempre está asociado la buena respuesta del paciente en contra del tumor (Nakakubu Y, 2003), además que las poblaciones de linfocitos presentes difieren de manera significativa entre el NSCLC con respecto a otros tipos de tumores como por ejemplo los tumores neuroendocrinos pulmonares que derivan de las células pluripotenciales. El infiltrado es más frecuente en los tumores pobremente diferenciados y hay una correlación entre el tamaño del tumor, el infiltrado inflamatorio y la sobrevivencia del paciente (Ruffini E, 2009).

Los linfocitos T han demostrado ser un mecanismo efector importante en la erradicación de los tumores en modelos experimentales con ratones (Melief CJM 1992, 1995), pero la presencia de las células inflamatorias no necesariamente hablan de la buena respuesta en contra del tumor, sino que su presencia en la zona del tumor puede tener diversos significados clínicos y biológicos. Los CTL son las poblaciones principales y constituyen una respuesta antitumoral efectora. Son capaces de matar a las células tumorales a través del reconocimiento directo de péptidos antigénicos presentados por las moléculas del MHC clase I (Imai K, 2000). En cambio las células T CD4+ también migran a la zona del tumor su papel antitumoral es dual dependiendo de las subpoblación presente pudiendo ser linfocitos reguladores (Treg) con el fenotipo CD4+ CD25+ FoxP3 o linfocitos

efectoras. Los primeros obstaculizan la función de los CTL al suprimirlos e indirectamente promueve el crecimiento del tumor y otras poblaciones de células T CD4+ activan a los CTL inhibiendo los mecanismos de inmuno-vigilancia en el huésped.

Los linfocitos T CD4+ y CD8+ se activan de manera más eficiente cuando MUC1 no está glicosilada o cuando solo tienen cadenas sacarídicas cortas (hipoglicosilada) con antígeno Tn y antígeno T expuesto (Hiltbold 1998 y 1999, Stepensky 2005, Vlad 2002). Sin embargo cuando la MUC1 está hiperglicosilada la capacidad de activación de los CTL disminuyen (Hiltbold,1999) debido a que hay una presentación de antígeno por MHC-I deficiente (Hiltbold, 1998, Hiltbold,1999).

Alternativamente de los CTL hay poblaciones citotóxicas existentes en el infiltrado de la zona del tumor como las células natural killer (células NK) que pueden destruir células tumorales de manera no específica y tienen un fenotipo CD2+, CD16+, CD161+, CD56+ y hay subpoblaciones con fenotipo CD57+. Las células NK tienen la capacidad de reconocer ligandos no-peptídicos (glicolípidos) presentados por la molécula no clásica de presentación antigénica CD1 (McNerlan, 1998 Okada T, 1995) y se ha reportado que lisan a células que expresan MUC1 (Wajchman, 2004). Estas células expresan el receptor CD94 que es un receptor tipo lectina que dimeriza con alguno de los receptores de inhibición de las células NK conocidos NKG2 (NKG2 A-D) por lo que interactúan con el Sia- Le^x de las células tumorales. Esta interacción puede inhibir o activar a células NK dependiendo del receptor NKG2 que dimeriza con el CD94 (Lanier LL, 1998). Las células NK no solo son citotóxicas, sino que también se les ha asociado al pobre pronóstico de pacientes con cáncer gástrico a corto plazo porque producen IFN- γ , TNF- α y GM-CSF, algunas quimiocinas como MIP-1 β y RANTES, lo que favorece la diseminación de las células tumorales (Ohyama Ch, 2002).

Hay poblaciones menores en el infiltrado inflamatorio en la zona del tumor como los linfocitos NKT que tienen propiedades inmuno-regulatorias debido a que producen citocinas como IL-4 e IFN- γ , expresan una actividad citotóxica

incrementada principalmente contra células tumorales (Kawano 1998) y en menor proporción células B productoras de anticuerpos específicos y macrófagos citotóxicos (Vgenopoulou S, 2003).

El comportamiento clínico, a veces impredecible de muchas neoplasias, ha intensificado la búsqueda de factores pronósticos con el fin de discriminar, dentro de un mismo estadio clínico, a los pacientes que evolucionarán favorablemente de las que no, con el objeto de individualizar el tratamiento según sea el caso. Dado que el infiltrado inflamatorio puede tener un pronóstico a favor o en contra dependiendo del estadio y grado de diferenciación de la neoplasia, así como también del tipo de antígenos y las propiedades inmunogénicas que tiene, el presente estudio plantea encontrar si existe alguna relación entre la presencia del infiltrado linfocitario y la expresión de los TAAs glicosilados con el curso clínico del adenocarcinoma pulmonar, bajo lo cual nos hemos planteado la siguiente justificación al proyecto.

Justificación:

Se ha sugerido que los TAAAs sacaridicos de MUC1 están implicados en la activación de Células T citotóxicas y que identificar las moléculas relacionadas con la activación *in situ* determina la función de dichas células.

Planteamiento del problema:

Las células tumorales son pobremente inmunogenicas porque provienen de tejido propio del paciente. El tipo de células presentes en la zona del tumor, así como los antígenos que expresa nos puede indicar el tipo de respuesta efectora que se presenta contra el tumor. El realizar una descripción fenotípica de las poblaciones citotóxicas *in situ* y los TAAAs sacarídicos que expresan podrían servir como factores pronósticos para pacientes debido a que puede darse una respuesta inmune contra el adenocarcinoma pulmonar productor de MUC1 hipoglicosilado.

Hipótesis:

La sobreexpresión de TAAAs sacaridicos en el adenocarcinoma pulmonar que expresa MUC1 hipoglicosilada correlaciona positivamente con la presencia de las células T citotóxicas infiltrantes del tumor.

Objetivo general:

Identificar el fenotipo de células citotóxicas efectoras infiltrantes de tumor *In situ* en tumores productores del antígeno MUC1 en pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

Objetivos particulares.

1. Identificar por medio de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales los TAAs sacarídicos (Tn, T, Sialil Lewis^X, Lewis^X) en cortes histológicos de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.
2. Identificar por medio de inmunohistoquímica las poblaciones de células T infiltrantes de tumor (CD8+, CD4+, CD57+) en cortes histológicos de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.
3. Identificar por medio de inmunohistoquímica las moléculas de activación CD25, CD69 en las células infiltrantes del tumor en cortes histológicos de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

Material y método:

Reactivos biológicos.

- Anticuerpos monoclonales de ratón contra CD8, CD15 (antígeno Lewis X) y CD57 de la marca Dako (E.U.A.); CD3, CD25 (IL2 receptor), CD69, MUC1-DF3 (antígeno glicosilado), T (antígeno) fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, UK); CD4, SLX (antígeno) de la marca Millipore; (E.U.A.); y finalmente el Tn218 (antígeno Tn) de Genetex (E:U.A.)
- Kit de doble marcaje de Dako (EnVision™ G/2 Doblestain System, Rabbit/Mouse–DAB+/Permanent Red) incluyen los anticuerpo secundario Polímero HRP y el Polímero AP Dako (E.U.A.), .

Muestras biológicas.

Se obtuvieron del departamento de patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias muestras de pulmón de 6 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar en estadio IV que habían fallecido en el INER y como control de las pruebas se incluyó 5 muestras histológicas obtenidas del Servicio Médico Forense que correspondieron a individuos sin datos patológicos aparentes fallecidos en accidentes automovilísticos. La estadificación de los pacientes fue de acuerdo al sistema de clasificación TNM (T: extensión del tumor primario, N: ausencia o presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales, M: ausencia o presencia de metástasis a distancia).

Todos los pacientes con adenocarcinoma pulmonar incluidos en el estudio incluyen antecedentes de tabaquismo y presentaron diversas metástasis (Tabla 1). El rango de edades de los pacientes fue de 55-77 años. Se incluyeron pacientes con diagnóstico confirmado conforme a la clasificación TNM, con expediente clínico y patológico completo. Mientras que, se excluyeron los casos con comorbilidades y expediente clínico incompleto (Tabla 1).

Inmunohistoquímica

Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y (funcionalidad) celular. La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares permite la localización microanatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio y proporcionando información adicional esencial en muchos casos.

Tabla 1. **Datos clínicos de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.**

Caso	Determinación Histopatológica	Sexo	Edad	Sobrevida después del Dx	Factores predisponentes	Metástasis
1	Adenocarcinoma bien diferenciado (APBD)	F	77	3 meses	Tabaquismo durante 40 años	Intestino, pleura, corazón, suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo,
2	Adenocarcinoma bien diferenciado (APBD)	F	55	3 meses	Tabaquismo durante 5 años	Intestino, pleura, corazón, suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo
3	Adenocarcinoma bien diferenciado	M	52	8 meses	Tabaquismo durante 8 años	Intestino, pleura, corazón,

	(APBD)					suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo
4	Adenocarcinoma de células grandes poco diferenciado (APCG)	M	80	9 meses	Tabaquismo durante 54 años	Intestino, pleura, corazón, suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo
5	Adenocarcinoma Broncoalveolar (APBA)	M	69	1.4 años	Tabaquismo Durante 13 años	Intestino, pleura, corazón, suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo
6	Adenocarcinoma de células transparentes (APCC)	F	56	2 meses	Tabaquismo durante 35 años y exposición humo de leña en la infancia	Intestino, pleura, corazón, suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo

Los casos se determinaron como estadio IV por medio de la clasificación TNM.

La técnica de inmunohistoquímica consiste en el reconocimiento específico de un antígeno y su detección por medio de un anticuerpo secundario para amplificar la reacción y visualizado por el desarrollo de color utilizando un cromógeno y una

enzima que al interactuar con su sustrato hay una reacción de oxido-reducción que al liberar electrón y el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) se oxida y genera radicales libres que interactúan entre ellos para generar polímeros color café. La técnica permite identificar dos antígenos en la superficie de la célula. En el caso particular de este trabajo se realizaron tinciones para una y/o dos antígenos. Para la tinción doble se utilizó un kit comercial en el que el primer antígeno se visualiza mediante el sistema estreptavidina peroxidasa (HRP)/DAB y el segundo antígeno mediante AP/Permanent Red. La técnica inicia con el uso del bloqueador de peroxidasa endógena que se encuentra presente en tejidos para evitar interferencia con el revelado con el sistema HRP/DAB. La técnica continúa con la incubación de los cortes con el anticuerpo primario de ratón o de conejo en cámara húmeda a 37°C por 60 minutos. Todos los anticuerpos utilizados fueron titulados previamente para conocer la dilución óptima de trabajo. Posterior enjuagar con Buffer TBS tween al .02%, los tejidos se incuban con el reactivo Polymer/HRP que es un polímero de dextrano y anti-Inmunoglobulinas de conejo y ratón conjugado con estreptavidina peroxidasa (HRP) que funciona como anticuerpo secundario universal. La reacción se visualiza mediante el uso del cromógeno DAB. Para las muestras que requieren identificar un segundo antígeno, se incuban un anticuerpo primario de ratón/conejo (previamente titulado), seguido de un enjuague con Buffer TBS tween al .02%, los tejidos se incuban con el reactivo Rabbit/Mouse-Link y enjuague con Buffer TBS tween al .02%. Por último se incuban un polímero de dextrano acoplado a fosfatasa alcalina y se revela la tinción utilizando Permanent Red Chromogen.

Procedimientos Inmunohistoquímica

Desparafinación-Deshidratación

Los portaobjetos fueron tratados con una solución de aminosilano al 3% en acetona, sumergiéndolos durante 5 minutos a temperatura ambiente lavados por un minuto con agua desionizada y secados a temperatura ambiente, se cortaron los tejidos y se incluyeron en parafina con un grosor de 4 µm. Se colocó en la

parte inferior del portaobjetos el corte histológico problema y en la parte superior se colocó el corte histológico testigo (control positivo), se idéntico cada laminilla con el número del bloque de la necropsia correspondiente y el anticuerpo a detectar. Además se añadió un corte problema como control negativo a cada prueba realizada. Se desparafinó los tejidos por medio de una incubación a 60 °C durante 60 min y se transfirió las muestras a la secuencia de Deshidratación/Hidratación (Tabla 2).

