



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Medicina

***ASOCIACIÓN DEL EPÍTOPO T_n DE MUC1 CON EL
FENOTIPO DE CÉLULAS CITOTÓXICAS EFECTORAS EN
ADENOCARCINOMA PULMONAR***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

ANA KARINA SALDAÑA VILLA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. PATRICIA SOFÍA GOROCICA ROSETE

COMITÉ TUTOR:
**DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ
DRA. MARÍA EUGENIA MANJARREZ ZAVALA
DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA**

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2011



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.

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de noviembre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del la alumna **SALDAÑA VILLA ANA KARINA** con número de cuenta **508013429** con la tesis titulada **"ASOCIACIÓN DEL EPÍTOPO Tn DE MUC1 CON LOS FENOTIPOS DE CÉLULAS CITOTÓXICAS EFECTORAS EN ADENOCARCINOMA PULMONAR."**, realizada bajo la dirección de la : **DRA. PATRICIA SOFÍA GOROSICA ROSETE.**

Presidente: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
Vocal: DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ
Secretario: DRA. PATRICIA SOFÍA GOROSICA ROSETE
Suplente: DRA. MARIA EUGENIA MANJARREZ ZAVALA
Suplente: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de enero de 2011



DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN
COORDINADOR DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A la Dra. Patricia Sofía Gorocica Rosete por su tiempo y esfuerzo dedicado a mi formación como investigador

A la Dra. Martha Legorreta Herrera por su minuciosa revisión del trabajo

Al Dr. Andrés Eliu Castell Rodríguez por sus aportaciones en la realización de la tesis

A la Dra. María Eugenia Manjarrez Zavala por todo su apoyo

Al Dr. Ricardo Lascurain Ledesma por sus observaciones en la revisión de tesis

DEDICATORIA

A Margarita, mi madre por su apoyo, cariño y comprensión que siempre me ha dado

A la memoria de mi padre, Jesús Antonio, porque sé que siempre ha estado a mi lado

A mi hermana Liliana por sus consejos y por creer en mí

A Alberto, por el amor que me brinda

A Jackeline por su ternura y gracia que me alegran los días

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica, especialmente a la doctora Anel Alfaro por sus consejos y palabras de aliento

A todos mis amigos del Grupo Lasker por su sincera amistad

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCION	3
3.1 Clasificación del cáncer pulmonar	4
3.2 Adenocarcinoma pulmonar	5
3.3 Factores asociados al desarrollo del cáncer pulmonar.....	6
3.4 Carcinogénesis.....	6
3.5 Antígenos sacarídicos asociados a tumor	7
3.6 Características de los glicanos.....	8
4. ANTECEDENTES.....	12
4.1 MUC1 y cáncer.....	12
4.2 Respuesta inmunológica a O- glicanos asociados a tumor.....	15
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
6. HIPÓTESIS.....	17
7. OBJETIVO GENERAL	17
8. OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
9. MATERIALES Y MÉTODOS	17
9.1 Muestras biológicas	17
9.2 Criterios de inclusión.....	18
9.3 Principio de la inmunohistoquímica	19
9.4 Procesamiento de los tejidos	19
9.5 Desparafinado y rehidratado de tejidos	19
9.6 Recuperación antigénica.....	20
9.7 Histoquímica con anticuerpos	20
9.8 Histoquímica con lectinas.....	22
9.9 Evaluación microscópica.....	23
9.10 Digitalización y análisis de imágenes.....	24
9.11 Análisis estadístico	24
10. RESULTADOS	24
11. DISCUSION	37
12. CONCLUSION	40
13. PERSPECTIVAS	40
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXO 1	49
ANEXO 2	50

Lista de figuras, cuadros y tablas

FIGURA	TÍTULO
1	Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos en México según sexo
2	Principales tipos histológicos del cáncer pulmonar
3	Cambios morfológicos durante la carcinogénesis
4	Estructura química del antígeno Tn
5	Síntesis de algunas variantes de antígeno Lewis asociados a neoplasias
6	Estructura de MUC1
7	Isoformas de la proteína MUC1 (MUC1/X y MUC1/Y)
8	Metástasis del miocardio con infiltrado linfocitario
9	Inmunohistoquímica en tejido con adenocarcinoma pulmonar y de riñón y encéfalo metastásicos.
10	Expresión del antígeno Tn y Sialil Tn en tejidos metastásicos de corazón e intestino con abundante infiltrado inflamatorio
11	Expresión de las isoformas del antígeno T identificado con lectinas

CUADRO	TÍTULO
1	Cambios en carbohidratos asociados a cáncer
2	Estructura de los 8 "core" presentes en los O-glicanos
3	Datos clínicos de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar
4	Características de los anticuerpos primarios utilizados
5	Características de las lectinas utilizadas

TABLA	TÍTULO
1	Relación de las células infiltrantes de tumor con respecto a las células tumorales
2	Porcentaje de linfocitos con expresión de células CD4+, CD8+ y CD57+ en adenocarcinoma pulmonar y metástasis presentes en 1mm ²
3	Porcentaje de linfocitos con expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69 en adenocarcinoma pulmonar y metástasis, por mm ²
4	Expresión y distribución de los antígenos sacarídicos MUC1, Tn, sialil Tn y T en las células tumorales de los tejidos pulmonar y en los tejidos con metástasis
5	Relación de MUC1 con el antígeno Tn y MUC 1 con antígeno T
6	Valores de (p) en las pruebas de Chi cuadrado para conocer el valor de significancia y la asociaciones con el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los marcadores sacarídicos asociados a tumor MUC1, Tn y T.
7	Valores de (p) en las pruebas de Chi cuadrado para conocer el valor de significancia y la asociaciones con el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los marcadores de poblaciones de linfocitos T CD4, CD8 y CD57 con respecto al antígeno tumoral MUC1
8	Valores de (p) en las pruebas de Chi cuadrado para conocer el valor de significancia y la asociaciones con el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los marcadores de poblaciones de linfocitos T CD4, CD8 y CD57 con respecto al antígeno tumoral Tn
9	Valores de (p) en las pruebas de Chi-cuadrado para conocer el valor de significancia y la asociaciones con el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre el marcador de activación de linfocitos T CD25 con las poblaciones de linfocitos T CD4, CD8 y CD57
10	Valores de (p) en las pruebas de Chi cuadrado para conocer el valor de significancia y la asociaciones con el coeficiente de correlación de Pearsons (r) entre el marcador de activación de linfocitos T CD69 con las poblaciones de

- 11 linfocitos T CD4 y CD8.
Expresión de isoformas del antígeno T en las células tumorales en el tumor primario y en los tejidos con metástasis, identificadas con 3 lectinas.

1. RESUMEN

Introducción. Las mucinas recubren de manera normal el epitelio respiratorio. En las células neoplásicas del adenocarcinoma pulmonar se presentan cambios en la glicosilación en la mucina tipo 1 (MUC1). Estos cambios consisten en la alteración de la O-glicosilación de la molécula, lo que genera estructuras con cadenas sacarídicas cortas. Estas formas hipoglicosiladas exponen la estructura formada entre una serina o treonina de la parte peptídica unida al primer residuo sacarídico en la O-glicosilación que siempre es N-Acetilgalactosamina (GalNAc) a la que se le conoce como antígeno Tn. Esta estructura es la precursor del disacárido Gal β 1,3GalNAc-O-Ser/Tre conocido como el antígeno T. La MUC1 epitelial no es inmunogénica, hasta que se altera su estructura sacarídica, por lo que esperaríamos que se presentara un infiltrado inflamatorio en la zona del tumor. **Objetivo.** Identificar si el epítipo Tn de la molécula MUC1 en tumores de pacientes con adenocarcinoma pulmonar está asociado con el fenotipo efector de las células citotóxicas infiltrantes del tumor primario y de los tejidos con metástasis. **Materiales y métodos:** Se utilizaron muestras histológicas incluidas en parafina de 6 individuos fallecidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar en estadio clínico IV. Se analizaron por medio de inmunohistoquímica los tejidos del tumor primario y metástasis. En ellos se identificó la presencia de la MUC1 hipoglicosilada y se correlacionó la expresión del antígeno Tn y el antígeno T. También se caracterizó las poblaciones de linfocitos T infiltrantes en la zona del tumor. Las evaluaciones se realizaron mediante microscopía de luz y análisis digital de imágenes con el software J IMAGE. **Resultados:** Se encontró que el 70% de los tejidos con neoplasia expresó MUC1 hipoglicosilada y mostraron una correlación $r = 0.95$ con el antígeno T, además hubo una correlación con la presencia de MUC1 con los linfocitos T CD8+. También se identificó la presencia de las isoformas en los tejidos neoplásicos por medio de histoquímica, la presencia de isoformas del antígeno T utilizando 3 lectinas: amaranto (ALL), cacahuete (PNA) y jacalina (JAC).

2. ABSTRACT

Introduction. Mucin recovering the respiratory epithelium. Neoplastic cells in lung adenocarcinoma are changes in glycosylation in mucin-1 (MUC1). These changes include the alteration of the O-glycosylation of the molecule, creating structures with shorter saccharide chains. These forms under glycosilated, left exposed the structure formed between a serine or threonine of the peptide attached to N-acetylgalactosamine (GalNAc), this structure (GalNAc-O-Ser/Thr) is known as Tn antigen. This structure is the precursor of the disaccharide Gal β 1, 3GalNAc-O-Ser/Thr known as T antigen. The epithelial MUC1 is non immunogenic, until alter saccharidic structure, so expect to have an inflammatory infiltrate in the tumor area. **Objective.** Identify whether the Tn epitope of the molecule MUC1 in tumors of patients with lung adenocarcinoma phenotype is associated with cytotoxic effector cells infiltrating the primary tumor and metastatic tissues. **Materials and methods:** We used paraffin-embedded histological samples of 6 individuals died at the National Institute of Respiratory Diseases (INER) diagnosed with lung adenocarcinoma in clinical stage IV. By immunohistochemistry, were analyzed sections to tissues with primary and metastatic tumor. They identified MUC1 correlated under glycosilated and Tn antigen expression and T antigen Also characterized the T lymphocyte populations infiltrating the tumor site. Evaluations were performed using light microscopy and digital image analysis with IMAGE J software. **Results:** 70% of tumor tissues with MUC1 expressed under glycosilated. There is a correlation $r = 0.95$ between MUC1 with Tn antigen and a correlation of MUC 1 with CD8 + T lymphocytes. You can identify the presence of isoforms in neoplastic tissues by histochemistry the presence of isoforms of T-antigen using 3 lectins: amaranto (ALL), peanut (PNA) and jacalin (JAC).

3. INTRODUCCION

El cáncer es la primera causa de muerte en el mundo y es responsable de más del 12% de todas las defunciones anuales. En el caso del cáncer de pulmón se presentan 1,4 millones de defunciones al año en el mundo, seguido por el cáncer de estómago, el de hígado, el de colon y el cáncer de mama (WHO, 2009).

En México, el 12.9% de las defunciones están relacionadas con cáncer y este ocupa el tercer lugar (INEGI, 2007). En los varones, el 16.6% y en las mujeres el 7.7% de los casos de muerte son debidos a cáncer de tráquea, bronquios y pulmón (figura 1).

Los adenocarcinomas representan un 29,4% de todos los tipos de cáncer de pulmón y ha tenido un incremento de casos durante los últimos años. La mayoría de los casos de adenocarcinoma de pulmón están asociados al hábito de fumar y con pacientes con enfermedades pulmonares previas. Sin embargo, entre aquéllos que nunca han fumado, los adenocarcinomas, son la forma más frecuente de cáncer de pulmón. Llama la atención que del 30 al 35% de los casos se presentan en pacientes jóvenes, tanto fumadores como en no fumadores (El-Torky, 1990; Green, 1993; Perng, 1996; Makitaro, 1999; Albert, 2001).

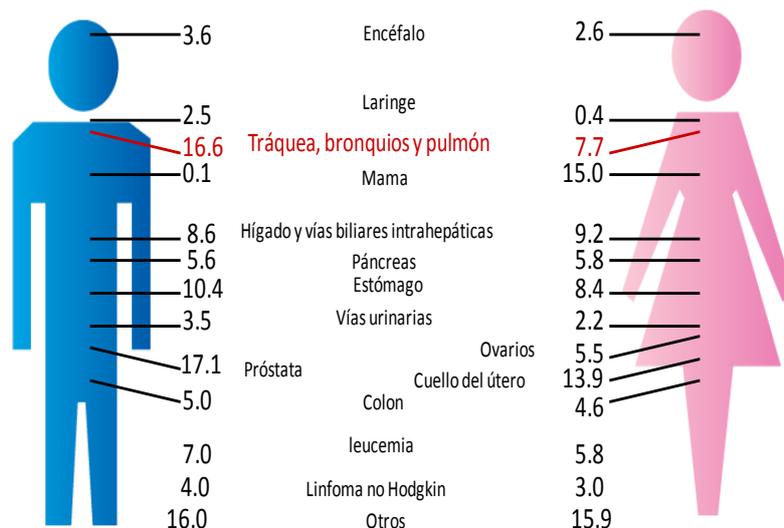


Figura 1. Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos en México (INEGI, 2007).