Recuperación de antígeno

El proceso de recuperación de antígenos tiene como finalidad exponer los determinantes antigénicos (epítomos), esto se llevó a cabo con el uso de una solución amortiguadora y un contenedor especial para microondas de la marca Nordic Ware de 2.37 L. Se colocaron las laminillas en un vaso coplin de plástico y se le agregó 50 ml de la solución recuperadora de antígeno (DIVA, Biocare Medical, E.U.A.). Se agregó al contenedor 500ml de agua destilada y se calentó 5min en el horno de microondas, posteriormente se colocó dentro del contenedor el vaso de coplin y se calentó en baño maría 5min. Antes de destapar el contenedor se enfrió a temperatura medio ambiente por 20min. Después de sacar las laminillas del vaso de coplin se lavaron con agua desionizada y se colocaron en una cámara húmeda.

Bloqueo de peroxidasa endógena

Las laminilla se bloquearon con 100 µl de la solución bloqueadora de peroxidasa y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo se enjuagaron con buffer TBS-Tween al .02%

Inmunoreacción del anticuerpo

La zona de análisis se delimito con un lápiz hidrófobo (Dakopen) y se aplicó directamente sobre los cortes 100µl de solución de anticuerpo primario previamente titulados incubando durante 60 min a 37°C en cámara húmeda (tabla 3), pasado el tiempo se lavarón con buffer TBS-Tween al .02% y se aplicó 100 µl de polímero-HRP (Dako, E.U.A.) incubando por 30 min. en las mismas condiciones.

Tabla 2. **Secuencia de Deshidratación/Hidratación.**

No.	Solución	Tiempo
1	Xilol	5 min.
2	Xilol	30 seg.
3	ETOH Abs. Anhidro	30 seg.
4	ETOH Abs. Anhidro	30 seg.
5	ETOH 96%	30 seg.
6	ETOH 96%	30 seg.
7	ETOH 80%	30 seg.
8	ETOH 70%	30 seg.
9	ETOH 60%	30 seg.
10	ETOH 50%	30 seg.
11	Agua destilada	30 seg.
12	Agua destilada	5 min.

Revelado con diaminobencidina 3,3 (DAB)

La reacción se reveló con una solución cromógena DAB y peroxido de hidrógeno, se colocó 100 µl cada una de los cortes histológicos se incubaron a temperatura ambiente de 5 a 10 min, monitoreando en el microscopio el

desarrollo de color para parar oportunamente la reacción con buffer TBS-Tween al .02% antes de que el tejido se dañe.

Contratinción con hematoxilina

Para visualizar las células y los núcleos, los cortes histológicos se contratiñeron con 100 µl hematoxilina (CAT Hematoxylin (Biocare, Medical, E.U.A.) durante 1 minuto, se enjuagaron con agua destilada y se viró la tinción con una solución de hidróxido de amonio al 0.35 M. hasta obtener la coloración azul celeste de la hematoxilina, se enjuagaron los cortes histológicos con TBS-tween al .02% y se escurrió el exceso de la solución.

Montaje de laminillas

Los cortes histológicos contrateñidos se deshidrataron sumergiéndolos en soluciones de alcohol, iniciando con alcohol al 70%, 75%, 80% y alcohol absoluto. Se secaron a temperatura ambiente y se montaron con el medio de montaje (EcoMount de Biocare Medical, E.U.A.).

Inmunohistoquímica con Sistema de doble tinción.

La inmunoreacción del primer anticuerpo primario se realizó de acuerdo al protocolo mencionado hasta el paso del revelado con DAB. El segundo antígeno se identificó incubando en los cortes histológicos el segundo anticuerpo primario en las mismas condiciones para los casos anteriormente descritos y de acuerdo a las condiciones de la tabla 3, seguido de un enjuague con Buffer TBS tween al .02%. Para el revelado del segundo anticuerpo primario se incubó 100 µl de anticuerpo secundario Rabbit/Mouse-Link (Dako E.U.A.) a 37⁰ C, se enjuagaron los cortes histológicos con Buffer TBS tween al .02%. además se incubó 100 µl del polímero de dextrano acoplado a fosfatasa alcalina Polymer/AP (Dako E.U.A.) a 37⁰ C, se enjuagó con Buffer TBS tween al .02%. Por último se reveló la presencia

del antígeno utilizando el cromogeno Permanent Red Chromogen (Dako E.U.A.) el cual fue aplicado a los cortes histológicos e incubar a temperatura ambiente de 5 a 10 min, monitoreando por medio del microscopio el desarrollo de color rojo antes de parar la reacción con un enjuagué TBS-tween al .02%. y se hizo la contratinción con hematoxilina y se montaron con resina.

Tabla 3. **Anticuerpos usados en la evaluación de Inmunohistoquímica.**

Anticuerpo Monoclonal Ratón	Recuperador Antigénico	Isotipo	Marca	Especificidad	Distribución de tinción	Dilución y tiempo de incubación	Anticuerpo Secundario y tiempo de incubación
CD57	Citratos pH. 7	IgM Kappa	Dako Cytomation	Subpoblaciones de linfocitos T CD57	Membrana Celular	1:50 60min	Polímero HRP 30min.
CD8	Citratos pH. 7	IgG1 Kappa	Dako Cytomation	Linfocitos T citotóxicos CD8	Membrana Celular	1:50 60min	Polímero HRP 30min.
MUC1	Citratos pH. 7	IgG1 Kappa	Abcam	Células epiteliales y algunos linfocitos T	Membrana Celular y citoplasma Normal Cáncer	1:100 60min	Polímero AP 30min.
Vimentina	Citratos pH. 7	IgM	Millipore	Células mesenquiales	citoplasma	1:100 60min	Polímero HRP 30min.
CD25	Citratos pH. 7	IgG1 Kappa	Abcam	Marcador de activación de células T	membrana	1:20 60min	Polímero HRP 30min.
CD15	Citratos pH. 7	IgM, Kappa	Dako	Antígeno Lewis X	Membrana	1:100 60min	Polímero HRP 30 min.
CD4	EDTA pH.9	IgG1k	Millipore	Linfocitos T CD4+ dominio Externo	Membrana	Prediluido 45min	Polímero HRP 30min.
Antígeno Tn	Citratos pH. 7	IgM	Genetex	Antígeno Tn	Membrana	1:100 60min	Polímero HRP 30min.

Anti-sialil Lewis X	Citratos pH 7	IgM	Millipore	Sialil Lewis X	Membrana	1:75 60min	Polímero HRP 30min.
Anti-T	Citratos pH 7	IgG	AbCam	Antígeno T	Membrana	1:100	Polímero HRP 30min.

Los anticuerpos se diluyeron en PBS y se titularon para obtener la concentración óptima para cada caso

Evaluación para la inmunotinción.

Para evaluar la reacción se utilizaron los siguientes criterios (metodología adaptada de Loughlin y Hussein 2007):

- Control positivo: Para infiltrado celular se utilizaron cortes de amígdala humana.
- Control negativo: Corte histológico de patología pulmonar sin anticuerpo primario.
- Controles del tumor: Cortes histológicos patologías pulmonares crónicas no neoplásica.
- Todas las inmunotinciones se hicieron en cortes seriados secuencialmente del mismo bloque para poder evaluar las mismas estructuras histológicas bajo la constante asesoría de patólogos del departamento de patología del INER para la interpretación de los cortes histológicos en cuanto al diagnóstico, celularidad e inmunoreacción.
- La cuantificación de las células se hizo en campos seleccionados al azar en la zona del tumor y el infiltrado se evaluó en la zona circundante al tumor.
- El conteo se hizo dos veces por diferentes observadores y se descartó el tejido necrótico.
- El área evaluada fue de mm^2 . El número de campos que equivalen a 1 mm^2 , fue calculado midiendo el diámetro del ocular con un micrómetro objetivo marca Zeiss. Para el caso del objetivo 40X en el que basamos nuestras evaluaciones el área calculada para cada campo de

observación fue de 188,574.54 μm^2 aplicando la fórmula de área del círculo ($\text{Área}=\pi r^2$), con lo cual se calculó que 5.3 campos ópticos corresponden a 1 mm^2 para nuestro microscopio Zeiss óptico modelo 1251CS con un ocular 10X (Tabla 5).

Digitalización y análisis de imágenes.

- Las imágenes del microscopio Zeiss Modelo 1251CS fueron digitalizadas con la cámara digital Sony Cyber-Shot DSC-W100 con una resolución de 8 megas píxeles. El análisis de las imágenes se realizó con el software para análisis de imágenes digitales y en 3D ImageJ (Versión 1.0).

<p>Calculos:</p> <p style="text-align: center;">PARA OBJETIVO 40X Y OCULAR 10X</p> <p style="text-align: center;">$1\text{mm}^2 = 1\,000\,000\ \mu\text{m}^2$</p> <p style="text-align: center;">$\text{Área} = \pi r^2$</p> <p style="text-align: center;">$188,574.54\ \mu\text{m}^2 \rightarrow 1\ \text{campo} \quad 1 \times 10^6\ \mu\text{m}^2 \rightarrow X \quad X = 5.3\ \text{campos}$</p>

Tabla 5. **Calculo del número de campos que se deben de contar para tener una evaluación por mm^2 .**

Microscopio	Ocular	Objetivo	Diámetro	Area)	Número de campos equivalentes a 1 mm^2
Carl Zeiss Estandar. Modelo 1251CS	10X	10X	1800 μm	2,544,696 μm^2	2.5
		*40X	490 μm	188,574.54 μm^2	5.3
		100X	190 μm	28,352.94 μm^2	8.5

*El objetivo 40X fue el utilizado para todas las evaluaciones.

Resultados:

En las muestras histológicas obtenidas de los pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar primario se presentó gran heterogeneidad histológica. De acuerdo a los criterios de clasificación previamente reportados por Keith M Kerr, 2009, en 3 de los casos estudiados el Adenocarcinoma pulmonar fue del tipo bien diferenciado, un solo caso el adenocarcinoma estaba poco diferenciado, otro fue adenocarcinoma del tipo bronquio-alveolar y finalmente otro caso el adenocarcinoma fue de células claras (figura 4).

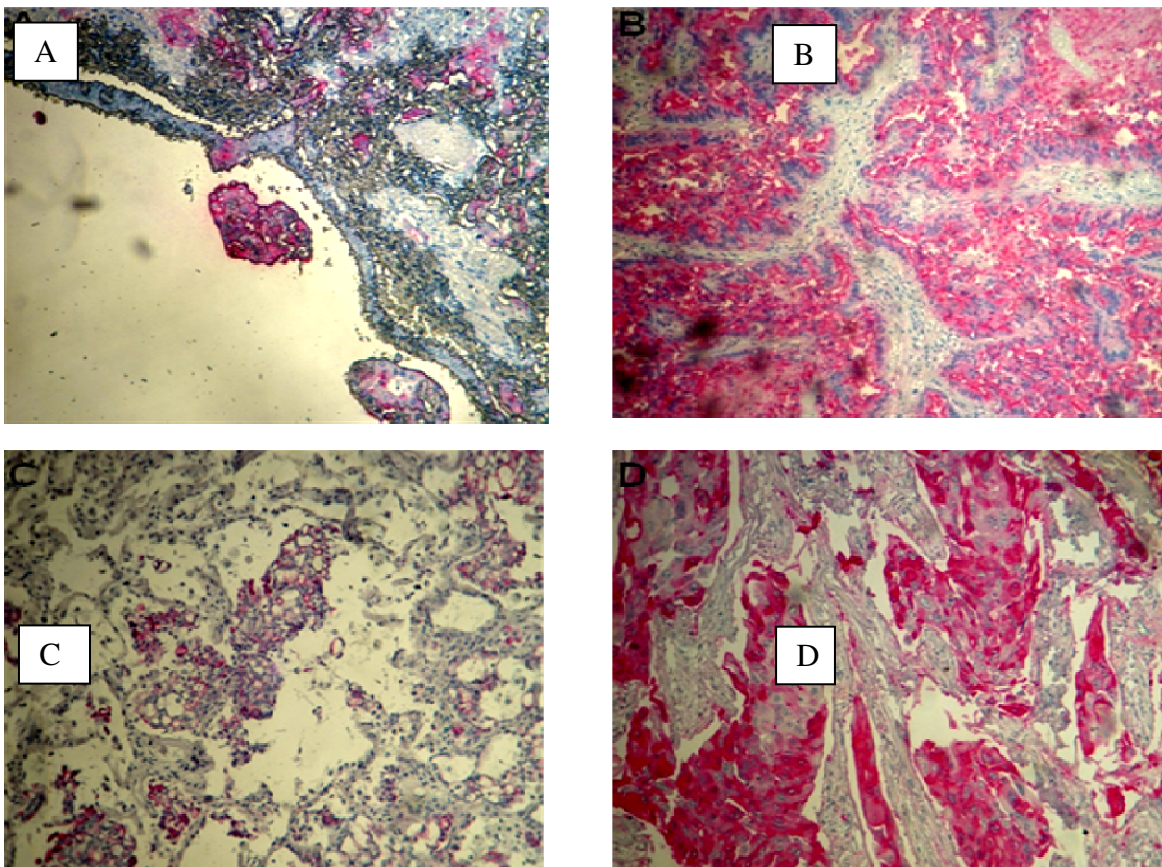


Figura 4. **Presencia de MUC1 en diferentes tipos histológicos de Adenocarcinoma pulmonar 10X** . Tejidos de adenocarcinoma pulmonar obtenidos de los diferentes casos de estudio. La inmunotinción con el anticuerpo monoclonal anti MUC1 clona DF3 revelado con rojo rápido fue positiva, en todas las células del tumor. (A) corresponde a Adenocarcinoma papilar bien diferenciado. Se observa el epitelio cilíndrico ciliado normal sin marca y la papila de células epiteliales neoplásicas con marca intensa en el citoplasma y la membrana. (B) Adenocarcinoma bronquio-alveolar, se observa el epitelio bronquial neoplásico con marca intensa. (C)

Adenocarcinoma de células claras, se observa el parénquima pulmonar con presencia de un foco microscópico que corresponde a una neoplasia epitelial, que es evidente con la tinción, rodeadas por tejido inflamatorio. D) Adenocarcinoma de células grandes moderadamente diferenciado, se observa el parénquima pulmonar sustituido por una neoplasia que forma láminas, que es evidentes con la tinción, rodeadas por tejido fibroconectivo negativo al anticuerpo.

Los cortes histológicos de de pacientes con adenocarcinoma pulmonar productor de MUC1 tienen una gran cantidad de infiltrado inmunológico. La media fue de 1031 de células tumorales con una S.D. \pm 20.83 y una media de 611 células infiltrantes con una S.D \pm de 141.69, la variante entre ellas fue de 1.22 a 2.15 células. El infiltrado más significativo se presenta en dos casos de APBD en comparación con todas las muestras, teniendo una relación de 1.22 y de 1.41 células infiltradas por cada célula tumoral en un mm^2 , en cambio para APCC por cada 2.15 células tumorales hay una célula infiltrante. Estos datos son aun más relevantes si los comparamos con la media de los controles que fue de 79 con una S.D \pm de 17.017 de células infiltrantes por mm^2 (Tabla 5).

Se observó que APCC tiene la mayor densidad de células neoplásicas así como el menor número de células infiltrantes por mm^2 y que uno de los casos de APBD tiene 837 células infiltrantes siendo el mayor numero por mm^2 , dato que al compararse con el número de células tumorales por mm^2 es menor por 185 células.

En el análisis del infiltrado leucocitario con anticuerpos monoclonales se observaron las siguientes subpoblaciones celulares: células T CD4+, células T CD8+ y células CD57+ las cuales expresan moléculas de activación CD25 y CD69 (Figura 5).

Tabla 5. Características histológicas de los casos y relación de células tumorales e infiltrantes por mm²

CASO	Histopatología del tumor	No. Células tumorales/mm ²	No. Células Infiltrantes/mm ²	Relación Cel tumoral/infiltrantes
1	Adenocarcinoma bien diferenciado (APBD)	1022	837	1.22
2	Adenocarcinoma bien diferenciado (APBD)	1046	737	1.41
3	Adenocarcinoma bien diferenciado (APBD)	1009	498	2.02
4	Adenocarcinoma poco diferenciado (APPD)	1010	556	1.81
5	Adenocarcinoma bronquialveolar (APBA)	1041	550	1.89
6	Adenocarcinoma de células claras (APCC)	1060	493	2.15

* promedio de control sano 79 S.D ± 17.017 de células/mm²

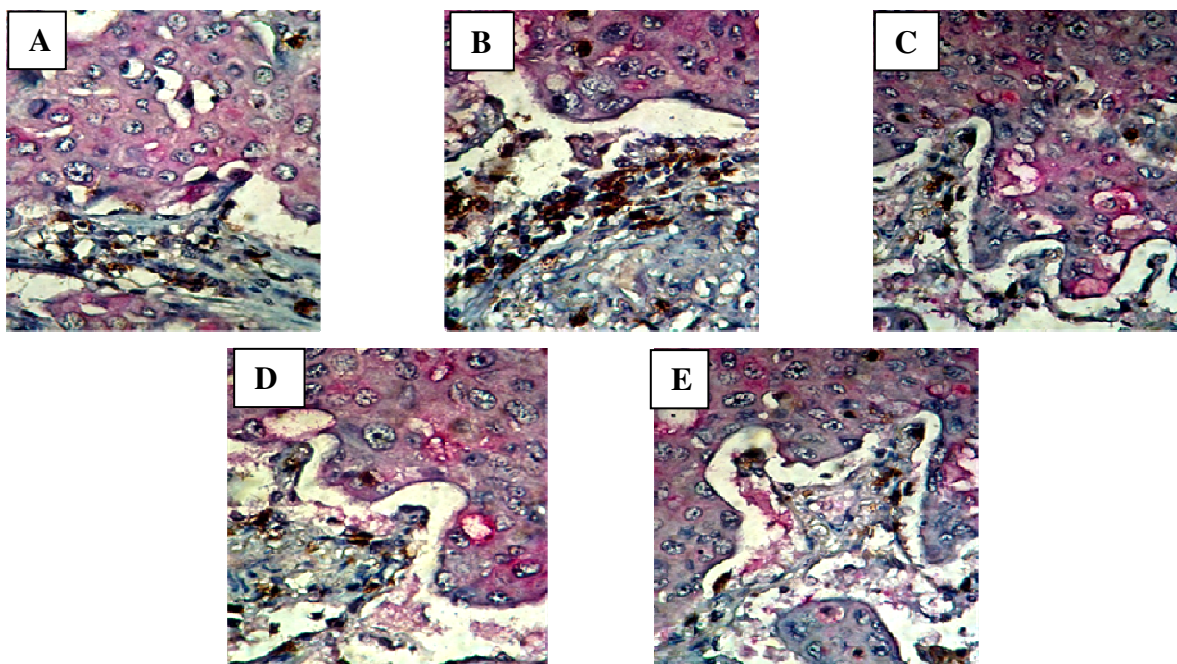


Figura 5. **Caracterización fenotípica de células infiltrantes de tumor productor de MUC1 hipoglicosilada (tomado del caso 4 APPD 40X).** Inmunohistoquímica con doble tinción revelando los fenotipos de las células infiltrantes del tumor y expresión de moléculas de activación. Las imágenes muestran las células tumorales positivas a MUC1 reveladas con el cromógeno permanent red. Los fenotipos celulares se muestran en las marcas color café marrón. (A) Linfocitos T CD4+. (B) Linfocitos T CD8+. (C) Células NK (CD57). La expresión de la molécula de activación se muestran en las imágenes D) CD25 (receptor alfa de IL2) y E) Expresión de la molécula de activación CD69.

Al contabilizar el infiltrado de las diferentes subpoblaciones de linfocitos en el adenocarcinoma pulmonar, los CTL CD8+ presentaron el mayor número de células infiltradas. Para los casos de APBD presentó un 22%, 75% y 100% de células por mm^2 , en el APPD presentó un infiltrado del 100%, un 62% en el APBA y por último con un 100% para el caso de APCC por mm^2 . Para las células T CD4+ fue significativo el infiltrado en uno de los casos de APBD con un 73% y los demás casos con un infiltrado menor al 40% por mm^2 . En la población de células T CD57+ se observó un porcentaje muy bajo en comparación con las otras poblaciones, menor al 10% en 2 de los casos de APBD, APPD, APBA y APCC por mm^2 , con un aumento significativo en uno caso de APBD del 29% en un mm^2 . Sin embargo al comparar el infiltrado general entre los casos se destaca la

presencia de un 73% de células T CD4+ similar al 75% de CTL CD8+ y con el mayor porcentaje de 29 de células T CD57+ en uno de los casos de APBD. El infiltrado más significativo entre los fenotipos presentó una proporción de 7 células CTL CD8+ por 1 célula T CD4+ y 1 célula T CD57+ y de 5 CTL CD8+ por 1 célula T CD4+ y 1 célula T CD57+, esto en dos de los casos de APBD (Tabla 6).

Además se demostró que la población celular CD57+ estaba prácticamente ausente en comparación con las demás poblaciones (menor al 10%), a excepción de uno de los casos de APBD que presentó el mayor número de células CD57+ (29%).

Al evaluar las células efectoras se encontró que en la mayoría de los casos las células infiltrantes expresaban las moléculas de activación temprana CD69 y CD25 (Tabla 7). En casi todos los casos la molécula de activación CD25 se expresa en menor proporción que la molécula de activación CD69. Se puede apreciar que no existe ningún patrón en la expresión de estas moléculas de activación en las células infiltrantes y que en los cortes histológicos de pacientes sanos (control) no hay expresión de moléculas de activación en las células infiltrantes. Inesperadamente se encontró que las células tumorales también expresaron la molécula de activación CD25 obteniéndose los siguientes porcentajes: para el caso 1=100%, Caso 2=92.06%, Caso 3=95.41%, Caso 4=100%, Caso 5=100% y Caso 6=100% por mm².

Tabla 6. Porcentaje de fenotipos celulares presentes en el infiltrado de adenocarcinoma pulmonar por mm².

Caso	Porcentaje células CD4+	Porcentaje células CD8+	Porcentaje células CD57+	Relación de fenotipos CD4 : CD8 : CD57
1.APBD	4.18	22.34	5.61	1 : 5 : .4
2.APBD	73.27	75.30	29.44	1 : 1 : 2
3.APBD	13.05	100	2.81	1 : 7 : .3
4.APPD	31.29	100	0.35	1 : 3 : 0.1

5.APBA	25.63	62.18	19.45	1 : 2 : 3
6.APCC	35.69	100	0.81	1 : 2 : 0.1
Control	4.17	23.82	72.01	1 : 3 : 5

Cada uno de los datos fue calculado a partir del conteo de células infiltrantes por mm², para el caso 1=837 células, caso 2=737, caso 3=498, caso4=556, caso 5=550 y en el caso 6=493 células. Control media 79 con S.D ± de 17.

La inmunohistoquímica en los cortes histológicos de pacientes con adenocarcinoma pulmonar reveló para todos los casos la expresión de MUC1 en las células neoplásicas. La distribución de las moléculas fue homogéneo en toda la membrana y estaba presente en el citoplasma de cada célula tumoral. El anticuerpo anti-MUC1 clona DF3 utilizado para este antígeno esta dirigido a los epitopes de la isoforma transmembranal de la MUC1 hipoglicosiladas específicamente hacia el péptido en la región de tandem. Los controles para las neoplasias fueron cortes histológicos de pulmón de personas sanas que murieron en accidentes los cuales fueron negativos para esta tinción (Figura 4).

Tabla 7. Porcentajes de células activadas en el infiltrado por mm².

Caso	Porcentaje de células CD25+	Porcentaje de células CD69+	Relación de fenotipos	Porcentaje de células no activadas
1.APBD	7.76	0	7 : 0	92.24
2.APBD	0	74.21	0 : 74	25.79
3.APBD	4.41	5.42	1 : 1	90.17
4.APPD	6.47	33.63	1 : 5	59.90
5.APBA	21.63	60.54	1 : 3	17.85
6.APCC	9.53	33.06	1 : 3	57.41
Control sano	0	0		100

Los datos calculados para CD25 y CD69 se hicieron a partir del conteo de células infiltrantes por mm², para el caso 1=837 células, caso 2=737, caso 3=498, caso4=556, caso 5=550 y en el caso 6=493 células. Cada uno de los datos calculados para CD25 tumoral fueron a partir del conteo de células tumorales por mm², para el caso 1=1002, 2=1046, 3=1009, 4=1010, 5=1041, 6=1060. Control media 79 S.D ± de 17 células.

Los TAA's sacaridicos, Lewis X o CD15, antígeno Tn (GalNac), antígeno T (Gal-GalNac) y MUC1 se encontraron en todos los casos clínicos. Solo en 3 de los casos (1, 4 y 6) también se identificó la presencia del antígeno SLX (Figura 6). Inesperadamente se encontró que las células tumorales también expresaron CD25 (cadena alfa del receptor para IL-2) obteniéndose los siguientes porcentajes: caso 1=100, Caso 2=92.06, Caso 3=95.41, Caso 4=100, Caso 5=100 y Caso 6=100 células tumorales CD25+ (Figura 6D).