3.1 Clasificación del cáncer pulmonar

El cáncer de pulmón es un conjunto de enfermedades resultantes del crecimiento maligno de células del tracto respiratorio. El cáncer pulmonar se clasificó inicialmente según su origen: en cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP) y cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP). El CPCP se asocia principalmente al tabaquismo (Rivera, 2002; Keith, 2009). Es la forma de cáncer pulmonar más agresiva y generalmente comienza en los bronquios. Aunque las células cancerosas son pequeñas, crecen rápidamente y forman tumores grandes. Estos tumores a menudo se diseminan con rapidez a otros tejidos del cuerpo, incluyendo el cerebro, el hígado y el hueso (Rivera, 2002). En cambio, el CPCNP es más frecuente y tiene comportamiento menos agresivo, pero presenta variedades histológicamente heterogéneas (Travis, 2004). Las variedades o tipos más comunes son el carcinoma de células epidermoides o escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes (figura 2). Estos tipos histológicos presentan similitudes en cuanto a los métodos de diagnóstico, la estadificación, el pronóstico y el tratamiento, por lo que se consideran dentro de la misma clasificación (Cáncer, 2011).

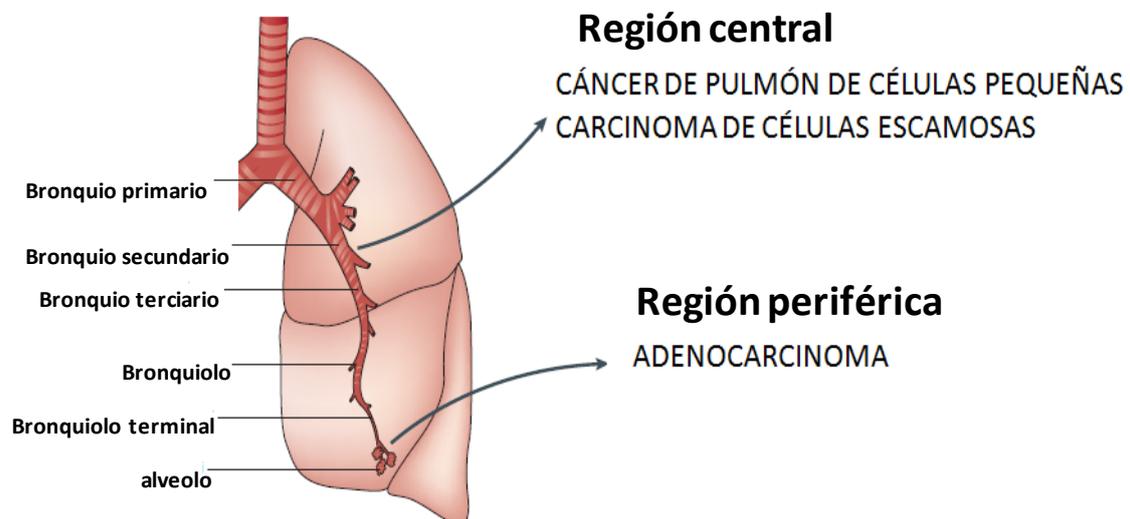


Figura 2. Principales tipos histológicos del cáncer pulmonar (modificado de Sun, 2007).

3.2 Adenocarcinoma pulmonar

El adenocarcinoma es un carcinoma que tiene su origen en las células epiteliales localizadas principalmente en la periferia del pulmón que constituyen el revestimiento interno del sistema respiratorio, el cual contiene numerosas células glandulares productoras de moco. El epitelio respiratorio típico es complejo, consta de seis tipos de células, a partir de cualquiera de éstas puede desarrollarse la neoplasia (Albert, 2001). Como el origen del adenocarcinoma pulmonar puede ser a partir de diversos tipos de células del epitelio bronquial, éste presenta varios patrones histológicos y de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud, existen diversos tipos de adenocarcinoma (Travis, 2004):

1. Adenocarcinoma con mezcla de subtipo
2. Adenocarcinoma acinar
3. Adenocarcinoma papilar
4. Carcinoma bronquioalveolar
 - no-mucinoso
 - mucinoso
 - indeterminado (mezclado no-mucinoso y mucinoso)
5. Adenocarcinoma solido con producción de moco
 - adenocarcinoma fetal
 - carcinoma mucinoso
 - cistoadenocarcinoma mucinoso
 - adenocarcinoma de células claras
 - carcinoma de células en anillo de sello

Con frecuencia este 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, 2002).

3.3 Factores asociados al desarrollo del cáncer pulmonar

En general, el desarrollo del cáncer o carcinogénesis es multifactorial, participan factores tanto endógenos como factores exógenos (Sheu, 2008). Para el caso concreto del cáncer pulmonar existen factores exógenos como entre los que se encuentran los factores físicos como la radiación ultravioleta y la radiación ionizante; los factores químicos como la exposición al asbesto, al humo de leña o al humo del tabaco y los factores biológicos como las infecciones crónicas causadas por determinados virus o bacterias (WHO, 2009). Entre los factores endógenos más importantes están el envejecimiento, las patologías que cursan con procesos inflamatorios crónicos como la obesidad, el sobrepeso y diabetes, así como la predisposición genética (WHO, 2009).

3.4 Carcinogénesis

En las alteraciones moleculares en células neoplásicas frecuentemente participan numerosos genes como oncogenes, genes asociados a factores de transcripción, genes supresores y a genes reguladores de ciclo celular (Salgia, 1998). Estos cambios genéticos se reflejan con frecuencia como cambios morfológicos, moleculares y bioquímicos los cuales están parcialmente definidos.

La célula alterada desarrolla lesiones que van evolucionando hasta el desarrollo de una neoplasia. Al inicio, las células alteradas conservan su apariencia normal pero se multiplican y crecen de manera acelerada desarrollando una hiperplasia. A partir de estas células con una proliferación acelerada, la progenie presenta una orientación y morfología atípica donde la relación núcleo/citoplasma y nucléolo/núcleo cambia, lo que se denomina como displasia. Las alteraciones pueden conservar las uniones intracelulares para dar lugar a cáncer *in situ* o bien si se pierden las uniones intercelulares, las células neoplásicas empiezan a invadir el tejido subyacente y migrar por sangre

o linfa a otros tejidos para generar un cáncer metastásico como se muestra en la figura 3 (Weinberg, 1996).

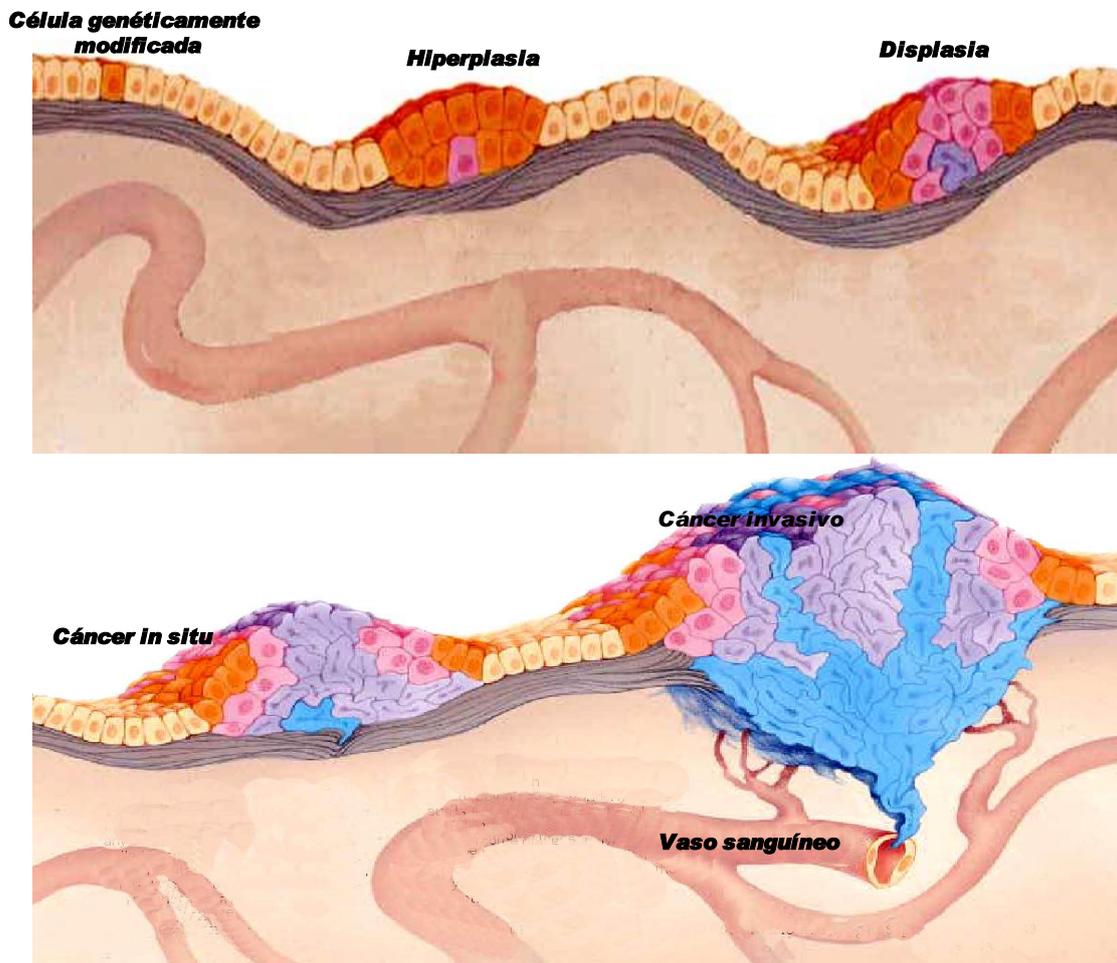


Figura 3. Cambios morfológicos durante la carcinogénesis (Weinberg, 1996).

3.5 Antígenos sacarídicos asociados a tumor

El comportamiento del tumor está asociado a cambios genéticos y bioquímicos, (Peracaula, 2007). Estas modificaciones se presentan comúnmente en algunas estructuras sacarídicas presentes en macromoléculas como las glicoproteínas, lo que altera sus propiedades fisicoquímicas. Además estas modificaciones frecuentemente generan nuevas estructuras antigénicas, consideradas como nuevos epítomos o mejor dicho glicótopos por la presencia de estructuras sacarídicas (Freire, 2002). Un ejemplo de esto es el antígeno T

(Gal β 1,3GalNAc-O-Serina/Treonina) y su precursor, el antígeno Tn (GalNAc-O-Serina/Treonina) (figura 4), así como sus variantes con ácido siálico, como el antígeno sialil T y sialil Tn (Van den Steen, 1998; Freire, 2002).

Hay modificaciones en las estructuras sacarídicas que se deben a la alteración en la expresión de genes que codifican para las enzimas encargadas de la glicosilación (Ko, 1999; Dall'Olio, 2001). Dichos cambios se manifiestan como: a) neosíntesis, b) síntesis incompleta y c) cambios organizacionales de las moléculas sacarídicas expresadas en la membrana celular (cuadro 1). Estos cambios en glicanos se presentan con mayor frecuencia en las células de diversos tipos de adenocarcinoma (Singhal, 1990), por lo que se ha propuesto utilizar como marcadores moleculares para ayuda en el diagnóstico o del pronóstico de pacientes con algunos tipos de cáncer (Peracaula, 2008).

Cuadro 1. Cambios en carbohidratos asociados a cáncer (Singhal, 1990)

Neosíntesis
a. Carbohidratos periféricos de las series lacto Le X y Le Y, sialil Le X y sialil Le A en adenocarcinoma
b. Sialil Tn en adenocarcinoma
Síntesis bloqueada o incompleta resultando en acumulación del precursor
Expresión de glicoproteínas que contienen los antígenos Tn y T en varios adenocarcinomas
Cambios organizacionales de carbohidratos en membranas causados por:
a. Densidad de carbohidratos
b. Longitud de la cadena de carbohidratos
c. Glicoconjugados adyacentes
d. Composición de ceramidas

3.6 Características de los glicanos

En la naturaleza existen varios tipos de glicanos, los más comunes son los N-glicanos y los O-glicanos (Freire, 2002). La diferencias entre O y N glicanos radican en la naturaleza de la unión que presenten entre la parte proteica o lipídica y el carbohidrato. Los N-glicanos son complejos macromoleculares formados a partir de un precursor sintetizado en el retículo endoplásmico

rugoso (RER). Este precursor consta de un residuo de N-acetil glucosamina (GlcNAc) unido al extremo amino (NH₂) terminal de un residuo de asparagina (Asn) localizado en una proteína. Por otro lado los O-glicanos se forman por la unión de un residuo N-acetil galactosamina (GalNAc) al hidroxilo (OH) de serina [Ser (S)] o treonina [Thr (T)] (Van den Steen, 1998; Varki, 1999).

Todos los oligosacáridos con uniones de tipo N presentan un solo tipo de estructura central o núcleo sacarídico que en inglés se le conoce como “core”. La elongación o ramificación de la parte sacarídica de la molécula siempre, se da a partir de este “core”. La elongación de la estructura sacarídica se debe a la adición subsecuente de residuos de monosacáridos por alguna de las enzimas glicosiltransferasas (GTs). Estas enzimas son específicas para cada carbohidrato y se expresan de manera diferencial en cada tejido (Freire, 2002). Las moléculas con glicosilación tipo O, presentan mayor complejidad estructural, ya que la elongación o ramificación parten de ocho tipos de estructura centrales o “cores” (Freire, 2002) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estructura de los 8 “core” presentes en los O-glicanos (Freire, 2002).

“core”	Carbohidrato (s) enlazados al antígeno Tn	Estructura	Glicosiltransferasa responsable
1	Gal	Galβ1,3GalNAc-O-Ser/Tre (Antígeno T)	β3Gal-T
2	GlcNAcβ1,6Gal	GlcNAcβ1,6Galβ1,3GalNAc-O-Ser/Tre	β6GlcNAc-T
3	GlcNAc	GlcNAc β1,3GalNAc-O-Ser/Ter	β3GlcNAc-T
4	GlcNAcβ1,6GlcNAc	GlcNAc β1,6GlcNAcβ1,3GalNAc-O-Ser/Ter (Antígeno Tk)	β6GlcNAc-T
5	GalNAc	GalNAcα1,3GalNAc-O-Ser/Ter	α3GalNAc-T
6	GlcNAc	GlcNAc β1,6GalNAc-O-Ser/Ter	β6GlcNAc-T
7	GalNAc	GalNAcα1,6GalNAc-O-Ser/Ter	α6GalNAc-T
8	Gal	Galα1,3GalNAc-O-Ser/Ter	α3Gal-T

En los O-glicanos, la estructura inicial en la glicosilación de las proteínas está formada entre un residuo de N-Acetil Galactosamina (GalNAc) que está unida a una serina [Ser (S)] o una treonina [Thr (T)] de la proteína. Esta estructura GalNAcα-Ser/Thr se conoce como antígeno Tn (figura 4). La estructura Tn es el sustrato para las siguientes enzimas GTs, que en este caso es la galactosiltransferasa-Tn (Gal-Tn), enzima que adiciona específicamente residuos de galactosas (Gal) al antígeno Tn. La unión subsecuente de una Gal

al antígeno Tn, genera el disacárido Gal β 1,3GalNAc o antígeno T (Thomsen-Friedenreich) que corresponde al “core” 1 (Freire, 2002). La expresión de las enzimas GTs está regulada y depende de los estímulos del microambiente, de la estirpe celular, de la fase del ciclo celular y del grado de diferenciación de las células. Por lo tanto, las estructuras O-glicosiladas varían según el tipo celular y el tejido (Chandrasekaran, 2006).

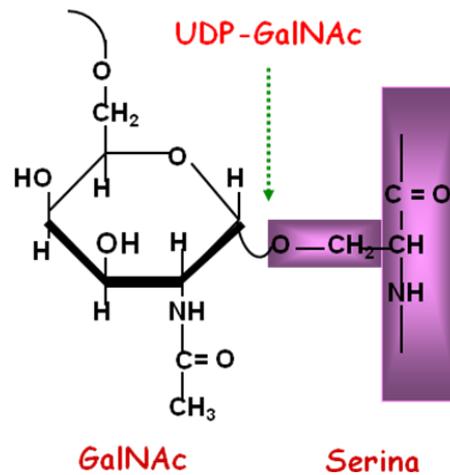


Figura 4. Estructura química del antígeno Tn

En los antígenos tumorales es común encontrar 4 de los 8 tipos de “cores” de los O-glicanos. A partir del antígeno T (“core” 1) se generan diversos antígenos tumorales derivados de los grupos sanguíneos como el antígeno Lewis X (GlcNAc β 1-6-Gal β 1-3GalNAc-O-Ser/Thr) y junto con sus variantes con mucosa o ácido siálico (Singhal, 1990) (figura 5).

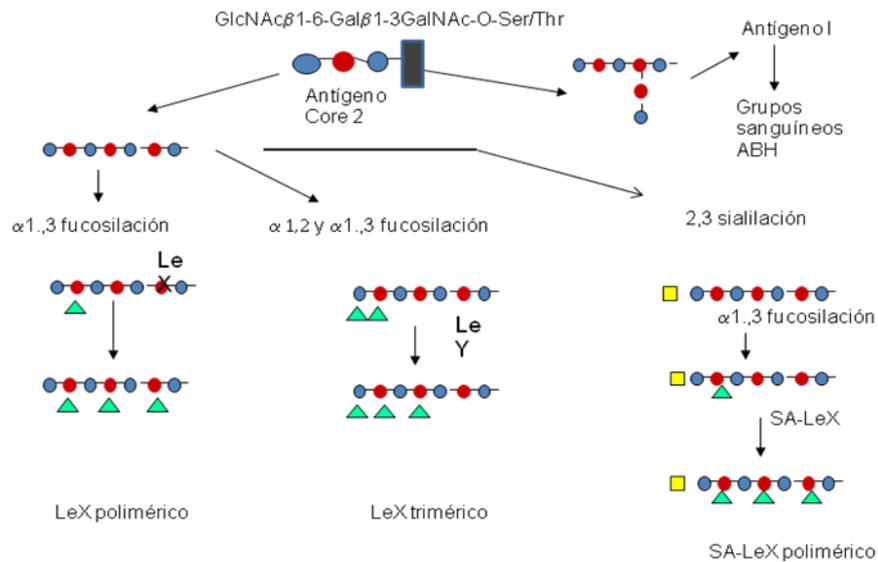


Figura 5. Síntesis de algunas variantes de antígeno Lewis asociados a neoplasias (Singhal, 1990)

El mejor representante de los O-glicanos son las mucinas. Estas son glicoproteínas abundantes en el moco que recubre los epitelios. Las mucinas son moléculas complejas de alto peso molecular las cuales presentan múltiples sitios de O-glicosilación y simultáneamente algunos sitios de N-glicosilación. Entre el 50 al 90% del peso total de las mucinas son carbohidrato. La región O-glicosilada interviene en la función biológica de la molécula y la región N-glicosilada participa en la estabilidad y plegamiento de la glicoproteína (Parry, 2006). Las mucinas se expresan en la parte apical de células del epitelio respiratorio, gastrointestinal y tracto reproductivo, cuya función es protegerlos de patógenos y de toxinas ambientales (Hilkens, 1992; Gendler, 2001; Liu, 2002; Callaghan, 2006). La biosíntesis de las mucinas es compleja y con frecuencia presentan alteraciones durante la carcinogénesis (Reis, 1998; Gendler, 2001; Stepensky, 2006). Las alteraciones más comunes de las mucinas en las células neoplásicas radican en el tipo o el grado de glicosilación. Estas alteraciones estructurales afectan las características antigénicas de la molécula (Mouritsen, 1994).

4. ANTECEDENTES

Existen aproximadamente 20 genes MUC que codifican para la parte proteica de las mucinas. La expresión de cada gen es específica para el órgano, tejido y tipo celular. Algunos de ellos se han caracterizado completamente, como MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC11 y MUC12 (Gendler, 1995). Todas las mucinas tiene una estructura sacarídica común compuesta por tres regiones: a) una estructura central o “core” que es la región donde se encuentran los carbohidratos más cercanos al sitio de unión con la cadena peptídica, b) una región llamada “esqueleto”, que determina la longitud de la cadena sacarídica y la cual puede presentarse con 2 tipos de estructuras: el esqueleto tipo 1, con un disacáridos enlace $\beta 1,3$ (Gal $\beta 1,3$ GlcNAc) o el esqueleto tipo 2 con un enlace $\beta 1,4$ (Gal $\beta 1,4$ GlcNAc), cabe resaltar que la única diferencia entre estas dos estructuras es el tipo de enlace que forman entre el residuo Gal y la GlcNAc y finalmente c) la región periférica, donde habitualmente se encuentran los antígenos derivados de los grupo sanguíneos (Lewis A, Lewis X, Sialil Lewis A sialil Lewis X y Disialil Lewis A), es común encontrar que estas regiones sacarídicas terminan con los siguientes monosacáridos (Osinaga, 2007):

- Galactosa
- N-acetilgalactosamina
- Fucosa
- Ácido siálico

4.1 MUC1 y cáncer

Entre las mucinas que tienen mayor asociación con el cáncer pulmonar está la mucina tipo 1 o MUC1. Esta mucina está codificada en el cromosoma 1q21 y se le conoce también como Episialin, PEM, EMA, CD227 o antígeno CA15-3. En epitelios normales MUC1 se expresa el borde apical las células del epitelio. Al igual que la mayoría de las mucinas, tiene la función de hidratar, lubricar y proteger las células epiteliales del lado luminal de los tractos respiratorio,

reproductor y gastrointestinal, su presencia en mucosas evita la adhesión de microorganismos (McGuckin, 2007).

MUC1 es una glicoproteína transmembranal de tipo 1, con una región o dominio extracelular muy grande en comparación con la mayoría de las glicoproteínas de membrana. Consta de 1000 a 2200 aminoácidos organizados en múltiples regiones en tándem de 20 aminoácidos (VNTR). Estas regiones contienen residuos de serinas y treoninas, los principales sitios de O-glicosilación de la molécula, por lo tanto, la mayor parte de las estructuras sacarídicas se concentran en esa región (Merlo, 1989; Muller, 1999; Croce, 2003) (figura 6). El dominio citoplásmico de MUC1 en las células puede interactuar con varias moléculas involucradas con la señalización que participan en el crecimiento celular (Jonckheere, 2010; Bafna, 2010).

MUC1 también se expresa en algunas células hematopoyéticas como los linfocitos T (Agrawal, 2005). En este caso MUC1 tiene un papel relacionado con la homeostasis, porque participa en la activación de las células T, pero también con la regulación de otras moléculas tales como cateninas, integrinas o cadherinas (McDermott, 2001; Agrawal, 2005).

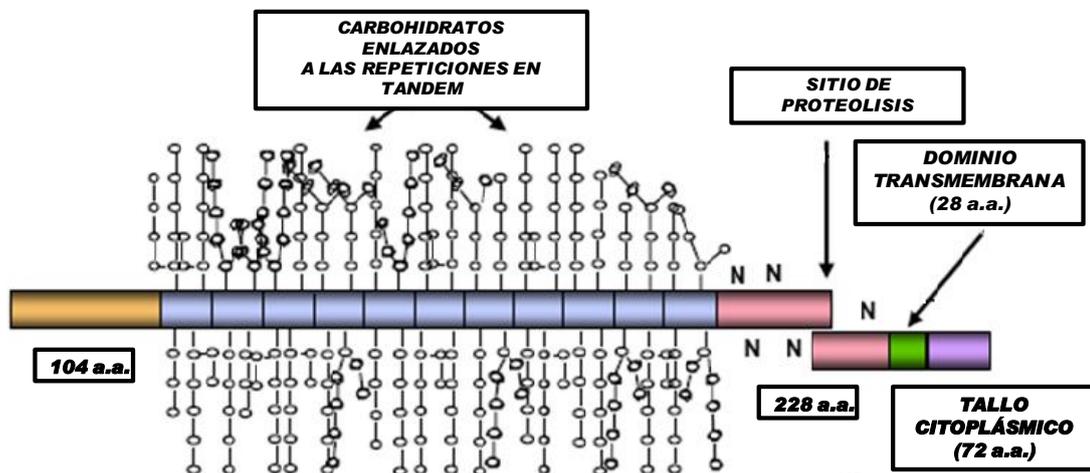


Figura 6. Estructura de MUC1.

MUC1 tiene 2 isoformas transmembranales generadas por empalme (splicing) alternativo del mRNA designadas como MUC1/Y y como MUC1/X (figura 7). La isoforma MUC1/X tan pronto como es sintetizada sufre autoproteólisis entre

una glicina (G) y una serina (S) presente en la secuencia glicina-serina-valina-valina-valina (GSVVV). Esta secuencia se encuentra dentro en una región con dominio conservado de 110 aminoácidos conocido como módulo SEA (urchin sperm protein). El sitio de corte genera dos subunidades α y β (Levitin, 2005). La subunidad α es secretada y se puede detectar en el suero de los pacientes con cáncer de mama de estadio II y la subunidad β se queda unida a la membrana de la célula (Hayes, 1986).