En cada corte histológico se cuantificó el número de las células tumorales positivas a cada TAA's sacaridico por mm² de acuerdo al procedimiento antes mencionado. En cada caso se describieron la distribución de los TAA's sacaridicos, así como la intensidad. Con el análisis digital de las imagenes se obtuvieron el porcentaje de células que expresaban cada uno de los TAA's sacaridicos (Tabla 8), apreciándose un comportamiento muy parecido en los TAA's sacaridicos de cada caso (Gráfica 1).

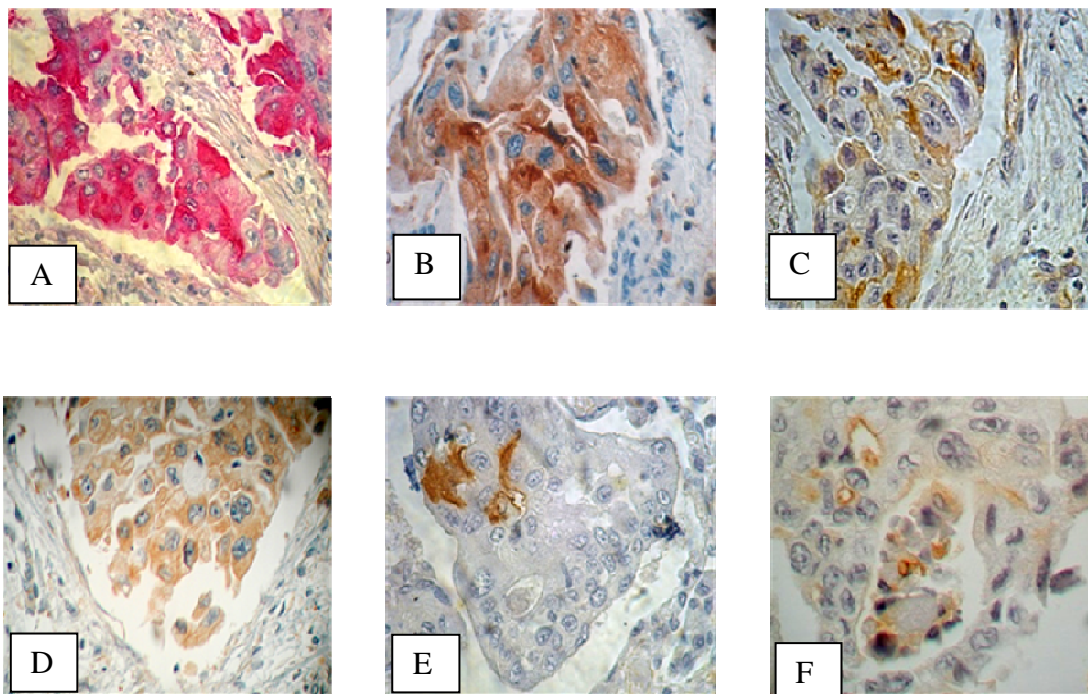


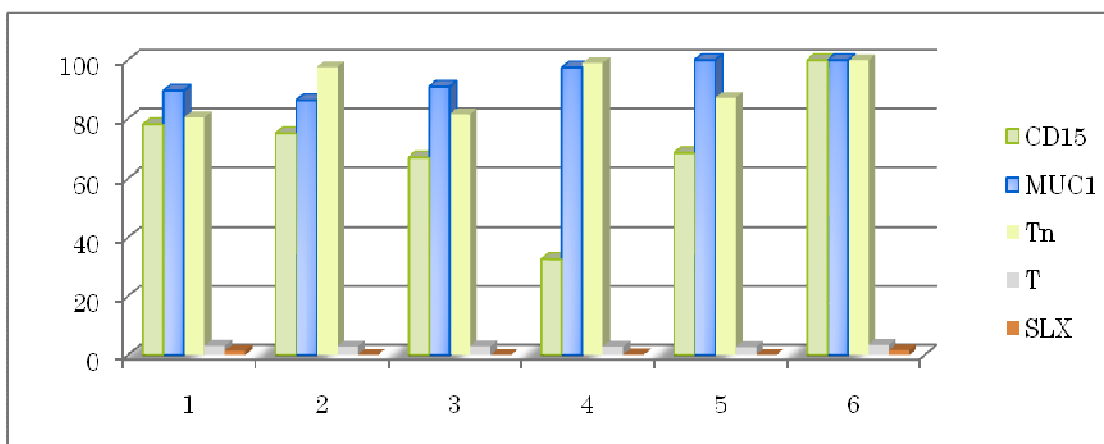
Figura 6. **Antígenos expresados en el adenocarcinoma pulmonar poco diferenciado de células grandes (tomado del caso 4 APPD 40X).** Por medio de inmunohistoquímica se identificaron los antígenos A) MUC1, B) Antígeno Tn, C) Lewis X, D) CD25, E) Sialil Lewis X y F) antígeno T.

Tabla 8. Distribución porcentual de células neoplásicas que expresan TAA's sacaridicos.

Caso	MUC1	Tn	T	Lewis X	SLX
1.APBD	89.62	80.52	3.13	78.18	1.46
2.APBD	86.32	97.60	2.86	75.11	0
3.APBD	90.98	81.53	2.96	66.89	0
4.APPD	97.52	99.00	2.87	32.67	0.19
5.APBA	100	87.09	2.67	68.39	0
6.APCC	100	100	3.45	100	1.64

Distribución porcentual de TAA's sacaridicos, los datos fueron calculados a partir del conteo de células tumorales por mm², para el caso 1=1002, 2=1046, 3=1009, 4=1010, 5=1041, 6=1060. El control sano y las muestras de pacientes con patologías pulmonares crónicas no neoplásicas, no expresaron ninguno de estos antígenos.

Grafica 1. Distribución porcentual de TAA's por caso clínico en un mm²



El CD25 (cadena α del receptore para IL-2) se expreso en la mayoría de las células tumorales de manera muy homogénea que va desde el 92% al 100% de las células en todos los casos analizados. Los datos no se incluyeron en la gráfica porque este marcador no es considerado como TAA's y su presencia en las células tumorales indican que probablemente estas células son dependientes de IL-2 para su crecimiento

Los datos fueron analizados y comparados estadísticamente por la prueba de correlación lineal de Pearson, lo que demostró que la expresión del TAA's MUC1 correlaciona significativamente con el antígeno Tn, pero no para los antígenos T y sialil lewis X. También la correlación entre los CTL con respecto a la expresión de

MUC1 fue positiva al igual que, para el antígeno Tn y el CD15, pero no con las otras poblaciones celulares infiltrantes.

Los pacientes con mayor sobrevida después del diagnóstico fue el caso 5 que corresponde a un paciente con APBA y la sobrevida fue de 1.4 años, siguiéndole APPD con 9 meses, y los casos de APBD fluctúan entre los 2 hasta los 8 meses y el más agresivo fue el APCC. Aparentemente la edad ni el sexo no son factores decisivos. En este último caso la relación de número de células tumorales con respecto al infiltrado era 2.15 células tumorales por cada célula infiltrante. Es decir que el paciente con menor sobrevida presento el número más bajo de células infiltrantes.

Discusión:

El adenocarcinoma pulmonar comprende un grupo heterogéneo de neoplasias con características histológicas, antigénicas y bioquímicas diferentes, pero WHO, 2004 los clasifica dentro del mismo grupo por el origen a partir de células epiteliales y glándulas bronquiales, pero las características clínicas e inmunológicas propias para cada variante. La respuesta inmune contra el adenocarcinoma pulmonar es variada y dependen parte de subtipo o variante histológica, ya que la prevalencia y la distribución del infiltrado inflamatorio no es igual en todas las variantes histológicas. En nuestro caso encontramos 4 de las variantes histológicas (APBD, APPD, APBA y APCC) en los casos analizados. En 2 de los 3 casos de APBD hubo una gran similitud en cuanto a las características infiltrado inflamatorio y en su curso clínico, pero en cuanto al tipo de TAA's . MUC1, el antígeno Tn y el Lewis^X se expresaron en la mayoría de las células tumorales en caso estudiado y los porcentajes de células tumorales positivas a cada marca en los 6 casos fueron similares, en comparación con las células tumorales que fueron positivas para las marcas para el antígeno T y Sia-Le^X, se expresado en muy pocas células tumorales en los 6 casos analizados y entre ambos antígenos los porcentajes de células positivas fueron similares. Esto indica que la biosíntesis de MUC1 se trunco en el primer carbohidrato, es decir ya no hubo la expresión de la galactosil-transferasa que acarrea y pega la galactosa al antígeno T y por tal razón el anticuerpo (anti MUC 1 clona DF3, Abcam) que esta dirigido contra la parte proteica de la MUC1, posiblemente esta reconociendo la misma molécula que lo hace el anticuerpo contra Tn, por lo que es lógico pensar en resultados semejantes. En el caso del antígeno Lewis^X, su biosíntesis deriva del antígeno T que constituye el core 2 para la biosíntesis de otras moléculas en el cual la enzima β 3Gal-T añadió una galactosa al antígeno T para continuar la biosíntesis del antígeno Lewis^X, que oculto el epitope antigénico reconocido por el anticuerpo contra antígeno T, lo cual no hubo marca positiva en la inmunohistoquímica para este antígeno, pero si para el antígeno Lewis^X.

En el caso de antígeno Sia-Le^X, casi no se expresó en los tejidos, lo que indica que a pesar de que se formó su precursor, el antígeno Lewis^X, no se expresó la enzima sialil transferasa que une específicamente el ácido sialico al antígeno Lewis^X y por lo tanto la marca fue negativa prácticamente en todos los casos. Esto tiene una implicación clínica, ya que al no existir Sia-Le^X, la posibilidad de diseminación de las células neoplásicas por vía hematológica disminuye porque como se mencionó anteriormente, este es un ligando para las moléculas de adhesión selectinas del endotelio vascular. Esto explica en parte la evolución más lenta del adenocarcinoma con respecto a otros tipos de cáncer pulmonar. Por otro lado, el infiltrado celular en el tumor se encuentra de manera muy marcada en la periferia de la masa tumoral sólida y existen muy pocas células en el estroma del tumor. Hay reportes donde asocian la magnitud del infiltrado con el grado de diferenciación del tumor. El infiltrado es mayor en el caso de tumores poco diferenciados, esto puede deberse a que este tipo de tumores presentan una gran microvasculación que favorece la migración linfocitaria, pero es evidente que las diferencias pueden deberse a las características inmunogénicas del tumor, así como posiblemente a la producción de quimiocinas.

La presencia de infiltrado mononuclear en los tumores malignos es frecuente y durante años se ha considerado como indicador de buen pronóstico para el paciente (Ishigami, 2000). Sin embargo aún no está bien esclarecido porque las células efectoras de la respuesta inmune no ejercen su acción antitumoral de manera eficiente. Una explicación podría ser que el tumor por sí solo presenta mecanismos de evasión que evitan una buena respuesta antitumoral, pero con el reciente descubrimiento de subpoblaciones reguladoras linfocitos T en la zona del tumor podría ser otra explicación.

Por tal razón el interés de tipificar el fenotipo de estas poblaciones linfoides para entender la función que ejerce cada población en lo individual o la suma de interacciones celulares y moleculares que llevan a un balance general de supresión o de activación de respuestas antitumorales efectoras.

Existen reportes en los que se ha caracterizado los fenotipos de las poblaciones celulares infiltrantes en tumores y se ha encontrado un predominio de CTL CD8+,

macrófagos (CD14+), células dendríticas (CD1+), con pocas células NK (CD56+CD57+) y linfocitos B (CD20+). La presencia de poblaciones T citotóxicas efectoras con marcadores de activación como el CD25+, CD69+ y CD57+ así como de macrófagos en la zona del tumor nos indica que la respuesta inmune celular del huésped está tratando de controlar el tumor lo que indicaría un buen pronóstico para el paciente, sobretodo aquellos en los que se ha resectado quirúrgicamente el tumor (Kuroda, 2005)., pero si junto con estas poblaciones se presentan las Treg (CD25+Foxp3+), esto nos indica que la respuesta está suprimida o parcialmente suprimida y el pronóstico puede ser desfavorable para el paciente. Pero es interesante preguntarse por qué sucede este fenómeno. La respuesta podría ser simple, si consideramos que los tumores provienen de células propias y al presentarse una reacción en contra de ellas, se pueden generar procesos de autoinmunidad, los que se han demostrado en modelos animales de ratones donde se depletan estas poblaciones reguladoras ((Nakano O, 2001).