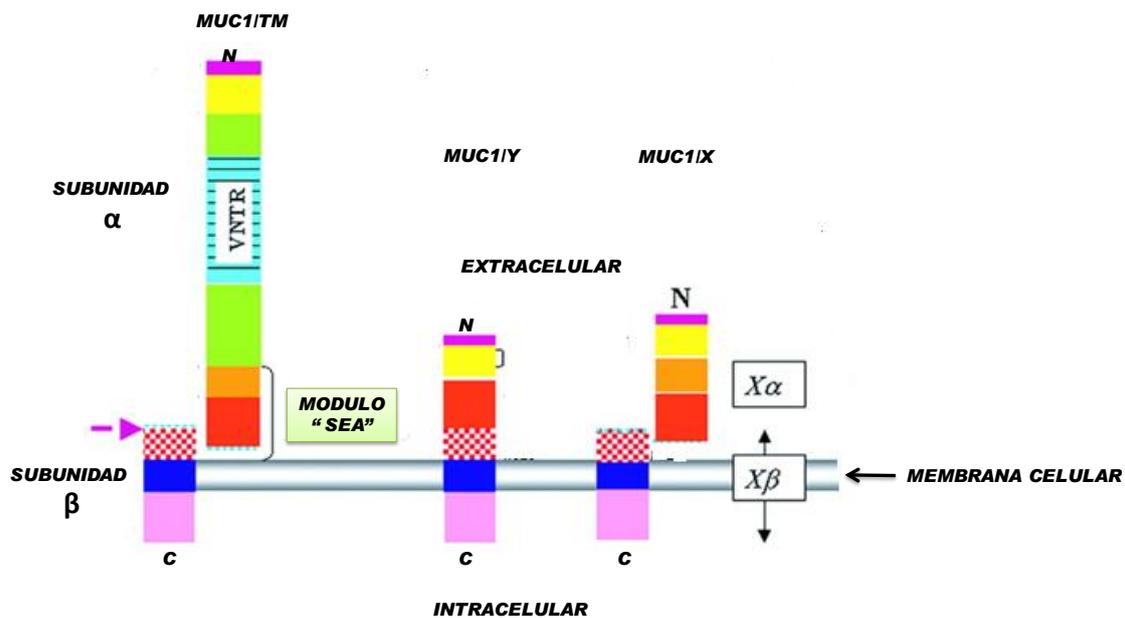


Figura 7. Isoformas de la proteína MUC1 (MUC1/X y MUC1/Y) (modificado de Levitin, 2005).

Para cumplir con su función biológica de protección en las células epiteliales normales, la parte sacarídica de MUC1 se encuentra muy ramificada, causando complejidad estructural a la molécula. En las células tumorales se modifica el grado de glicosilación y el patrón de distribución celular, por lo que MUC1 puede presentarse con diferentes grados de glicosilación desde una forma no glicosilada hasta una de baja complejidad sacarídica es decir hipoglicosilada o bien una forma con una complejidad mayor es decir hiperglicosilada. Estas variaciones dependen del tejido que está transformándose hacia la neoplasia, además la distribución celular deja de ser apical, característica de las células epiteliales normales, para tener una distribución uniforme alrededor de la célula neoplásica e inclusive en el citoplasma (Ho, 1991; Copin, 2000; Leroy, 2006).

4.2 Respuesta inmunológica a O- glicanos asociados a tumor

Los adenocarcinomas se derivan de células epiteliales incluyendo a las células del epitelio glandular endocrino que son productoras de mucinas por lo tanto se presentan modificaciones estructurales. Estas modificaciones en la MUC1 son consecuencia de la falta de activación de algunas enzimas glicosiltransferasas que participan en la glicosilación pero también de la sobreexpresión de las mismas (Clausen, 1996; Freire, 2003). Esto puede interrumpir, sobreexpresar o modificar algunas estructuras sacarídicas (Taylor-Papadimitriou, 2002; Hollingsworth, 2004). Por ejemplo, en la biosíntesis de MUC1 se puede expresar de manera anormal una sialiltransferasa que al añadir residuos de ácido siálico a la cadena sacarídica, funciona como una señal de alto de la biosíntesis dando lugar a sialomucinas, o bien se puede interrumpir la biosíntesis en las primeras etapas por falta de expresión de estas enzimas, esto da como resultado mucinas pobremente glicosiladas (Ugorski, 2002). En esta situación quedan expuestos los antígenos sacarídicos Tn y T. (Reis, 1998; Gendler, 2001). Las alteraciones cuantitativas y cualitativas de la MUC1, así como el cambio de distribución en las células neoplásicas, influyen en el comportamiento del tumor (Yamashita, 1995; Hollingsworth, 2004) y en las características antigénicas (Laidler, 1997; Couldrey, 2000).

Los determinantes antigénicos más importantes en los tumores son de naturaleza sacarídica por lo que son llamados “antígenos sacarídicos asociados a tumor o TAAS por sus siglas en inglés, por lo tanto la inmunogenicidad de los adenocarcinomas dependen del grado de glicosilación que tienen las moléculas (Lisowska, 2002). En el caso de MUC1, el aumento de la inmunogenicidad se debe a la presencia de cadenas sacarídicas cortas como GalNAc-Ser/Thr (antígeno Tn) como consecuencia de la interrupción de la glicosilación. Esto incrementa la respuesta citotóxica de poblaciones de linfocitos T (Bohnenkamp, 2004; Mitchell, 2007).

La consecuencia biológica es que MUC1 cuando tiene cadenas sacarídicas simples o cortas por una interrupción de la glicosilación son más antigénicas que cuando se encuentra en la forma altamente glicosilada. La MUC1 hiperglicosilada se asocia a la progresión del tumor por dos razones: primero

que las cadenas largas de carbohidratos en la molécula evita el reconocimiento inmunológico de la célula neoplásica y porque al ser MUC1 una molécula constitutiva de tejidos epiteliales normales existe tolerancia. En ambos casos la respuesta antitumoral es menor, en cambio al sufrir la modificación estructural por la interrupción de la glicosilación aumenta el reconocimiento inmunológico y por consecuencia la activación de mecanismos antitumorales efectores (Ho, 1991; Reis, 1998; Stepensky, 2006).

La presencia de poblaciones de leucocitos que infiltran el tumor como los linfocitos T citotóxicos (CD8+), linfocitos T cooperadores (CD4+), células NK (CD2+, CD16+ CD56+), macrófagos (CD14+, CD16+), células dendríticas (CD123+CD11c-) y granulocitos (CD11b+CD18+) indican que hay una respuesta inmune celular en contra del tumor. (Okada, 1995; McNerlan, 1998; Tsuta, 2005; Characiejus, 2008).

La citotoxicidad de los linfocitos T CD8+ es uno de los mecanismos antitumorales más eficientes. En la correcta activación de este tipo de células se ha demostrado que si los péptidos que se presentan en el MHC están glicosilados, se activa de manera más eficiente esta respuesta (Hanish, 2006; Ninkovic, 2009). Por otro lado, la glicosilación en los péptidos antigénicos se protegen de la degradación enzimática durante su procesamiento (Vlad, 2002).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para entender si las características estructurales que presentan los antígenos tumorales están implicados en la activación de la respuesta inmune efectora contra el tumor, es importante evaluar como ocurre este tipo de asociación en el microambiente del tumor. La asociación entre estructuras antigénicas en los tumores y el fenotipo de las poblaciones celulares infiltrantes podría sugerir que esta asociación puede servir como un parámetro útil para predecir la evolución de los pacientes.

6. HIPÓTESIS

El epítoto Tn de la molécula MUC1 en tumores de pacientes con adenocarcinoma pulmonar correlaciona con el fenotipo efector de las células citotóxicas infiltrantes.

7. OBJETIVO GENERAL

Identificar si el epítoto Tn de la molécula MUC1 en tumores de pacientes con adenocarcinoma pulmonar está asociado con el fenotipo efector de las células citotóxicas infiltrantes del tumor primario y de los tejidos con metástasis.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar la presencia de los antígenos sacarídicos Tn, sialil Tn y T asociados a MUC1 en cortes de tumor primario y de tejidos con metástasis provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.
2. Identificar los fenotipos efectores de las poblaciones infiltrantes del tumor primario y de tejidos con metástasis provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Muestras biológicas

Se obtuvieron del Departamento de Patología, muestras de 6 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar en estadio 4 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), los cuales habían fallecido en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" (INER). Todos

los casos analizados tuvieron metástasis hacia intestino, pleura, corazón, suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo; estos tejidos también fueron incluidos en el estudio. Como control de las pruebas se incluyeron muestras histológicas obtenidas del Servicio Médico Forense que correspondieron a individuos sin datos patológicos aparentes fallecidos en accidentes automovilísticos.

Todos los pacientes con adenocarcinoma pulmonar incluidos en el estudio tenían antecedentes de tabaquismo y el rango de edades fue de 52-80 años (cuadro 3).

Cuadro 3. Datos clínicos de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.*

SEXO	CLASIFICACION HISTOLOGICA PREDOMINANTE DEL ADENOCARCINOMA	EDAD	TABAQUISMO	OTROS FACTORES DE RIESGO	SOBREVIDA DESPUÉS DEL INGRESO AL INER	METÁSTASIS
F	Adenocarcinoma papilar bien diferenciado	56	+	leña	2 meses	Intestino, corazón, pleura, suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo
M	Adenocarcinoma papilar bien diferenciado	57	+	-	3 años 2 meses	Intestino, corazón, pleura, suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo
M	Adenocarcinoma papilar bien diferenciado	80	+	hierro	9 meses	Intestino, corazón, pleura, suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo
M	Adenocarcinoma de células grandes poco diferenciado	52	+	aluminio	9 meses	Intestino, corazón, pleura, suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo
F	Adenocarcinoma bronquioalveolar mucinoso	77	+	leña	3 meses	Intestino, corazón, pleura, suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo
M	Adenocarcinoma de células claras	57	+	-	3 años	Intestino, corazón, pleura, suprarrenal, riñón, hígado, diafragma, encéfalo

*Información tomada de los expedientes clínicos del Departamento de Archivo Clínico del INER y de los expedientes del Departamento de Patología del INER.

9.2 Criterios de inclusión

Muestras de tejidos del tumor primario y de las metástasis de individuos que fallecieron en INER con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar en estadio IV de acuerdo a la clasificación TNM con expediente clínico y expediente completo del Departamento de Patología.

9.3 Principio de la inmunohistoquímica

Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionamiento 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 (Taylor, 1993).

9.4 Procesamiento de los tejidos

Se utilizaron tejidos incluidos en parafina obtenidos del Departamento de Patología del INER según los criterios de inclusión. Posteriormente se realizaron cortes seriados de 3µm de espesor, los cuales fueron colocados en los portaobjetos tratados con aminosilano (anexo 2), para proceder con el desparafinado. La preparación de los portaobjetos fue de la siguiente manera: primero se trataron con una solución de aminosilano al 3% en acetona, sumergiéndolos durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se sacaron y se dejaron escurrir. Finalmente se lavaron por un minuto con agua desionizada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Este procedimiento se realizó para evitar que se desprendieran los cortes de los tejidos durante el procesamiento.

9.5 Desparafinado y rehidratado de tejidos

Se utilizaron cortes seriados de los tejidos de 3µm de espesor, los cuales se desparafinaron, incubándolos a 50°C durante 30 minutos, para posteriormente sumergirlos en xilol por 5 minutos, haciendo 2 cambios. Seguidamente se rehidrataron gradualmente con cambios de soluciones acuosas de etanol en el siguiente orden:

Solución	Tiempo
1. Etanol absoluto anhidro	30 segundos

2. Etanol absoluto anhidro	30 segundos
3. Etanol 96%	30 segundos
4. Etanol 96%	30 segundos
5. Etanol 80%	30 segundos
6. Etanol 70%	30 segundos
7. Etanol 60%	30 segundos
8. Etanol 50%	30 segundos
9. Agua destilada	5 Minutos

9.6 Recuperación antigénica

Para el correcto reconocimiento de los anticuerpos con los tejidos que estaban fijados y embebidos en parafina se realizó la recuperación antigénica utilizando las soluciones comerciales InmunoDNA Retriever EDTA (Dakko) y Diva Decloaker (Biocare Medical) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (cuadro 4). Los cortes ya desparafinados y rehidratados, se colocaron en un vaso de Coplin de plástico con 50mL de la solución de recuperación antigénica. Se tapó herméticamente el vaso de Coplin y se colocó en baño María a temperatura de ebullición (90°C) durante 30 minutos.

Para evitar que se desprendiera el tejido, se dejó enfriar el vaso de Coplin con las muestras antes de abrirlo, durante 20 minutos a temperatura ambiente, se decantó la solución y se lavó en dos tiempos con agua destilada.