Por otro lado la mayoría de los estudios *in vitro* para determinar la función antitumoral se hacen a partir de células en circulación, no revela la situación real en la zona del tumor. Recientemente, se ha descrito el incremento en circulación de una población citotóxica efectora en pacientes con cáncer con el fenotipo CD8+CD57+ (Becknell, 2003). En los resultados obtenidos con las células en circulación no consideran la influencia del microambiente, ni el contacto físico entre poblaciones y esto seguramente deben ser factores decisivos para que se presente una respuesta antitumoral eficiente. El infiltrado celular en la zona del tumor puede ser un reflejo del comportamiento antigénico de las células tumorales y de la pérdida de la tolerancia hacia las células tumorales. Se ha reportado la asociación de poblaciones celulares a curso clínico. Esta relación CD4/CD8 en la zona del tumor también es indicativo de cómo es el balance general de la respuesta o sea a favor o en contra. Cuando células CD4+ es mayor que CTL CD8+ significa que no hay una respuesta antitumoral efectora eficiente para el control del tumor, pero si la relación se invierte es decir mayor cantidad de CTL CD8+ con respecto a células CD4+ indica que una respuesta antitumoral eficiente y el curso de la enfermedad presenta un mejor pronóstico que cuando la relación

se invierte. Al igual a lo reportado en nuestro estudio identificamos que los casos, donde hay un predominio de CTL CD8+ un mejor pronósticos de acuerdo a los datos que etaban reportados en loas historias clínicas de los pacientes.

Conclusiones:

- La asociación subpoblación celular con la expresión de MUC1-Tn en células de adenocarcinoma pulmonar puede ser utilizado como indicador para el pronóstico del paciente
- Las características antigénicas de los TAA's sacarídicos determinan la composición y función del infiltrado inflamatorio en el microambiente del tumor en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

Perspectivas:

Por lo que los trabajos posteriores deben dirigirse a identificar cuáles son las poblaciones celulares efectoras que pueden activarse y cumplir su función de manera efectiva en presencia de antígenos glicosilados de la MUC1 e identificar cuales estos antígenos glicosilados son más efectivos para estimular la función citotóxica. Sin embargo es de vital importancia el determinar la presencia de las moléculas expresadas en el microambiente del tumor para entender cuales serian las posibles vías de evasión o de eliminación del cáncer. Este trabajo presenta hallazgos totalmente preliminares a una comprensión de la respuesta inmune mediada por células T citotóxicas efectoras infiltradas en adenocarcinoma pulmonar productor de MUC1.

Con frecuencia los TAAs no son eficientemente reconocidos por el sistema inmune debido a la tolerancia a lo propio, pero las modificaciones estructurales que presenta MUC1 en la que exponen epitopes inmunogénicos (TAAs sacarídicos) pueden ser utilizadas para activar de manera eficiente mecanismos efectores antitumorales para ser utilizados en el tratamiento y seguimiento de pacientes con cáncer.

Bibliografia:

1. Abe, M. and D. Kufe. Characterization of cis-acting elements regulating transcription of the human DF3 breast carcinoma-associated antigen (MUC1) gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, :282.
2. Acres, B. V. apostolopoulos, J. M. Balloul, D. Wreschner, P. X. Xing, D. Ali-Hadji, N. Bizouarne, M. Kieny, and I. F. McKenzie. MUC1-specific immune responses in human MUC1 transgenic mice immunized with various human MUC1 vaccines. *Cancer Immunol Immunother*. 2000, 48:588.
3. Ajioka, Y. L. J. Allison, and J. R. Jass. Significance of MUC1 and MUC2 mucin expression in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 1996. 49:560.
4. Aksoy N, Corfield AP, Sheehan JK. Preliminary study pointing out a significant alteration in the biochemical composition of MUC2 in colorectal mucinous carcinoma. *Clin Biochem*. 2000, 33:167–173.
5. Alpaugh, M. L. J. S. Tomlinson, S. Kasraeian, and S. H. Barsky. Cooperative role of E-cadherin and sialyl-Lewis X/A deficient MUC1 in the passive dissemination of tumor emboli in inflammatory breast carcinoma. *Oncogene*. 2002, 21:3631.
6. Amaya S, Sasaki M, Watanabe Y, Tsui WM, Tsuneyama K, Harada K, Nakanuma Y. Expression of MUC1 and MUC2 and carbohydrate antigen Tn change during malignant transformation of biliary papillomatosis. *Histopathology*. 2001, 38(6):550-60.
7. Apostolopoulos V, Karanikas V, Haurum JS, McKenzie IF. Induction of HLA-A2 restricted CTL to the mucin 1 human breast cancer antigen. *J Immunol*. 1997, 159:5211-18.
8. Apostolopoulos V, Yuriev E, Ramsland PA, et al. A glycopeptide in complex with MHC class I uses the GalNAc residue as an anchor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003, 100:15029-34.

9. Apostolopoulos, V., V. Karanikas, J.S. Haurum, and I. F. Mckenzie. . Induction of HLA-A2- restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen. *J. Immunol.*1997.159:5211.
10. Arul, G. S. M. Moorghen, N. Myerscough, D. A. Alderson. R. D. Spicer, and A. P. Corfield. Mucin gene expression in Barrett's oesophagus: an in situ hybridization and immunohistochemical study. *Gut* .2000.47:753.
11. Baldus, S E. F. G. Hanisch, C Putz, U. Flucker, S. P. Monig, P. M. Schneider, J. Thiele, A. H. Holscher, and H. P. Dienes. Immunoreactivity of Lewis blood group and mucin peptide core antigens: correlation with grade of dysplasia and malignant transformation in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Histol histopathol.*2002.17:191.
12. Baldus, S. E. S. P. Monig, F. G. Hanisch, T. K. Zirbes, U . Flucke, S. Oelert, G Zilkens, , B. Madejczik, J Thiele, P. M. Schneider, A H. Holscher, and H. P. Dienes. Comparative evaluation of the prognostic value of MUC1,MUC2, sialyl-Lewis (a) and sialyl- Lewis (x) antigens in colorectal adenocarcinoma. *Histopathology.*2002.40:440.
13. Baldus, S. E. T. Zirbes, S Engel, f. G. Hanisch, S. P. Monig, J. Lorenzen, J. Glossmann, S. Fromm, J. Thiele, H. Pichlmaier, and H. P. Dienes. Correlation of the immunohistochemical reactivity of mucin peptide cores MUC1 and MUC2 with the histopathological subtype and prognosis of gastric carcinomas. *Int J Cancer.*1998.79:133.
14. Barnd, D. L., L. A. Kerr, R. S. Metzgar, and O.J. Finn. Human tumor specific cytotoxic T cell lines generated from tumor- draining lymph node infiltrate. *Transplant Proc.*1998.20 :339.
15. Baruch, A., M. Hartmann, M. Yoeli, Y. Adereth, S. Greenstein, Y. Stadler, Y. Skornik, J. Zaretsky, N. I. Smorodinsky, I Keydar, and D.H. Wreschner. The breast cancer-associated MUC1 gene generates both receptor and int cognate binding protein. *Cancer Res.*1999.59:1552.
16. Baruch, A., M. Hartmann, S. Zrihans-Licht, S. Greenstein, M. Burstein, I. Keydar, M. Weiss, N. Smorodinsky, and D.H. Wreschner. Preferential expression

of novel MUC1 tumor antigen isoforms in human epithelial tumors and their tumor-potentiating function. *Int J Cancer*.1997. 71:741.

17. Becknell.B. C. Michael., A.Natural Killer Cells in Innate Immunity and Cancer. *J Immunother*.2008 Oct;31(8):685-92.

18. Bilik R.Characterization of T- lymphocyte subpopulation infiltrating primary breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother. (2):143-147.Breast*.1989.(3):172-8.

19. Bresalier, R.S., S. B. Ho,H. L. schoeppner, Y S, Kim, M. H. Sleisenger,P. Brodt and J.C. Byrd.Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology*.1996.110:1354.

20. Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells.*Biochim Biophys*. 1999. 1473(1):67-95.

21. Brossart, P K. S. Heinrich, G Stubler, L. Behnke, V. L. Reichardt, S. Stevanovic,A. Muhm, H. G. Rammensee, L . Kanz , and W. Brugger.Identification of HLA-A2-restricted T- cell epitopes derives from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood*.1999. 93:4309.

22. Buisine, M. P. P. Desreumaux, E. Letreurte, M. C. Copin. J. F. Colombel, N. Porchet, and J. P. Aubert. Mucin gene expression in intestinal epithelial cell in Crohn's disease.*Gut*.2001.49:544.

23. Burchell, J. M. A. Mungul, and Taylor –Papadimitriou.O-linked glycosylation in the mammary gland : changes that occur during malignancy. *J Mammary gland Biol Neoplasia*.2001.6:355.

24. Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer.*Cancer Metastasis Rev*. 2004.23(1-2):77-99.

25. Chandrasekaran EV, Xue J, Neelamegham S, Matta KL. The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. *Carbohydr Res*. 2006; 12;341(8):983-94.

26. Chávez R, Reyes J, Maldonado G, Vázquez L, Estrada-Parra S, Gorocica P. y Zenteno E. Moléculas de cooperación y regulación durante la migración celular en la respuesta inflamatoria. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp*.1994; 7(1): 67.

27. Chen, D., S. Koido, Y. Li, S. Gendler, and J. Gong. T cell suppression as a mechanism for tolerance to MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice. *Breast Cancer Res Treat.* 2000.60: 107.
28. Choi, C.M. Witzens, M. Bucur, M. Feuerer, N. Sommerfeldt, A. Trojan. A Ho, V. Schirmacher, H Goldschmidt, and P. Beckhove. Enrichment of functional CD8 memory T cell specific for MUC1 in bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood.* 2005.105:2132.
29. Contreras, N. H. K. Qiao L. Cervical Cancer Cells Induce Apoptosis of Cytotoxic T Lymphocytes. *J Immunother.* 2000.23(1):2-10.
30. Copin, M.C.L. Devismen, M. P. Buisine, C.H. Marquette, A Wurtz, J.P. Aubert, B. Gosselin, and N. Porchet. From Normal Respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes. 2002. *Int J Cancer* 86:162.
31. Croce, R. P. S. Eiras. A. MUC1 mucin and carbohydrate associated antigens as tumor markers in head and neck squamous cell carcinoma. 2001. *Pathol Oncol Res.* 7(4):284-91.
32. Croce. M. V. M. M. Eiras. A. MUC1 mucin and carbohydrate associated antigens as tumor markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2001.7(4):284-91.
33. Davis, M. M. & Chien, Y. Issues concerning the nature of antigen recognition by $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-cell receptors. *Immunol. Today.* 1995.16,316-318.
34. Donaldson MS. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J.* Oct 20; 3(1):19.
35. DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res.* 2004 Nov;567(2-3):447-74.
36. Dube V, E. The structural relationship of blood group-related oligosaccharides human carcinoma to biological function: a perspective. *Cancer Metastasis Rev.* 1987.6:541.
37. Edge, S.B.; Byrd, D.R.; Compton, C.C.; Fritz, A.G.; Greene, F.L.; Trotti, A. *Cancer Staging Manual.* 2010. Seven edition. AJCC Cancer Staging Handbook.