9.7 Histoquímica con anticuerpos

Después de la recuperación antigénica los cortes de pulmón y de los tejidos con metástasis se colocaron en una cámara húmeda para procesarlos con la técnica de inmunohistoquímica. Se neutralizó la actividad de la peroxidasa endógena de las células cubriendo el tejido con 100 μ L de la solución comercial para inhibir la peroxidasa (Peroxidazed 1, Biocare Medical) por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los tejidos se lavaron suavemente, con la ayuda de una pizeta, con una solución TBS-Tween (anexo 2) durante 10 segundos. Los sitios de enlace inespecífico del tejido se bloquearon con la solución comercial Background Eraser, Biocare Medical (anexo 1) cubriendo el

tejido con 100 μ L durante 10 minutos a temperatura ambiente, después se eliminó el exceso del bloqueador y posteriormente se incubaron con 100 μ L del anticuerpo primario previamente titulado de acuerdo al cuadro 4, durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Tiempo transcurrido, los tejidos se lavaron y se cubrieron con 100 μ L de un anticuerpo secundario universal (Labelled Polymer-HRP anti-mouse) (anexo 1) durante 1 hora a 37°C y seguido de un lavado. Después, la reacción se visualizó con la solución reveladora comercial Chromogen System (Biocare Medical) (anexo 2): la incubación de los tejidos fue de 1-3 minutos a temperatura ambiente monitoreando para evitar que el reactivo dañe el tejido y se detuvo la reacción únicamente lavándolo con la solución TBS-Tween. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina de Harris (para definir las células) durante 30 segundos a temperatura ambiente, se lavaron con agua de la llave y finalmente se sumergieron en solución saturada de carbonato de litio para virar el color y resaltar los núcleos a una tonalidad de azul más intenso. Por último se cubrieron con 50 μ L del medio de montaje comercial EcoMount (Biocare Medical) para su conservación y análisis al microscopio.

Cuadro 4. Características de los anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo	Origen	Isotipo	Marca	Especificidad	Distribución de la tinción	*Concentración	Recuperador de antígeno
CD8	ratón	IgG1k	DakoCytomation	Linfocitos T citotóxicos	Membrana celular	1:50	InmunoDNA Retriever EDTA
CD4	ratón	IgG1k	Chemicon	Linfocitos T helper	Membrana celular	Uso directo (prediluido por el fabricante)	InmunoDNA Retriever EDTA
CD69	ratón	IgG1	Abcam	Linfocitos T activados (activación temprana)	Membrana celular	1:25	InmunoDNA Retriever EDTA
CD25	ratón	IgG1k	Abcam	Linfocitos T activados (activación tardía)	Membrana celular	1:20	Diva Decloaker
FOXP3	ratón	IgG3k	Abcam	Linfocitos T reguladores	Núcleo	1:25	InmunoDNA Retriever EDTA
MUC1	ratón	IgG1k	Abcam	Antígeno DF3	Normal: borde apical de la membrana celular. Cáncer: membrana celular y citoplasma	1:50	Diva Decloaker
Tn	ratón	IgM k	Gene Tex	Antígeno Tn	Membrana celular y citoplasma	1:50	Diva Decloaker
Sialil Tn	ratón	IgG1	Abcam	Antígeno Sialil	Membrana	1:50	

				Tn	celular y citoplasma		Diva Decloaker
T	ratón	IgG	AbCam	Antígeno T	Membrana celular y citoplasma	1:100	Diva Decloaker

Se utilizó como control positivo de la técnica, el anticuerpo de Vimentina de la marca Dako. Los anticuerpos se diluyeron en TBS. **El anticuerpo está prediluido y listo para usar. Información tomada de los insertos de los productos de las casas comerciales.

9.8 Histoquímica con lectinas

Otro grupo de cortes histológicos ya desparafinados, rehidratados y con la recuperación antigénica, se colocaron en una cámara húmeda para procesarlos para histoquímica utilizando lectinas acopladas a biotina. Todas las lectinas se utilizaron a una concentración de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (cuadro 5). Antes de la aplicación de las lectinas en los tejidos, se hizo un bloqueo para los sitios de enlace inespecífico de la lectina con el tejido utilizando en esta ocasión una solución de albúmina libre de inmunoglobulina (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Para valorar el reconocimiento específico de las lectinas con los tejidos se hicieron ensayos de competencia con los azúcares específicos, utilizando una solución 0.2 mM de ácido N-Acetil neuroamínico (Neu5AC) marca EY Labs para las lectinas que reconocen al ácido siálico (Sigma), con una solución 0.2mM de GalNAc (Sigma) para las lectinas ALL, PNA, JAC (cuadro 5).

El revelado de la reacción de las lectinas biotiniladas en los tejidos se realizó utilizando ExtrAvidin-Peroxidasa (Sigma-Aldrich) a dilución 1:1000, durante 30 minutos a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Al término del tiempo se lavó con una solución TBS.

La visualización de la reacción se realizó con la solución reveladora Chromogen System (Biocare Medical) (anexo 2) incubando los tejidos de la misma manera que con los anticuerpos a temperatura ambiente durante 10 segundos. Los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina de Harris 5 min y posteriormente se procedió a montarlos con resina, para hacer las valoraciones microscópicas.

Cuadro 5. Características de las lectinas utilizadas.

		Especificidad	*concentración
--	--	---------------	----------------

Lectina	Marca		
<i>Amaranthus leucocarpus</i> o lectina de amaranto (ALL)	Donado por Dr. E.Zenteno. Fac. Medicina, UNAM	Antígeno T (Galβ1,3GalNAc-O-Ser)	1:100
<i>Arachis hypogea</i> o lectina de cacahuete (PNA)	Eylabs	Antígeno T (Galβ1,3GalNAc-O-Ser)	1:100
<i>Artocarpus integrifolia</i> o lectina de Jacalina (JAC)	Calbiochem	Antígeno T αGal(Galβ1,3GalNAc-O-Ser)	1:100

*Las lectinas se diluyeron en TBS-calcio. La dilución utilizada corresponde a 50 µL/mL. Los carbohidratos en negritas son los reconocidos por las lectinas. Información tomada de los insertos de los productos de las casas comerciales.

9.9 Evaluación microscópica

La cuantificación de las marcas se realizó en 10 campos al azar en la zona del tumor y el infiltrado se evaluó en la zona circundante al tumor. La cuantificación se realizó dos veces por diferentes observadores y se descartó el tejido necrótico. Se cuantificó el número de células por mm² (cuadro 6). El número de campos equivalentes a 1 mm² de tejido, se calculó midiendo el diámetro del campo con un micrómetro objetivo marca Zeiss. Para el objetivo 40X en el que basamos nuestras evaluaciones, el área se calculó (aplicando la fórmula del área del círculo) para cada campo de observación y fue de 96211.5 µm². Finalmente se dividió 1x10⁶ µm² (equivalentes a 1mm²) entre el área del campo calculada y se determinó que 10 campos ópticos corresponden a 1mm² en el microscopio Zeiss óptico modelo 1251CS con un ocular 10X.

Cuadro 6. Cálculo del número de campos a evaluar para obtener un equivalente de 1 mm² de tejido.

Objetivo 40X Ocular 10X
Área = πr^2 donde,
$\pi = 3.1416$
r = radio
Sustituyendo:
Área = $(3.1416)(350 \mu\text{m})^2 = 96211.5 \mu\text{m}^2$
$1 \times 10^6 \mu\text{m}^2 / 96211.5 \mu\text{m}^2 = 10$ campos

9.10 Digitalización y análisis de imágenes

Las imágenes del microscopio Karl Zeiss Modelo 1251CS se digitalizaron con la cámara Sony Cyber-Shot DSC-W100 con una resolución de 12.1 megapíxeles. El análisis de las imágenes se realizó con el programa para análisis de imágenes ImageJ (Imagen Processing and análisis in Java, versión 1.43) en una computadora Macintosh.

Además, para los antígenos tumorales se evaluó la distribución de la tinción, con el objetivo de 40x, en base a la localización de la tinción en: (MA) la zona apical de las células, (MU) en la periferia de célula de manera uniforme y (C) en el citoplasma. También se evaluó la intensidad de la tinción en cada célula como: (1) leve, (2) moderada y (3) intensa.

9.11 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de chi cuadrada para cuantificar la probabilidad de que nuestra asociación o diferencia de variables se deba al error de muestreo y el cálculo de la correlación de variables con la prueba de Pearson y por regresión lineal simple, debido a que en nuestro estudio tenemos variables aleatorias.

10. RESULTADOS

Se realizó una pre-selección de los expedientes del Departamento de Patología del INER de los casos de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar en estadios clínico IV, que presentaron metástasis en varios tejidos antes de fallecer. Se hizo una selección más minuciosa de los casos en donde el tumor expresó la forma hipoglicosilada de MUC1 con la ayuda del anticuerpo monoclonal contra MUC1 de la clona DF3 obtenido de la casa comercial Abcam (Cambridge, UK). En estos casos se verificó el infiltrado celular inflamatorio mediante los cortes de los tumores primarios así como en los tejidos con metastásis teñidos con hematoxilina (cuadro 3).

Uno de los problemas mayores con los adenocarcinomas de pulmón es la frecuente heterogeneidad histológica. De hecho, es más común la mezcla de

subtipos histológicos de adenocarcinoma que los tumores que consisten puramente en un solo patrón de acinar, papilar, bronquioloalveolar y el adenocarcinoma sólido con formación mucinosa (Travis, 2004). Por lo tanto, es posible encontrarse cualquiera de los subtipos histológicos en el mismo tumor de acuerdo a la clasificación de la OMS.

Efectivamente, en la descripción histológica de las muestras obtenidas del tumor primario de pulmón se identificó esta heterogeneidad histológica. En nuestros casos encontramos que 3 de ellos tuvieron un predominio del subtipo histológico papilar bien diferenciado, en un solo caso se observó el predominio de subtipo histológico de células grandes poco diferenciado, en otro caso el subtipo histológico bronquioloalveolar mucinoso y finalmente un hallazgo poco común fue que un caso presentó el subtipo histológico de células claras (cuadro 3).

En los cortes procesados por la técnica de inmunohistoquímica y tratados con los anticuerpos monoclonales, después de analizar y cuantificar en cada corte, el número de células tumorales y el número de linfocitos por mm^2 (utilizando los criterios de evaluación y a la metodología descrita en la sección de materiales y métodos) encontramos los siguientes resultados.

En los tejidos con el tumor primario y con las metástasis, las proporciones de las células infiltrantes fueron diferentes para cada tejido (tabla 1). Se puede notar que existen 4 tendencias en la relación entre las células neoplásicas con las células infiltrantes. En encéfalo e hígado había en promedio 15 células tumorales por cada célula infiltrante, en pulmón la relación es de 5 a 1, en la glándula suprarrenal, pleura y riñón había en promedio 2 células tumorales por cada célula infiltrante. Finalmente en intestino y corazón la relación fue inversa había en promedio 2 células infiltrantes por cada célula tumoral.

Debido a que la desviación estándar en los datos era menor de 25 con un rango de 0.5-25 y para facilitar el análisis de datos de los resultados se decidió utilizar los promedios de los casos para cada tipo de tejido.

Tabla 1. Relación de las células infiltrantes de tumor con respecto a las células tumorales.

TEJIDO	CÉLULAS TUMORALES	CÉLULAS INFILTRANTES	RELACIÓN
Hígado	2516	128	16.6 : 1
Encéfalo	955	65	14.6 : 1
Pleura	1234	219	5.6 : 1
Glan. Suprarrenal	1168	531	2.1: 1
Riñón	517	209	2.4 : 1
Diafragma	627	533	1.17 : 1
Pulmón	1235	847	1.4 : 1
Corazón	372	634	0.58 : 1
Intestino	1085	2179	0.49 : 1

Se evaluó el número de células por 1 mm² el número total de células neoplásicas y el número de células inflamatorias infiltradas en cada tejido.

En la tabla 2 se muestran las subpoblaciones celulares CD4, CD8 y CD57 presentes en la periferia del tumor. El mayor porcentaje de linfocitos CD4+ se observó en las metástasis renales (19.66%) seguido de las metástasis en diafragma, con un porcentaje de 17.69%. Al igual que en el caso del porcentaje de linfocitos CD4+, el mayor porcentaje de linfocitos CD8+ se observó en la metástasis renal (26.72%), por otra parte las metástasis en pleura, glándula suprarrenal, diafragma y pulmón, el porcentaje de esta población linfocitaria fue muy parecida (17.48%, 15%, 15.98% y 13.45% respectivamente). Los linfocitos CD57+ se observaron con mayor abundancia en los tejidos con metástasis de pleura (18.14%), encéfalo (16.7%) y diafragma (13.08%). En general, los porcentajes promedio entre las poblaciones CD4+, CD8+ y CD57+ fueron muy parecidos: 10.2%, 11.62% y 8.4% respectivamente (tabla 2, figura 8).

Tabla 2. Porcentaje de linfocitos con expresión de células CD4+, CD8+ y CD57+ en adenocarcinoma pulmonar y metástasis presentes en 1mm².

TEJIDO	% DE LINFOCITOS			% DE LINFOCITOS T	% DE OTRAS POBLACIONES
	CD4+	CD8+	CD57+		
Pulmón	4.43	13.45	9.51	27.39	72.61
Encéfalo	9.11	4.81	16.7	30.63	69.38
Glan. suprarrenal	12	15	3.37	30.37	69.63
Hígado	6.24	1.73	2.84	10.81	89.19
Pleura	10.87	17.48	18.14	46.49	53.51
Diafragma	17.69	15.98	13.08	46.75	53.25
Intestino	6.41	4.99	1.31	12.71	87.29
Riñón	19.66	26.72	7.21	59.59	40.41
Corazón	5.46	4.48	3.95	13.89	86.11
Promedio	10.2	11.62	8.4	30.95	69.04

El 6.82% de los linfocitos infiltrantes de tumor primario (pulmón) expresó la molécula de activación CD25 mientras que el 29.67% expresó la molécula de activación temprana CD69. En los tejidos con metástasis fue muy bajo el porcentaje de activación de los linfocitos, solo el 21.53% de los linfocitos en diafragma expresaron la molécula CD69 (tabla 3). En todos los tejidos se valoró por inmunohistoquímica y anticuerpos monoclonales, la presencia del Factor de transcripción FoxP3, resultando negativo para todos los casos. FoxP3 junto con CD25 se utilizan como marcadores de subpoblaciones celulares con función reguladora, por lo tanto los tejidos analizados no presentaron esta población.