38. Engelmann, K.S. E. Baldus and F.G. Hanisch. Identification and topology of variant sequences within individual repeat domains of the epithelial tumor mucin MUC1. *J Biol Chem.*2001.276:27764.
39. Engels EA, Shen M, Chapman RS, Pfeiffer RM, Yu YY, He X, Lan Q. Tuberculosis and subsequent risk of lung cancer in Xuanwei, China. *Int J Cancer.*2009.124(5):1183-7.
40. Fontenot, J. d., N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R.C. Montelaro, and O.J. Finn. Biophysical characterization of one –two-and three- tandem repeats of human mucin (muc-1) protein core . *Cancer Res.*1993. 53:5386.
41. Franco J, Perez-Hoyos S, and Plaza P. Changes in lung-cancer mortality trends in Spain; *Int J Cancer.*1997: 102-105, 2002.
42. Franco J, Perez-Hoyos S, and Plaza P. Changes in lung-cancer mortality trends in Spain; *Int J Cancer.* 2002.97: 102-105.
43. Franco MF, Villalba CJ. La epidemia de cáncer pulmonar en México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2001; 14(4): 207-214.
44. Franklin WA. Diagnosis of lung cancer pathology of invasive and preinvasive neoplasia. *Chest* 2000;117(4Suppl1):80S-89S.
45. Gaemers, I. C., H. L. Vos, H. H. Volders, S. W. van der Valk and J. Hilkens. A stat-responsive element in the promoter of the episialin/MUC1 gene is involved in its overexpression in carcinoma cell. *J Biol Chem.*2001.276:6191.
46. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol.*1995;57:607-634.
47. Gendler, S. J. E. P. Cohen, A Craston, T. Duhing, G. Johnstone, and D. Barnes. The locus of the polymorphic epithelial mucin (PEM) tumour antigen on chromosome 1q21 show a high frequency of alteration in primary human breast tumours. *Int J Cancer.*1990.45:431.
48. Georgiannos SN. The immunotherapy and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancer, the role of the mayor hitocompatibility complex in cell-mediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicator. *Surgery.* 2003.134:827834.

49. Gipson I, K. and Inatomi. Cellular origin of mucins of the ocular surface tear film. 1998. *Adv Exp med Biol* 438:221.
50. Girling A, Bartkova J, Burchell J., Gendler S. A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in range of primary carcinomas. *Int. J. Cancer*. 1989. ,43,1072-1076.
51. Glithero A, Tormo J, Haurum JS. Crystal structures of two H-2Db/glycopeptide complexes suggest a molecular basis for CTL cross-reactivity. *Immunity*. 1999. 10 :63-74.
52. Graham RA, Burchell JM, Taylor –Papadimitriou J. The polymorphic epithelial mucin: potential as an immunogen for a cancer vaccine. *Cancer Immunol Immunother*. 1996. 42:71-80.
53. Green LS, Fourtoul TI, Ponciano G, Robles C, Rivero O. Bronchogenic cancer in patients under 40 years old. The experience of a Latin American Country. *Chest* 1993; 104: 1477-1481.; 42:333-336.
54. Guillem P, Billeret V, Buisine MP, Flejou JF, Lecomte-Houcke M, Degand P, Aubert JP, Triboulet JP, Porchet N. Mucin gene expression and cell differentiation in human normal, premalignant and malignant esophagus. 2000. *Int J Cancer*. 88:856–861.
55. Gum, J. R. J. Mucin genes and the proteins they encode: structure, diversity, and regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;7:557–564.
56. Guzman, K., T. Bader, and P. Nettlesheim.. Regulation of MUC5 and MUC1 gene expression: correlation with airway mucous differentiation. *Am J Physiol*. 1996. 270:L846.
57. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* 1997;315:980-988.
58. Hanisch FG, Muller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*. 2000. 10:439-49.
59. Hareuveni M, T. Z. K H. Zrihan, S. A transcribed gene, containing a variable number of tandem repeats, codes for a human epithelial tumor antigen. *cDNA*

cloning, expression of the transfected gene and over-expression in breast cancer tissue. *Eur J Biochem.*1990.189(3):475-86.

60. Haurum JS, Arsequell G, Lellouch AC. Recognition of carbohydrate my major histocompatibility complex class I-restricted, glycopeptides-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1994.180:739-44.

61. Heintz NH, Janssen-Heininger YM, Mossman BT. Asbestos, lung cancers, and mesotheliomas: from molecular approaches to targeting tumor survival pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010. 42(2):133-9.

62. Hewetson, A., and B. S. Chilton. Molecular cloning and hormone-dependent expression of rabbit MUC1 in the cervix and uterus. *Biol. Reprod.*1997.57:468.

63. Hey, N. A. R.A. Graham, M. W. Seif, and J. D. Aplin. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J Clin Endocrinol Metab.*1994.78:337.

64. Hiltbold, E. M. A. M. Vlad, P. Ciborowski, S. C. Watkins, and O, J. Finn. The mechanism of unresponsiveness to circulating tumor antigen MUC1 is a block in intracellular sorting and processing by dendritic cell, *J Immunol.*2000.165:3730.

65. Hiltbold, E. M. M. D. Alter, P. Coborowski, and O J. Finn. Presentation of MUC1 tumor antigen by class I MHC and CTL function correlate with the glycosylation state of the protein taken up dendritic cell. *Cell Immunol.*1996.194:143.

66. Hiltbold, E. M. P. Ciborowski, and O. J. Finn. Naturally processed class II epitope from the tumor antigen MUC1 primes human CD4+ T cell. *Cancer Res.*1998.58:5066.

67. Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, Kim YS, Lyftogt C, Cherwitz DL, Niehans GA. Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res.* 1995;55:2681–2690.

68. Ho, S.B., G.A. Niehans, C. Lyftogt, P.S. Yan, D.L. Cherwitz, E.T. Grum, R. Dahiya, and Y.S. Kim. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.*1993. 53:641.

69. Hounsell, M. and M. J. Davies. Glycoprotein changes in tumours: a renaissance in clinical applications. *Clinical Science.* 1996.93,287–293.

70. Hudson , M.J., G.W. Stamp, K.S. Chaudhary, R. Hewitt, A. P. Stubbs, P.D. Abel, and E. N. Lalani. Human MUC1 mucin: a potent glandular morphogen. *J Pathol.*2001.194:373.
71. Hudson, M.J., G.W. Stamp, M.A. Hollingsworth, M. Pignatelli, and E. N. Lalani. MUC1 expressed in PanC1 cell decreases adhesion to type 1 collagen but increases contraction in collagen lattices. *Am J Pathol.*1996.148: 951.
72. Hussein, M.R. Elasers, DA.H. Fadel, S, A. Immunohistological characterisation of tumour infiltrating lymphocytes in melanocytic skin lesion. *J Clin. Pathol.*2006.59,316.
73. Hussein, M.R. Hassan,H. I. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. *J clin. Pathol.*2006.59,972.
74. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet.* 2000;356:1795-1799.
75. INEGI/Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. CONAPO, 2002. Proyecciones de la Población de México, 2000 - 2050.
76. Irimura T, Denda K, Iida S, Takeuchi H, Kato K. Diverse glycosylation of MUC1 and MUC2: potential significance in tumor immunity. *J Biochem.* 1999; 126(6):975-85.
77. Ishigami, S et al .Prognostic value of intratumoral natural killer cell in gastric carcinoma. *Cancer.*2000.88, 577-583.
78. Ishikawa H, Saton H, Kamma H Naito T, Yamashita YT, Ohtsuka M, et al. Elevated sialyl lewis X-i antigen levels in pleural effusion in patients with carcinomatous pleuritis. *Intern Med.* 1997; 36(10): 685-9).
79. Itzkowitz, S. H. Blood group-related carbohydrate antigen expression in malignant and premalignant colonic neoplasms. *J Cell Biochem Suppl.*1992 16G:97.
80. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, and Thun MJ. Cancer statistics, 2003; *CA Cancer J Clin.* 2003.53: 5-26.

81. Jensen T, G. M. Frische, P. M. Werderlin, O.T cell recognition of Tn-glycosylated peptide antigens. *Eur J Immunol.*1996. 26(6):1342-9
82. Jerome, K,R, A. D. Kirk, G. Pecher, W. W. Ferguson, and O. J. Finn.A survivor of breast cancer with immunity to MUC1 mucin, and lactational mastitis. *Cancer immunol Immunother.*1997. 43:355.
83. Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis.*Cancer Sci.*2004.95(5): 377-84.
84. Kawaguchi, T. I. M. W. Igarashi, S. .Expression of Vicia villosa agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cells in relation to lymphatic metastasis: is atypical MUC1 bearing Tn antigen a receptor of VVA?.*Breast Cancer Res Treat.*2007.98(1):31-43.
85. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Sato H, et al. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:5690-5693.
86. Keith M Kerr.Pulmonary adenocarcinomas: classification and reporting. *Histopathology.*2009.54, 12–27.
87. Kim YS, Gum J Jr, Brockhausen I. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj J.* 1996;13(5): 693-707.
88. Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer.* 2004 May 10;109(6):799-809.
89. Kocer,B. A, Soran, G. Kiyak, S. Erdogan, B Bozkurt, C Solak, and O. Cengiz.Prognostic significance of mucin expression in gastric carcinoma. *Dig dis Sci.*2004.49:954.
90. Kohno, N.Serum market KL-6/MUC1 for the diagnosis and management of interstitial pneumonitis. *J Med Invest.*1999.46:151.
91. Kontani, K. O Taguchi, Y Ozaki, J. Hananoka, N. Tezuka, S. Sawai, S. Inoue, S Fujino, T. Maeda, Y Itoh, K Ogasawara, H, Sato. I. Ohkubo, and Kudo. Novel vaccination protocol consisting of injecting MUC1 DNA and nonprime dendritic cell at the samen region greatly enhanced MUC1-specific antitumor immunity in a murine model. *Cancer Gene Ther.*2002.9:330.

92. Kosmahl, M N. Egawa, S. Schroder, F Carneiro, J Luttges, and G. Kloppel. Mucinous nonneoplastic cyst of the pancreas: a novel nonneoplastic cystic change? *Mod pathol.*2002.15:154.
93. Kovarik, A., N. Peat, d, Wilson, S. J. Gendler, and J. Taylor-Papadimitriou. Analysis of the tissue-specific promoter of the MUC1 gene. *J. boil. Chem.*1993 268:9917.
94. Krahenbuhl O. Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing: perforin induced pore formation . *Immunol today.*1991.12:399-402.
95. Kuroda, H. Immunophenotype of lymphocytic infiltration in medullary carcinoma of the breast. *Virchows Arch.* 2005; 446:10-14.
96. Lagow, E.L., and D.D. Carson. Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cell by interferon –gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biochem.*2002.86:759.
97. Lam S, Le Riche JC, Zheng Y, Coldman A, MacAulay C, Hawk E. Sex related differences in bronchial epithelial changes associated with tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst.*1999;91:691-696.
98. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:359-393.
99. Lechler, R. & Pla, M. The credentials of a T-cell epitope. *Immunol. Today.*1995.16, 561-563.
100. Lee, I.J. F. Han, J. Baek, A. Hisatsune, and K. C. Kim. Inhibition of MUC1 expression by indole-3-carbinol. *Int J Cancer.*2004.109:810.
101. Lees, C. J. V. Apostolopoulos, and I. F. McKenzie. Cytokine production from murine CD4 and CD8 cell after mannan-MUC1 immunization. *J Interferon Cytokine Res.*1999:1373.
102. Leroy, X, F. Zerimech, L. Zini, M. C. Copin, M. P. Buisine, B. Gosselin, J. P. Aubert, and N. Porchet. MUC1 expression is correlated with nuclear grade and tumor progression in pT1 renal clear cell carcinoma. *Am J Clin Pathol.*2002.118:47.
103. Leroy, X, M.C. Copin, L. Devisme, M.P. Buisine, J. P. Aubert, B. Gosselin, and N. Porchet. Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopatology.*2002 40:450.

104. Lesuffleur T, Zweibaum A, Real FX. Mucins in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1994;17:153–180.
105. Ligtenberg, M. J., A. M. Gennissen, H.L. Vos, and J. Hilkens. A single nucleotide polymorphism in an exon dictates allele dependent differential splicing of episialin mRNA. *Nucleic Acids Res*. 1991 19:297.
106. Ligtenberg, M. J., H. L. Vos, A. M. Gennissen and J. Hilkens. Episialin, a carcinoma –associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J. Biol Chem*. 1990.265:5573.
107. Lin, S.W. Kemmers, S. Grigull, and P.M. Schlag. Cell surface alpha 2,6 sialylation effects adhesion of breast carcinoma cell. *Exp Cell Res*. 2002.276:101.
108. Liu, B., J.R. Lague, D.P. Nunes, P. Toselli, F.G. Oppenheim, R.V. Soares, R.F. Troxler, and G.D. Offner. Expression of membrane-associated mucins MUC1 and MUC4 in major human salivary glands. *J Histochem Cytochem*. 2002.50:811.
109. Liyanage, U. K. Moore, T. T. Joo, H.G. Prevalent of regulatory T cell is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002.169, 1756.
110. Lofhouse, S. A. V. Apostolopoulos, G. A. Pietersz, W. Li, and F. McKenzie. Induction of T1 (cytotoxic lymphocyte) and/or T2 (antibody) responses to a mucin-1 tumor antigen. *Vaccine*. 1997 15:1586.
111. Lopez, Ferrer, AV. Curull, C Barranco, M Garrido, L. Lloreta, F.X. Real, and C. de Bolos. Mucins as differentiation markers in bronchial epithelium. Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma display similar expression patterns. *Am J Respir Cell mol Biol*. 2001. 24:22.
112. Lung In. American Joint Committee on Cancer.: AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002, pp 167-181.
113. Luttgies, J B. Feyerabend, T. Buchelt, M. Pacena, and G. Kloppel. The mucin profile of noninvasive and invasive mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Am J surg Pathol*. 2002 26:466.
114. Luttgies, J. B. Feyerabend, t. Buchelt , M. Pacena . and G. Kloppel. The mucin profile of noninvasive and invasive mucinous cystic neoplasm of the pancreas. *Am J surg Pathol*. 2002 26:466.

115. Masaki Y, Oka. Y. Ogura, T. Ueno, K. Nishihara, A. Tangoku, M Takahashi, M.Yamamoto, and T. Irimura.Sialylated MUC1 mucin expression in nirmal pancreas, benign pancreatic lesions, and pancreatic ductual adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology*.1999. 46:2240.
116. Matsushita, C. O. H. Irimura,T. Sialyl-dimeric Lewis-X antigen expressed on mucin-like glycoproteins in colorectal cancer metastases. *Lab Invest*.1990.(6):780-91.
117. Mayoral, M,Z.E, Espinosa B. Perspectivas monográficas del cáncer pulmonar: un enfoque molecular y la metástasis al cerebro.*Rev Inst Enf Res Mex*.2004. 17 (4) : 283-292.
118. McNerlan SE, Rea IM, Alexander HD, Morris TC. Changes in natural killer cells, the CD57CD8 subset, and related cytokines in healthy aging. *J Clin Immunol* 1998;18:31-38.
119. Medina M, S. Flores M. Frecuencia y patrón cambiante del cáncer pulmonar en México. 2000. *Salud Pública Mex*.
120. Melief CJM. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res*.1992. 58:143-75.
121. Melief CJM. Kast.T cell immunotherapy by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes and by vaccination with minimal essential epitopes. *Immuno Rev*.1995.145:167-77.
122. Moniaux N.Escande F, Porchet N, et al. structural organization and classification of the human mucin genes.*Front Biosci*.2001.6:D1192-D1206.
123. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*.1997. 111 (6): 1710-7.
124. Mukherjee, P. A. R. Ginardi, C S. Madsen, T. L. Tinder, F. Jacobs, J. Parker, B. Agrawal, B. M. Longenecker, and S. J. Gendler. MUC1-specific CTLs are non-functional within a pancreatic tumor microenviroment. *Glycoconj J*.2001. 18:931.
125. Muller,M. R. F. Grunebach, A. Nencioni, and P. Brossart.Transfection of dendritic cell with RNA induces CD4- and CD8- mediated T cell immunity against

breast carcinomas and reveals the immunodominance of presented T cell epitopes. *J Immunol.*2003. 170:5892.

126. Musselli, C., G. Ragupathi, T Gilewski, K. S.Panageas, Y. Spinant, and P. O. Livingston. Reevaluation of the cellular immune response in breast cancer patients vaccinated with MUC1. *Int J Cancer.*2002. 97:660.

127. Nakakubu Y, Miyamoto M., Cho Y., Oshiki T., Suzuoki M., Hiraoka K., Itoh T., Kondo S., Katoh H.Clinical significance of immune cell infiltration with gallbladder cancer *Br. J. Cancer.*2003 89(9):1736-42).

128. Nakamori S, O. C. S. Irimura, T. MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma.1994. *Gastroenterology.* (2):353-61.

129. Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, Suzuki Y, Shintaku I, Nagura H, Ohtani H.Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* 2001 61(13):5132-6.

130. Nath, D. A. Hartnell, L. Happerfield, D. W. Miles, J. Burchell, J Taylor-Papadimitriou, and P.R. Crocker. Macrophage- tumour cell interaction: identification of MUC1 on breast cancer cell as a potential counter-receptor for the macrophage-restricted receptor, sialoadhesin.. *Immunology.* 1999. 98 :213.

131. Nicol A, Nieda M, Koezuka Y, Pocelli S, Suzuki K, Tadokoro K, et al. Human invariant valpha24+ natural killer T cells activated by alpha galactosylceramide (KRN7000) have cytotoxic anti-tumour activity through mechanisms distinct from T cells and natural killer cells. *Immunology* 2000;99:229-234.

132. Niho S, Yokose T, Suzuki K, Kodama T, Nishiwaki Y, Mukai K. Monoclonality of atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Am J Pathol* 1999; 154: 249-254.

133. Nyberg F, Agrenius V, Svartengren K, Svensson C, Pershagen Gl. Dietary factors and risk of lung cancer in never-smokers. *Int J Cancer* 1998;78:430-436.

134. Ohgami A, T. O M. M. Yasumoto, K. MUC1 mucin mRNA expression in stage I lung adenocarcinoma and its association with early recurrence. 1999. *Ann Thorac Surg.* 67(3):810-4.
135. Ohyama Ch., Satoru K., Kato K., Nakano O., Arai Y., Kato T., Chen S., Fukuda MN., Fukuda M. Natural Killer cells attack tumor cell expressing high levels of sialyl lewis x oligosaccharides. *PNAS.* 2002 19(21):13789-13794.
136. Okada T, Lai T, Kawachi Y, Moroda T, Takii Y, Hatakeyama K, et al. Origin of CD57+ T cells which increase at tumour sites in patients with colorectal cancer. *Clin Exp Immunol* 1995;102:159-166.
137. Ole Werdelin. M Teis J. Processing of glycans on glycoprotein and glycopeptide antigens in antigen-presenting cells. *J Immunol.*1993. 151(5):2419-25.
138. Osada H & Takahashi T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene.*2002. 21(48): 7421-7434.
139. Osinaga E. Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. *IUBMB Life.* 2007, 59(4-5):269-73.
140. Paydas, S B. Sahin, G Gonlusen, B. Hazen, and S. Zorludemir. MUC1 expression in plasmacytoma. *Leuk Res.*2001. 25:221.
141. Peracaula R, Barrabés S, Sarrats A, Rudd PM, de Llorens R. Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Dis Markers.* 2008; 25(4-5):207-18.
142. Perng DW, Perng RP, Kwo BI, Chiang SC. The variation of cell type distribution in lung cancer: a study of 10,910 cases at a medical center in Taiwan between 1970 and 1993. *Jpn J Clin Oncol.* 1996; 26: 229-233.
143. Perrais M, Pigny P, Buisine MP, Porchet N, Aubert JP, Van Seuningem-Lempire I. Aberrant expression of human mucin gene MUC5B in gastric carcinoma and cancer cells. Identification and regulation of a distal promoter. *J Biol Chem.*2001 ;276:15386–15396.

144. Peters PJ, Borst J, Oorschot V. Cytotoxic lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* 1991. 17:1099-109.
145. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco. ARC monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans: tobacco smoke and involuntary smoking. *Oncogene.* 2004. Volume 83. IARC, Lyon.
146. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene.* 2002 Oct 21; 21(48):7435-51.
147. Piotr L. and Anna Litynska. Tumor cell N-glycans in metastasis. *Acta Biochim Pol.* 1997. 44(2):343-57.
148. Pisarev, V. M. L. Kinarsky, T. Caffrey, F. G. Hanisch, S. Sanderson, M. A. Hollingsworth, and S. Sherman. T cell recognize PD (N/T) R motif common in a variable number of tandem repeat and degenerate repeat sequences of MUC1. *Immunopharmacol.* 2005. 5:315.
149. Plate, J. M. S. Shott, and J. E. Harris. Immunoregulation in pancreatic cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 1999. 48:270.
150. Pratt, W. S. I. Islam, and D. M. Swallow. Two additional polymorphisms within the hypervariable MUC1 gene : association of alleles either side of the VNTR region. *Ann Hum Genet.* 1996. 60 (Pt1):21.
151. Quinlin, B. D. P. D. Wright, S.E. Context of MUC1 epitope: immunogenicity. *Oncol Rep.* 2007.2;17(2):453-6.
152. Rahn JJ, Dabbagh L, Pasdar M, Hugh JC. The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature. *Cancer.* 2001; 91(11):1973-82.
153. Rahn, J. J. L. Dabbagh, M. Pasdar, and J. C. Hugh. The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma : an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature. *Cancer.* 2001 91:1973.
154. Ramirez E, Cicero R, Zuñiga G, Novelo V, Navarro F, Casanova JM. Bronchogenic Cancer at Hospital General of Mexico. A study of 2 decades. *Salud Publica Mex.* 1995;37: 155-161.

155. Reddy, P.K., D. V. Gold, T. M. Cardillo, D. M. Goldenberg, H. Li, and J. D. Burton. Interferon gamma upregulates MUC1 expression in haematopoietic and epithelial cancer cell lines, an effect associated with MUC1 mRNA induction . *Eur J cancer* .2003.39:397.
156. Regimbald, L. H. M. Pilarski, B M. Longenecker, M. A. Reddish, G. Zimmermann, and J. C. Hugh.The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule in breast cancer. *Cancer Res*.1996. 56:4244.
157. Reis CA, David L, Correa P, Carneiro F, de Bolos C, Garcia E, Mandel U, Clausen H, Sobrinho-Simoes M. Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) expression.*Cancer Res*.1999. 59:1003–1007.
158. Reis CA, David L, Nielsen PA, Clausen H, Mirgorodskaya K, Roepstorff P, Sobrinho Simoes M. Immunohistochemical study of MUC5AC expression in human gastric carcinomas using a novel monoclonal antibody. *Int J Cancer*. 1997;74:112–121.
159. Reis, C.A, David L, Seixas M, Burchell J, Sobrinho-Simoes M. Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC1 mucin in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer*.1998; 79, 402–410.
160. Rivera, S, Flores.Cáncer pulmonar.(Distribución de metástasis de acuerdo al tipo histológico. Estudio de autopsias. *Rev Inst Nal Enf Resp*.2002 Volumen 15 - número 2 Abril - junio 2002Págs. 84-89.
161. Robbins PF. Kawakami.Human tumor antigens recognised by T cell. *Curr Opin Immunol*.1996. 8:628-36.
162. Rose MC. Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases.*Am J Physiol*.1992 263(4 Pt 1):L413-29.
163. Rudd P M, Elliot T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA.Glycosilation and the immune system. *Science*.2001.291:2370-6.
164. Ruffini E, Asioli S, Filosso PL, Lyberis P, Bruna MC, Macrì L, Daniele L, Oliaro A. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in lung neoplasms. *Ann Thorac Surg*. 2009 Feb;87(2):365-71; discussion 371-2.

165. Rughetti, A., M. Biffoni, L. Pierelli, H. Rahimi, G. Bonanno, S. Barachini, I. Pellicciotta, C. Napoletano, E. Pescarmona, A. Del Nero, P. Pignoloni, Frati, and M. Nuti. Regulated expression of MUC1 epithelial antigen in erythropoiesis. *Br J Haematol.* 2003. 120:344.
166. Sakamaki, T., Y. Iman, and T. Irimura. Enhancement in accessibility to macrophages by modification of mucin-type carbohydrate chains on a tumor cell line: role of a C-type lectin of macrophages. *J Leukoc Biol.* 1995. 57:407.
167. Sánchez, Céspedes M. Dissecting the genetic alterations implicated in lung carcinogenesis. *Lung Cancer*, 2003. 40(2):111-21.
168. Schumman, J., A.P. Campbell, R.R. Koganty, and B.M. Longenecker. Probing the conformational and dynamical effects of O-glycosylation within the immunodominant region of a MUC1 peptide tumor antigen. *J Pept Res.* 2003. 61:91.
169. Schumman, J. D. Qui, R. R. Koganty, B.M. Longenecker, and A. P. Campbell. Glycosylation versus conformational preferences of cancer associated mucin core. *Glycoconj. J.* 2000. 17:835.
170. Secretaría de Salud.: México 2004. Información para la rendición de cuentas. 2a edición, 2005.
171. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1998. 1378(1): F21-59.
172. Sengupta, A. D. Valdramidou, S. Huntley, S.J. Hicks, S.D. Carrington, and A.P. Corfield. Distribution of MUC1 in the normal human oral cavity is localized to the ducts of minor salivary glands. *Arch Oral Biol.* 2001. 46:529.
173. Shiraga, T. D. Smith, H N. Nuthall, M.A. Hollingsworth, and A. Harris. Identification of two novel elements involved in human MUC1 gene expression in vivo. *Mol Med.* 2002. 8:33.
174. Singhal A, Hakomori S. Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *BioEssays.* 1990; 12(5): 223-230).
175. Smith MJ, Street SE, Trapani JA. Cutting edge: granzymes A and B are not essential for perforin-mediated tumor rejection. *J Immunol* 2003; 171:515-518.