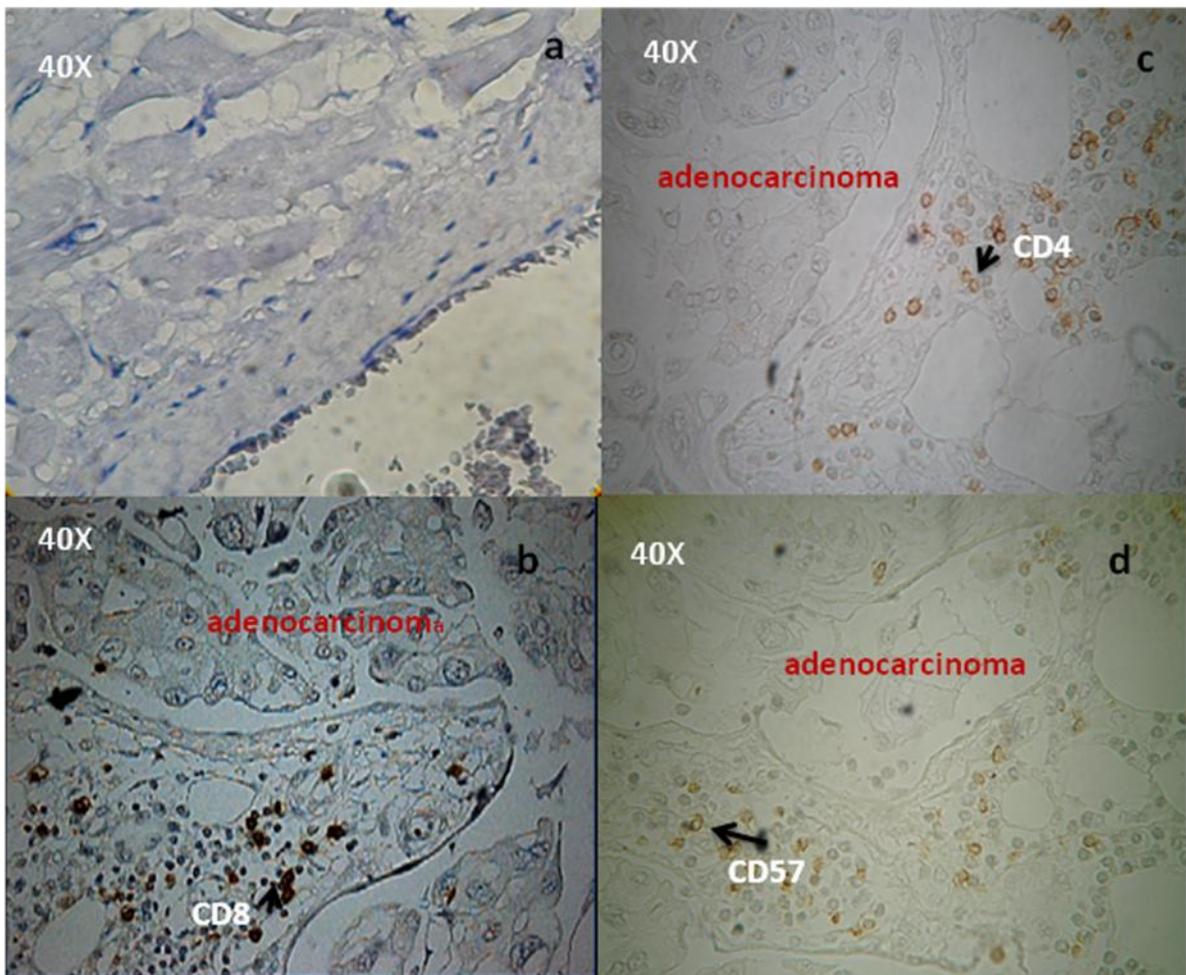


Figura 8. Metástasis del miocardio con infiltrado linfocitario. Microfotografía con aumento de 40X a) corte de miocardio normal teñido con hematoxilina de Harris. En b), c) y d) se observa la presencia de las de células neoplásicas con gran cantidad de citoplasma y núcleos pleomórficos. En la micrografía b) se encuentran teñidas en color marrón la poblaciones de linfocitos CD8+ infiltrantes en la zona del tumor. En c) y d) se identifican teñidos de color marrón las poblaciones CD4 y CD57. Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales. (Digitalización de las imágenes con la cámara Sony Cyber-Shot DSC-W100 con resolución de 12.1 mega pixeles).

Tabla 3. Porcentaje de linfocitos con expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69 en adenocarcinoma pulmonar y metástasis, por mm².

TEJIDO	% DE LINFOCITOS		% DE LINFOCITOS ACTIVADOS	% DE LINFOCITOS NO ACTIVADOS	No. DE LINFOCITOS POR mm ²
	CD25+	CD69+			
Pulmón	6.82	29.67	36.49	63.51	847
Encéfalo	1	4	5	95	65
suprarrenal	1.55	0.52	2.07	97.93	531
Hígado	1.12	1.96	3.08	96.92	128
Pleura	1.68	2.76	4.44	95.56	219
Diafragma	0	21.73	21.73	78.27	533
Intestino	0	0.34	0.34	99.66	2179
Riñón	1.12	1.49	2.61	97.39	209
Corazón	0	0.52	0.52	99.48	634
Promedio	1.47	6.99	8.47	91.52	593.88

Por medio de inmunohistoquímica se evaluó la expresión de antígenos sacarídicos asociados a tumor (TAAs sacarídicos) en los cortes de los tumores primarios y en los tejidos con metástasis. Se encontró en todos los tejidos, incubados con el anticuerpo monoclonal, la expresión de MUC1, excepto en el diafragma. Los tejidos con mayor porcentaje de células que expresaron MUC1 fueron corazón (100%), encéfalo (98.06%), riñón (97.32%) y glándula suprarrenal (94.6%). Se evaluó la distribución de las moléculas MUC1. En base a su localización de la tinción se designaron como: (MA) marca en la zona apical de las células, MU marca en la periferia de célula de manera uniforme y (C) marca en el citoplasma. En los tejidos se observó que la tinción con el anticuerpo contra MUC1 fue homogénea alrededor de toda la membrana, inclusive se observó la marca en el citoplasma de la mayoría de las células tumorales (figura 9). También se evaluó la intensidad de la coloración en las células tumorales. Para esta evaluación se definió de manera arbitraria 3 tipos de intensidad de tinción acuerdo a la percepción de los observadores y comparando entre las intensidades de tinción entre diversas muestras. Se concluyó nominar como tinción leve (1), moderada (2) y fuerte (3), esto fue un criterio que se utilizó para dar un valor cuantitativo para el análisis de los tejidos. También esto se puede interpretar como la densidad de expresión la molécula en este caso MUC1 es decir el número de copias que tiene la molécula en la célula.

Tabla 4. Expresión y distribución de los antígenos sacarídicos MUC1, Tn, sialil Tn y T en las células tumorales de los tejidos pulmonar y en los tejidos con metástasis.

TEJIDO	MUC1			ANTÍGENO Tn			ANTÍGENO T			ANTÍGENO STn			No. DE CÉLULAS TUMORALES POR mm ²
	%	DIST.	INT.	%	DIST.	I/D.	%	DIST.	I/D.	%	DIST.	I/D.	
Pulmón	70.8	MU/C	3	100	MU/C	3C	62	MU/C	3	-	-	-	1235
Encéfalo	98	MU/C	3	100	MU/C	2	4.6	MU/C	3	-	-	-	955
Suprarrenal	94.6	MU/C	1	86.43	MU/C	1	7.13	MU/C	3	-	-	-	1168
Hígado	51.2	MU/C	1	54.63	MU/C	2	0.21	MU/C	1	52.63	MU/C-	2-	2516
Pleura	37	MU/C	1	30.45	MU/C	3	12.3	MU/C	3	-	-	-	1234
Diafragma	-	-	-	1.42	MU/C	1	-	-	-	-	-	-	627
Intestino	78.5	MU/C	2	71.59	MU/C	2	-	MU/C	3	-	-	-	1085
Riñón	97.3	MU/C	1	99.04	MU/C	1	0.67	MU/C	3	-	-	-	517
Corazón	100	MU/C	1	100	MU/C	2	0.45	MU/C	1	-	-	-	372

Los datos fueron obtenidos del análisis de 1 mm² de tejidos, Se evaluó la distribución de la marca de acuerdo a distribución uniforme en la membrana plasmática (MU), distribución citoplásmica de la tinción (C) y la intensidad de la marca de acuerdo a leve (1), moderada (2) y fuerte (3).

En los tejidos analizados se observó que el 100% de las células tumorales de corazón expresaron MUC1 con una distribución uniforme en toda la membrana plasmática (MU) y en el citoplasma (C), pero con una intensidad leve. En los tejidos suprarrenal, encéfalo y renal, la mayoría de las células tumorales expresaron MUC1 con una intensidad de 3 y distribución MU y C. Cabe mencionar que las células de diafragma no expresaron MUC1, pero si el antígeno Tn débilmente. Con respecto a la expresión del antígeno Tn, también todos los tejidos neoplásicos lo expresaron siguiendo el mismo patrón de distribución e intensidad que MUC1. Para el antígeno T hubo una considerable disminución del porcentaje de las células que lo expresaron, pero las positivas en general no modificaron el patrón de distribución de la reactividad, ni el grado de intensidad. A diferencia de los antígenos mencionados, el antígeno sialil Tn sólo se expresó en la metástasis en hígado y sólo en el 52.63% de las células tumorales con distribución MU y C e intensidad de 2 (tabla 4).

En la tabla 5 se observa que por cada célula tumoral que expresó MUC1 se expresó el antígeno Tn en una célula tumoral, es decir, la relación fue de 1:1 para los tejidos encéfalo y riñón. Una relación de 1 a 0.9 en tejido suprarrenal, hígado e intestino aunque en diafragma no se expresó el antígeno Tn. Exceptuando los resultados de diafragma el coeficiente de correlación lineal de

Pearson que se obtuvo para los demás tejidos fue de $r = 0.95$, lo que indica que existe una gran correlación entre ambos antígenos (tabla 6).

En cambio en la tabla 5 también se observa que por cada célula tumoral del pulmón que expresaba MUC1 se expresó el antígeno T en las mismas células tumorales en una relación de 1:1, pero en los demás tejidos casi no se expresó el antígeno T. En esta asociación se calculó en general, es decir, sobre el promedio de todos los tejidos y se encontró una correlación de acuerdo al coeficiente de correlación lineal de Pearson una $r = 0.16$ (tabla 6).

Para identificar si esta asociación era producto al azar o no se calculó por medio del método de Chi cuadrada de Pearson, el valor de significancia de estos resultados teniendo que una p mayor de 0.1 lo que indica que la hipótesis nula se acepta, es decir “ en nuestro caso no hay asociación entre las variables (antígeno Tn y MUC1) (tabla 6).

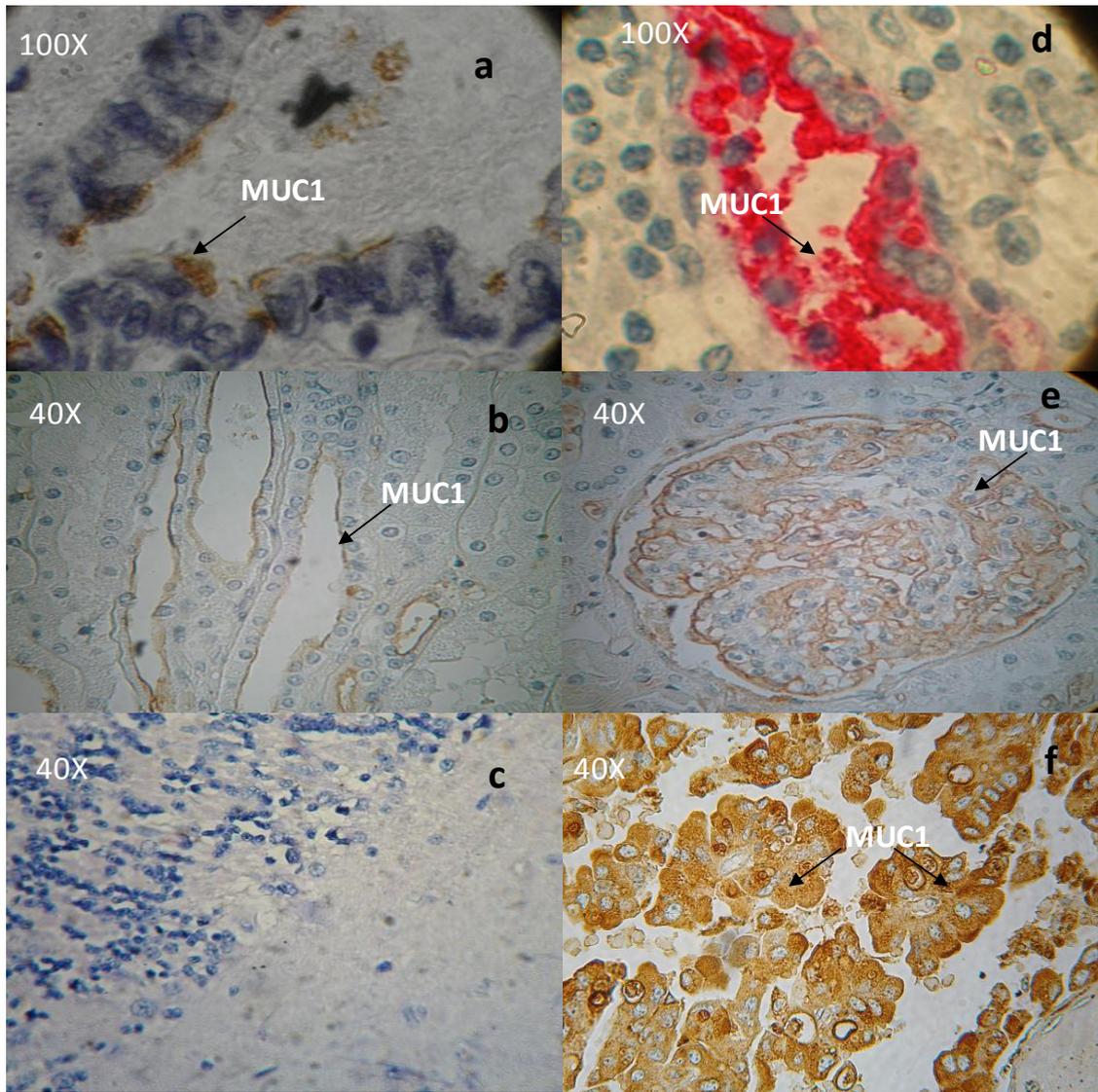


Figura 9. Inmunohistoquímica en tejido con adenocarcinoma pulmonar y de riñón y encéfalo metastásicos. En la microfotografía con aumento de 40X se observa a) control de epitelio bronquial sin neoplasia con distribución apical de MUC1 en color marrón (100X), b) túbulo renales sin neoplasia (40X) y c) encéfalo sin neoplasia (40X), negativo para MUC1. (d, e y f) corresponden a casos con adenocarcinoma. En d) se observa en rojo la distribución uniforme en membrana y citoplasma de MUC1 en las células tumorales con una intensidad fuerte. En e) se observa en marrón la distribución de MUC1 en la membrana de la célula tumoral, no hay tinción de citoplasma. En f) la imagen corresponde a neoplasia en donde todas las células tumorales expresan una tinción intensa de MUC1 distribuida de manera uniforme en toda la célula. (Digitalización de las imágenes con la cámara Sony Cyber-Shot DSC-W100 con resolución de 12.1 mega píxeles).

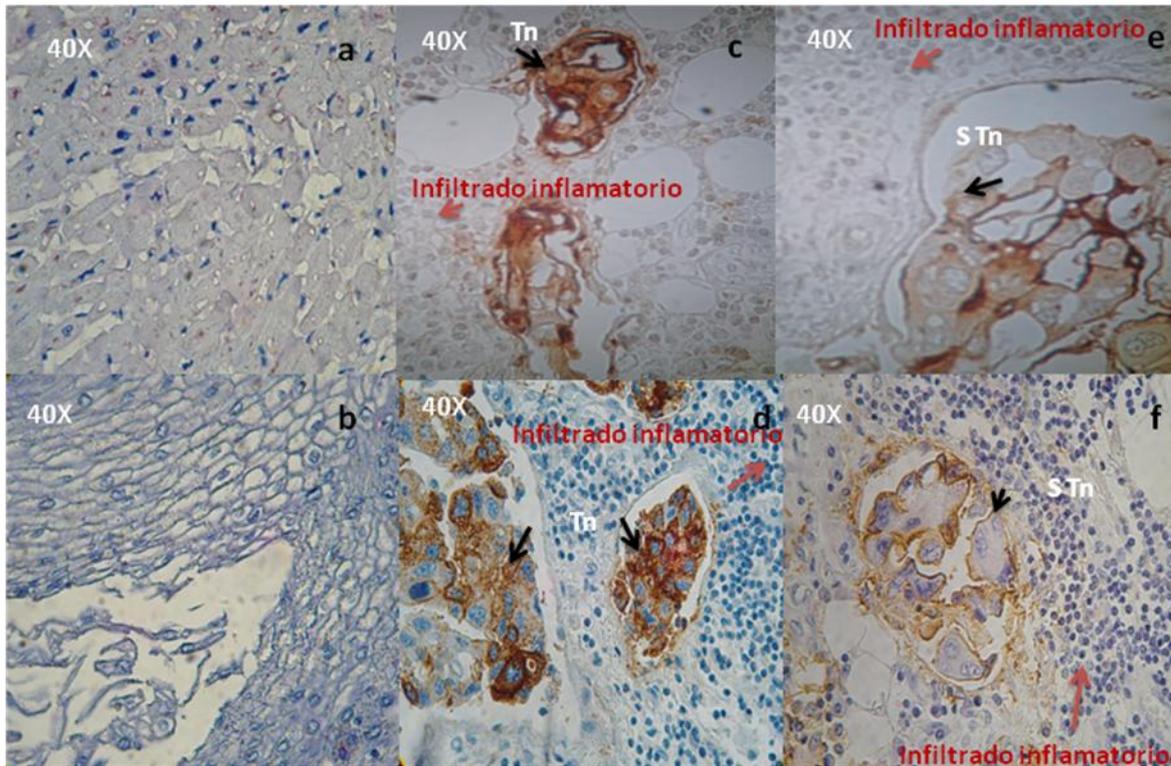


Figura 10. Expresión del antígeno Tn y Sialil Tn en tejidos metastásicos de corazón e intestino con abundante infiltrado inflamatorio en la periferia del tumor. La inmunohistoquímica de: a) el tejido cardiaco control sano y b) del tejido intestinal control sano, no hay infiltrado y no expresan ninguno de los antígenos sacarídicos asociados a tumor. Microfotografías c) y e) tejido cardiaco con metástasis, en café se aprecian las marcas para el antígeno Tn y el sialil Tn respectivamente. Microfotografías d) y f) muestra tejido intestinal con metástasis. Las marcas marrón corresponden al antígeno Tn (e) y sialil Tn (f). (Digitalización de las imágenes con la cámara Sony Cyber-Shot DSC-W100 con resolución de 12.1 mega pixeles. 40x).

Tabla 5. Relación de MUC1 con el antígeno Tn y MUC 1 con antígeno T.

TEJIDO	MUC1	Tn	RELACIÓN
Pulmón	70.82	100	0.7 : 1
Encéfalo	98.06	100	1:1
Suprarrenal	94.6	86.43	0.9 : 1
Hígado	51.17	54.63	0.9 : 1
Pleura	37.1	30.45	1 : 0.8
Diafragma	0	1.42	0
Intestino	78.52	71.59	1: 0.9
Riñón	97.32	99.04	1:1
Corazón	100	100	1:1
Promedio	69.73	68	1 : 1

TEJIDO	MUC1	T	RELACIÓN
Pulmón	70.82	62	1:0.9
Encéfalo	98.06	4.6	21:01
Suprarrenal	94.6	7.13	13:01
Hígado	51.17	0.206	255:01
Pleura	37.1	12.3	1 : 0.3
Diafragma	0	0	0
Intestino	78.52	0.11	709 :1
Riñón	97.32	0.67	161 : 01
Corazón	100	0.45	222 : 01
Promedio	69.7	9.7	7 : 1

Tabla 6. Valores de (p) en las pruebas de Chi cuadrado para conocer el valor de significancia y las asociaciones con el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los marcadores sacarídicos asociados a tumor MUC1, Tn, sialil Tn y T.

Tejido	Valores de p		
	MUC1/Tn	MUC1/T	MUC1/sTn
Corazón	0.06	0.21	0.03
Diafragma	0.07	0.38	0.05
Encéfalo	0.09	0.89	0.07
Hígado	0.10	0.28	0.12
Intestino	0.11	0.16	0.18
Pleura	0.12	0.09	0.28
Pulmón	0.13	.006	0.43
Riñón	0.14	0.04	0.69
Glan. suprarrenal	0.00	0.00	0.00

Antígenos	MUC1/Tn	MUC1/T	MUC1/sTn
Correlación (r)	0.95	0.16	0.53

Tabla 7. Valores de (p) en las pruebas de Chi cuadrado para conocer el valor de significancia y las asociaciones con el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los marcadores de poblaciones de linfocitos T CD4+, CD8+ y CD57+ con respecto al antígeno tumoral MUC1.

Tejido	Valores de p		
	MUC1/CD4	MUC1/CD8	MUC1/CD57
Corazón	0.44	0.11	0.15
Diafragma	0.83	0.10	0.24
Encéfalo	0.49	0.10	0.50
Hígado	0.13	0.09	0.50
Intestino	0.10	0.09	0.23
Pleura	0.07	0.09	0.12
Pulmón	0.05	0.08	0.07
Riñón	0.04	0.08	0.05
Glan. suprarrenal	0.00	0.00	0.09

Ag/población	MUC1/CD4	MUC1/CD8	MUC1/CD57
Correlación (r)	-0.25	-0.17	-0.48

Tabla 8. Valores de (p) en las pruebas de Chi cuadrado para conocer el valor de significancia y las asociaciones con el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los marcadores de poblaciones de linfocitos T CD4+, CD8+ y CD57+ con respecto al antígeno tumoral Tn.

Tejido	Valores de p		
	Tn/CD4	Tn/CD8	Tn/CD57
Corazón	0.16	0.15	0.15
Diafragma	0.26	0.25	0.24
Encéfalo	0.57	0.53	0.50
Hígado	0.45	0.48	0.50
Intestino	0.22	0.23	0.23
Pleura	0.12	0.12	0.12
Pulmón	0.07	0.07	0.07
Riñón	0.05	0.05	0.05
Glan. suprarrenal	0.11	0.09	0.09

Ag/población	Tn/CD4	Tn/CD8	Tn/CD57
Correlación (r)	-0.32	-0.08	-0.27

Tabla 9. Valores de (p) en las pruebas de Chi-cuadrado para conocer el valor de significancia y las asociaciones con el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre el marcador de activación de linfocitos T CD25+ con las poblaciones de linfocitos T CD4+, CD8+ y CD57+.

Tejido	Valores de p		
	CD25/CD4	CD25/CD8	CD25/CD57
Corazón	0.63	0.63	0.64
Diafragma	0.72	0.72	0.73
Encéfalo	0.47	0.51	0.53
Hígado	0.85	0.88	0.86
Intestino	0.85	0.81	0.86
Pleura	0.49	0.49	0.58
Pulmón	0.23	0.23	0.31
Riñón	0.74	0.75	0.76
Glan. suprarrenal	0.23	0.26	0.00

Tabla 10. Valores de (p) en las pruebas de Chi cuadrado para conocer el valor de significancia y las asociaciones con el coeficiente de correlación de Pearsons (r) entre el marcador de activación de linfocitos T CD69+ con las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+.

Tejido	CD4/CD69	CD8/CD69
Corazón	0.04	0.09
Diafragma	0.04	0.09
Encéfalo	0.07	0.12
Hígado	0.13	0.19
Intestino	0.26	0.31
Pleura	0.57	0.57
Pulmón	0.45	0.57
Riñón	0.25	0.37
Suprarrenal	0.11	0.21

Poblaciones	CD4/CD69	CD8/CD69
Correlación (r)	0.07	-0.12

Por último se determinaron las posibles glicofomas del antígeno T (tabla 11 y figura 11) con el uso de las lectinas indicadas en el cuadro 6 en la sección de metodología. Como se aprecia en la figura 11 hay un patrón de expresión diferente del antígeno T reconocidos por las lectinas de cacahuate (PNA), amaranto (ALL) y jacalina (JAC). No se sobreponen las marcas de las 3 lectinas en los tejidos, lo que nos indica la expresión de isoformas del antígeno T. En la tabla 11 se muestran los datos obtenidos por 3 lectinas que reconocen al antígeno T pero cada lectina reconoce isoformas diferentes.

Cabe mencionar que el reconocimiento del antígeno T para cada lectina no solo depende de la presencia del disacárido Gal-GalNAc unido a la serina o treonina del péptido, sino también del tipo de enlace que tiene con la siguiente galactosa por lo que para ALL reconoce la estructura Gal β 1,3GalNAc-O-Ser, uniéndose la lectina a la GalNAc, en cambio para PNA reconoce la estructura Gal β 1,3GalNAc-O-Ser, pero uniéndose la lectina a Gal β 1 y finalmente la

JAC reconoce la estructura α Gal(Gal β 1,3GalNAc-O-Ser) uniéndose la lectina a α Gal.