176. Smith, M. J. M. Burchell R. Graham, E. P. Cohen, and J. Taylor – Papadimitriou. Expression of B7. 1 in a MUC1- expressing mouse mammary epithelial tumor cell line inhibition tumorigenicity but does induce autoimmunity in MUC1 transgenic mice. *Immunology*.1999. 97: 648.
177. Soares , M. M.,V. Mehta, and O. J. Finn. There different vaccines based on the 140-amino acid MUC1 peptide with seven tandemly repeated tumor –specific epitopes elicit distinct immune effector mechanisms in wild-type versus MUC1 transgenic mice with different potential for tumor rejection. *J. Immunol*.2001. 166:6555.
178. Sozzani, A. P. Benedetto.C. Is Sialyl Lewis x antigen expression a prognostic factor in patients with breast cancer?. *Int J Surg Pathol*.2008(4):365-74.
179. Springer GF. Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J Mol Med*.1997. 75:594-602.
180. Springer GF. Tn epitope (N-acetyl-D-galactosamine alpha-O-serine/threonine) density in primary breast carcinoma: a functional predictor of aggressiveness.. *Mol Immunol*. 1989; 26(1):1-5.
181. Springer, Ch. D. Tegtmeyer, H. Blood group Tn-active macromolecules from human carcinomas and erythrocytes: characterization of and specific reactivity with mono- and poly-clonal anti-Tn antibodies induced by various immunogens.*Carbohydr Res*.1998.178:271-92.
182. Srinivasan N, Bane SM, Ahire SD, Ingle AD, Kalraiya RD. Poly N-acetyllactosamine substitutions on N- and not O-oligosaccharides or Thomsen-Friedenreich antigen facilitate lung specific metastasis of melanoma cells via galectin-3. *Glycoconj J*.2008. Oct 24.
183. Stepensky, T. V. E. Eisenbach. L. O-glycosylated versus non-glycosylated MUC1-derived peptides as potential targets for cytotoxic immunotherapy of carcinoma. *Clin Exp Immunol*.2005. 143(1):139-49.
184. Strous GJ, Dekker J. Mucin-type glycoproteins.*Crit Rev Biochem Mol Biol*.1992.27:57–92.
185. Tamada S, Goto M, Nomoto M, Nagata K, Shimizu T, Tanaka S, Sakoda K, Imai K, Yonezawa S. Expression of MUC1 and MUC2 mucins in extrahepatic bile

duct carcinomas: its relationship with tumor progression and prognosis. *Pathol Int.* 2002; 52(11):713-23.

186. Tanaka, Y. S. Koido. M Ohana, C.Liu, and J . Gong. Induction of impaired antitumor immunity by fusion of MHC class II-deficient dendritic cell with tumor cells. *J. Immunol.* 2005. 174:1274.

187. Tempero, R. M. M. L. VanLith, K. Morikane, G. J. Rowse, S. J. Gendler, and M. A. Hollingsworth. CD4+ lymphocytes provide MUC1-specific tumor immunity in vivo that is undetectable in vitro and is absent in MUC1 transgenic mice. *J Immunol.* 1998. 161:5500.

188. Thôm I, Schult-Kronefeld O. Burkholder I. Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. *Lung cancer.* 2007; 56(3): 391-97.

189. Thurin M, Kieber-Emmons T. SA-Lea and tumor metastasis: the old prediction and recent findings. *Hybrid Hybridomics.* 2002 Apr; 21(2):111-6).

190. Torky M, El Zeky F, May JC. Significant changes in the distribution of histologic types of lung cancer. A review of 4928 cases. *Cancer.* 1990; 65: 2361-2367.

191. Ugorski M, Laskowka A. Sialyl Lewis (a): a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of lung cancer cells. *Acta Biochem Pol.* 2002. 49(2):303-311.

192. Van den Steen, R. D. V. Opdenakker. G. Cytokine and protease glycosylation as a regulatory mechanism in inflammation and autoimmunity. 1998; 435:133-43.

193. Van den Steen. R. P.M. Opdenakker. G. . Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1998. Review 33(3):151-208. .

194. VanLith, M L. K. G. Kohlgraf, C L. Sivinski, R. M. Tempero, and M. A. Hollingsworth. Muc1-specific anti-tumor responses: molecular requirements for CD4-mediated responses. *Int Immunol.* 2002. 14:873.

195. Varki A. Cummings D. Hudson HF. Stanley P. Hart GW. Etzler ME. *Essentials of Glycobiology. Structure and biosynthesis. Second Edition.* 2009. Ed. Varki Ajit.

196. Vasir, B., D. Avigan, Z. Wu, K. Crawford, S. Turquist, J. Ren, and D. Kufe. Dendritic cell induce MUC1 expression and polarization of human T cell by an IL-7-dependent mechanism. *J. Immunol.* 2005. 174:2376.
197. Vgenopoulou S, Lazaris AC, Markopoulos C, Boltetsou E, Kyriakou V, Kavantzias N, Patsouris E, Davaris PS. Immunohistochemical evaluation of immune response in invasive ductal breast cancer of not-otherwise-specified type. *Breast.* 2003 Jun;12(3):172-8.
198. Vlad, A. M. S. Muller, M. Cudic, H. Paulsen, L. Otvos, Jr., F. G. Hanisch, O. J. Finn. Complex carbohydrates are not removed during processing of glycoproteins by dendritic cell: processing of tumor antigen MUC1 glycopeptides for presentation to major histocompatibility complex class II-restricted T cell. *J Exp Med.* 2002. 196:1435.
199. Von Mensdorff-Pouilly, S. M. M. Gourevitch, P. Kenemans, A. A. Verstraeten, S. V. Litvinov, G. J. van Kamp, S. Meijer, J. Vermorken, and J. Hilgers. Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (MUC1) in patients with benign and malignant breast tumours. *Eur J Cancer.* 1996. 32 A:1325.
200. Von Mensdorff-Pouilly, S., E. Petrakou, P. Kenemans, K. van Uffelen, A. A. Verstraeten, F. G. Snijdwint, G. J. van Kamp, D. J. Schol, C. A. Reis, M. Price, P. O. Livingston, and J. Hilgers. Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and n-acetylgalactosamine (GalNAc) peptides. *Int J Cancer.* 2000. 86: 702.
201. Wajchman, H. J., C. W. Pierce, V. A. Varma, M. M. Issa, J. Petros, and K. E. Dombrowsky. Ex vivo expansion of CD8⁺CD57⁺ and CD8⁺CD57⁻ natural killer T cells specific for MUC1 mucin. *Cancer Res.* 2004. 64:1171.
202. Wright, N. A., C. M. Pike, and G. Elia. Ulceration induced a novel epidermal growth factor –secreting cell lineage in human gastrointestinal mucosa. *Digestion* 46 Suppl. 1990. 2:125.
203. Xia, J. Y. Tanaka, S. Koido, C. Liu, P. Mukherjee, S. J. Gendler, and J. Gong. Prevention of spontaneous breast carcinoma by prophylactic vaccination with dendritic /tumor fusion cells. *J. Immunol.* 2003. 170:1980.

204. Xu Y, Gendler SJ, Franco A. Designer glycopeptides for cytotoxic T cell-based elimination of carcinomas. *J Exp Med.*2004.199:707-16.
205. Yin, L., Y. Li, J. Ren, H. Kuwahara, and D. Kufe. Human MUC1 carcinoma antigen regulates intracellular oxidant levels and the apoptotic response to oxidative stress. *J Biol Chem.*2003 278:35458.
206. Yonezawa, S., and E. Sato. Expression of mucin antigen in human cancer and its relationship with malignancy potential. *Pathol int.*1997 47:813.
207. Yonezawa S, Sato E. Expression of mucin antigens in human cancers and its relationship with malignancy potential. *Pathol Int.*1997 .47(12):813-30.
208. Yu CJ, Yang PC, Shew JY, Hong TM, Yang SC, Lee YC, Lee LN, Luh KT, Wu CW. Mucin mRNA expression in lung adenocarcinoma cell lines and tissues. *Oncology.*1996. 53:118–126.
209. Yuan, Z. L., J. Guan, L. Wang, W. Wei, A. B. Kane, and Y. E. Chin. Central role of the threonine residue within the p1 loop of receptor tyrosine kinase in STAT3 constitutive phosphorylation in metastatic cancer cell. *Mol cell Biol.* 2004.24:9390.

Anexos:

Anexo 1. Reactivos utilizados.

ANTICUERPOS PRIMARIOS

DakoCytomation:

- CD 57
- CD8
- CD15

Abcam

- MUC1 clona DF3
- CD25
- Anti-T

Millipore

- Vimentina
- CD4

Sialil Lewis X

Genetex

- Anti Tn
- Kit de doble marcaje de Dako (EnVision™ G/2 Doblestain System, Rabbit/Mouse –DAB+/Permanent Red) incluyen los anticuerpo secundario Polímero HRP y el Polímero AP Dako (E.U.A.),

SOLVENTES Y ALCOHOLES

- Xilol (EMD).
- Alcohol absoluto (Mallinckrodt).
- Acetona (Merck).
- Aminosilano al 3%.
- Alcohol 96° (Protec).

INMUNOTINCION

- Recuperador de antígeno pH 7, Diva Decloaker, 10X de Biocare Medical(E.U.A.) .
- Recuperador de antígeno pH alto, Retriever EDTA 20X de Bio SB (E.U.A.).
- Bloqueador de peroxidasa, Peroxidazed 1 Biocare Medical (E.U.A.).
- Neuraminidase (sialidase) from *Vibrio cholerae*, 1U Boehringer Mannheim (Barcelona).
- 3´3 diamonobencidina, DAB 1000 Chromogen System De Biocare Medical (E.U.A.).
- CAT Hematoxylin, Biocare Medica (E.U.A.)
- Medio de montaje, EcoMount de Biocare Medical (E.U.A.).

SALES

- Fosfato de sodio monobásico (Baker Analyzed E.U.A.)
- Fosfato de sodio dibásico (Baker Analyzed E.U.A.)
- Trizma® Base (Sigma, E.U.A.)
- NaCl (J. T. Baker,E.U.A.)
- Cloruro de calcio (Productos Químicos Monterrey)
- Carbonato de litio (J. T. Baker E.U.A.)

DETERGENTES

- Tween 20 (Sigma E.U.A.).

OTROS

Aminosilano **3-(Trimethoxysilyl) propyl methacrylate** (Sigma E.U.A.).

Anexo 2. Soluciones utilizadas.

Solución recuperadora de antígeno pH alto 1X

- 5 ml de Retriever EDTA 20X
- 45 ml de agua desionizada

Aminosilano 3-(Trimethoxysilyl) propyl methacrylate) al 3%

- 7.5 ml de aminosilano
- 242 ml de acetona

Solución salina tamponada (TBS)

- 2.42 g de Trizma® Base
- 8 g de NaCl
- aforar a 1 litro con agua desionizada
- ajustar pH a 7

Formol al 10% amortiguado

- 4 g de fosfato de sodio monobásico
- 6.5 g de fosfato de sodio dibásico
- 100 ml formol
- aforar a 1 litro con agua desionizada

Alcohol al 70%

- 70 ml de alcohol absoluto
- 30 ml de agua desionizada

TBS-Tween al 0.05%

- 1 litro de TBS pH 7
- 0.5 ml de Tween 20 (Sigma)

TBS-calcio 2mM

- 0.22 g de cloruro de calcio
- Aforar a 1 litro con TBS

Solución recuperadora de antígeno pH7 1X

- 5 ml de Diva Decloaker 10X
- 45 ml de agua desionizada

Solución de revelado

- 50 µl de DAB1000 Chromogen System
- 1 ml de DAB Substrate Buffer

Solución saturada de carbonato de litio

- 2 g de carbonato de litio
- 50 ml de agua desionizada

Albúmina al 10%

- 1 g de albúmina
- 10 ml de TBS.