Tabla 11. Expresión de isoformas del antígeno T en las células tumorales en el tumor primario y en los tejidos con metástasis, identificadas con 3 lectinas.

TEJIDO	LECTINAS			No. DE CÉLULAS TUMORALES POR mm ²
	% DE CÉLULAS T (ALL+)	% DE CÉLULAS T (PNA+)	% DE CÉLULAS T (JAC+)	
Pulmón	56	74	62	1235
Encéfalo	7.2	1.69	5.2	955
Glan. suprarrenal	17.8	1.19	2.4	1168
Hígado	0.1	0.4	0.1	2516
Pleura	0.4	35.7	0.6	1234
Diafragma	0	-	-	627
Intestino	0.3	-	-	1085
Riñón	0.4	0.7	0.9	517
Corazón	0.7	0.2	0.5	372

Lectina de amaranto (ALL), lectina de cacahuete (PNA) y lectina jacalina (JAC)

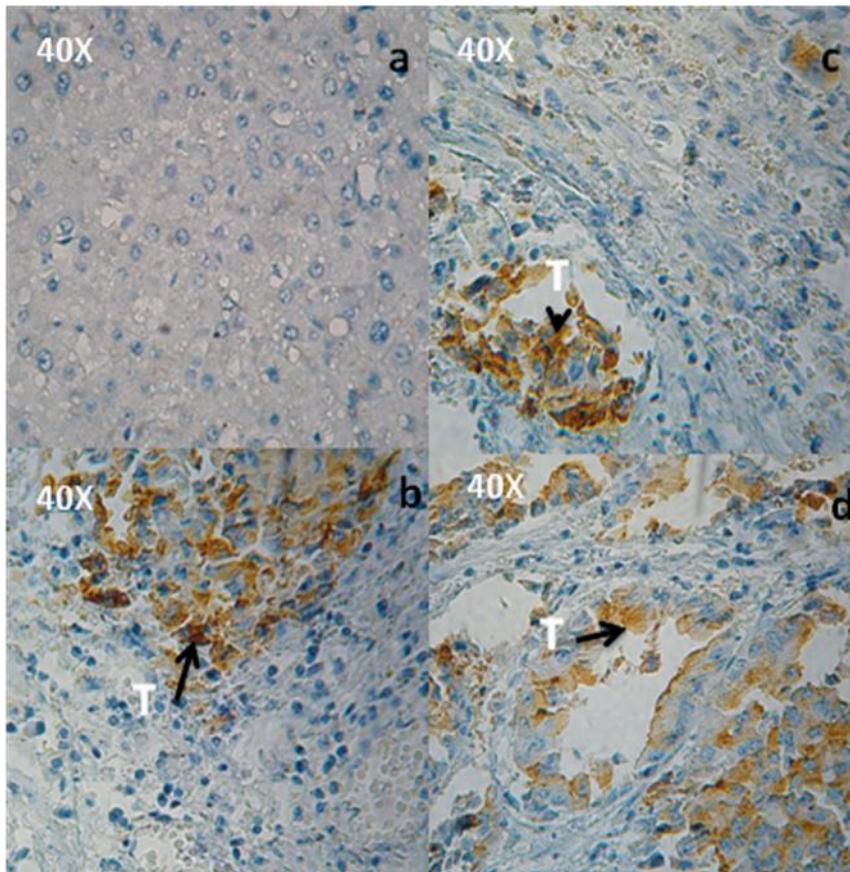


Figura 11. Expresión de las isoformas del antígeno T identificado con lectinas. a) Corte de hígado sin neoplasia, sin presencia de antígeno T. b) Hígado con metástasis marcado en marrón con la lectina de jacalina (JAC). c) Hígado con metástasis marcado en color marrón con

la lectina de amaranto (ALL). d) Hígado con metástasis marcado en color marrón con la lectina de cacahuete (PNA). Nótese la coloración en toda la membrana plasmática y en el citoplasma de la mayoría de las células neoplásicas (40X). (Digitalización de las imágenes con la cámara Sony Cyber-Shot DSC-W100 con resolución de 12.1 mega píxeles).

11. DISCUSION

La presencia del infiltrado inflamatorio en un tumor y el tipo de poblaciones celulares que en él se encuentran puede tener influencia en curso de la enfermedad neoplásica. Inclusive algunos autores han propuesto que las características del infiltrado inflamatorio pueden ser utilizadas como un factor pronóstico para el paciente.

Las poblaciones celulares con capacidad citotóxica son las más eficientes en la respuesta antitumoral como los linfocitos T CD8+ en particular. La presencia de estas poblaciones infiltrantes en la zona del tumor, no necesariamente indican la actividad citotóxica contra el tumor. Para mantener la homeostasis, el sistema inmune debe estar regulado para activar los mecanismos efectores cuando sean requeridos. En el caso de las neoplasias, la respuesta inmune antitumoral no siempre es eficiente, debido a que es común que los tumores presenten mecanismos de evasión inmune como la ausencia de un antígeno tumoral lo suficientemente inmunogénico para activar los mecanismos efectores de la respuesta antitumoral.

La mayoría de los estudios publicados para evaluar la respuesta inmune antitumoral se hacen partir de células en circulación, esto no necesariamente revela cual es la situación real de la respuesta inmune en la zona del tumor. 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 (Hanahan, 2000). El infiltrado celular en la zona del tumor es el reflejo del comportamiento antigénico de las células tumorales y de la pérdida de la tolerancia hacia las células tumorales (Kündig, 1995).

Durante varios años se reportó la presencia de infiltrado inflamatorio en los tumores malignos originados en varios tejidos como en mama, gástrico, colón y testículo, pero en pulmón la presencia de un infiltrado inflamatorio pobre es común (Soorae, 1997; Minami, 2005). La presencia de infiltrado inflamatorio en

general se relaciona con el buen pronóstico de los pacientes (Ishigami, 2000). Sin embargo, la respuesta inmunológica no siempre es un factor a favor del paciente, sino que también puede ser en contra. Recientemente, se ha demostrado la presencia de poblaciones de linfocitos T FoxP3+ con función reguladora que en el caso de pacientes con cáncer también tienen relación con un buen pronóstico del paciente (Aruga, 2009). Contrario a lo reportado por Bohling, 2008; Sasaki, 2008 y Mahmoud, 2010 en el que describen que estas células regulan negativamente la respuesta inmune contra el tumor, lo que permite su progresión. Por lo tanto, aún no es claro cuál es el papel de las células efectoras de la respuesta inmune infiltrantes en el sitio del tumor y porque no ejercen su acción antitumoral, aunque puede ser debido a la secreción de citocinas.

Si el infiltrado inflamatorio tiene un predominio de linfocitos T puede ser considerado como un factor pronóstico positivo para los pacientes ya que se ha descrito la regresión del tumor (Eerola, 2000), sobre todo cuando la relación de linfocitos CD8+ es mayor que los CD4+ (Nakano, 2001). Este fenómeno lo encontramos en nuestros resultados solamente en el tejido pulmonar que es el sitio del tumor primario, en cambio en la mayoría de los tejidos con metástasis la relación se invirtió.

Existen reportes en la literatura donde asocian la magnitud del infiltrado con el grado de diferenciación del tumor (Tomsova, 2008). En nuestro estudio encontramos que en la mayoría de los cortes, el infiltrado celular está ubicado en la periferia de los tumores bien diferenciados y con escasas células en el estroma del tumor.

Se han descrito numerosos epítomos sacarídicos asociados al comportamiento del tumor y a la regulación de la respuesta inmune (Mouritsen, 1994; Gorocica, 2008), por lo que actualmente están cobrando interés debido a su potencial uso terapéutico, profiláctico y diagnóstico.

Por la misma naturaleza sacarídica de los antígenos asociados al tumor, estos no son suficientemente inmunogénicos para activar una respuesta efectora eficiente en contra los tumores (Chen, 2000). Además, las mucinas por encontrarse de manera abundante como principal componente del moco en los epitelios de revestimiento no provocan una respuesta inmune por encontrarse un estado de tolerancia en contra de estas mucinas. La MUC1 no es la

excepción y en condiciones normales no es inmunogénica a menos que durante la carcinogénesis se modifique su estructura y por lo tanto sus características antigénicas.

Está bien documentado, que parte de las modificaciones estructurales que presenta MUC1 dejan expuestos epítomos inmunogénicos de tipo sacarídico como el antígeno Tn y el antígeno T (Irazoqui, 2005). Esto sucede al interrumpirse la O-glicosilación de la MUC1, lo que genera una molécula lo suficientemente inmunogénica para activar la respuesta antitumoral. Es tal la relevancia inmunológica de esta molécula alterada estructuralmente durante la carcinogénesis de algunas neoplasias como los adenocarcinomas y en especial de pulmón que se ha propuesto para ser utilizada en el tratamiento y seguimiento de los pacientes con cáncer (Peracaula, 2008).

Cerca del 90% de los adenocarcinomas expresan alteración en la glicosilación (Hakomori, 2001) y una gran proporción presentan anticuerpos contra los antígenos T y Tn (Springer, 1997), lo que sugiere que hay una buena respuesta contra esos epítomos sacarídicos.

Los antígenos Tn y T son expresados de manera normal en la superficie de eritrocitos y en otras células mononucleadas en circulación, pero no se expresan normalmente en tejidos no sanguíneos. Como estos antígenos son el core 2 y son la base para la biosíntesis del resto de las moléculas O-glicosiladas determinada por la unión de un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a una serina o una treonina del péptido que están siendo O-glicosilados. La estructura de las cadenas carbohidratas con uniones de tipo O varía según el tipo celular y el tejido analizado, dependiendo, entre otros factores, del perfil de glicosiltransferasas, de sus actividades relativas, de la localización subcelular de las enzimas y de las secuencias peptídicas glicosilables. Por lo tanto pueden presentar variantes sobretodo con el tipo de enlace α o β que forma para enlazarse con el siguiente carbohidrato por lo que se decidió utilizar 3 lectinas para identificar a las posibles glicoformas de esos antígenos. Las lectinas se utilizaron para reconocer al antígeno T fueron ALL, PNA y Jac (cuadro 6). Nuestros resultados demuestran que efectivamente hay diferencia en el patrón de reconocimiento para las lectinas en el mismo tejido, esto nos confirma que existen glicoformas diferentes del antígeno T que se expresan en las células tumorales (tabla 11).

Se utilizó en el análisis estadístico la prueba de independencia Chi-cuadrado porque nos permite determinar si existe una relación entre dos variables categóricas. En los análisis estadísticos se encontró en la mayoría de los casos un valor de p para la prueba de Chi-cuadrado alto, es decir mayor a 0.1 lo que indica que la expresión de los marcadores glicosilados MUC1 con Tn y MUC1 con T en los tejidos analizados no eran tan diferente entre ellos. Esto indica que no hay ninguna asociación entre esos grupos de variable y por lo tanto la diferencia no es estadísticamente significativa, por lo que si hay una alta correlación $r= 0.95$. Para los grupos de variables entre marcadores tumorales glicosilados y poblaciones celulares solo para la asociación MUC1/CD8 podemos ver en la tabla 7 que para la mayoría de los tejidos (excepto corazón, diafragma y encéfalo) si hay asociación entre esas variable y la diferencia si es significativa aunque tienen una correlación negativa $r = -0.17$.

12. CONCLUSION

El antígeno Tn en las células tumores de pacientes con adenocarcinoma pulmonar que expresan MUC1 correlaciona de manera casi perfecta por lo que se puede concluir que ese epítipo está coexpresandose en la misma molécula. En las células tumores de pacientes con adenocarcinoma pulmonar que expresan MUC1 existe una correlación con el fenotipo de las células citotóxicas CD8+ infiltrantes en el área del tumor.

13. PERSPECTIVAS

El área de la glicobiología del cáncer tiene grandes expectativas para encontrar solución a uno de los problemas de salud, económico y social más importantes en la actualidad. Pero hay mucho camino por recorrer y enfocar nuestra atención en esta área puede aportar información que conlleve a desarrollar una estrategia efectiva en contra del cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agrawal B, Longenecker B. MUC1 mucin-mediated regulation of human T cells. *International Immunology* 2005; 17:391-399.
2. Albert R, Spiro S, Jett J. Tratado de Neumología: tumores del pulmón. 1ed. 2001 Madrid: Harcourt, Cap. 43.
3. Aruga T, Suzuki E, Saji S, Horiguchi S, Horiguchi K, Sekine S. A low number of tumor-infiltrating FOXP3-positive cells during primary systemic chemotherapy correlates with favorable anti-tumor response in patients with breast cancer. *Oncol Resp.* 2009; 22:273–278.
4. Bafna S, Kaur S, Batra SK. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene* 2010; 29(20):2893-904.
5. Bohling S, Allison K. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. *Modern Pathology.* 2008; 21:1527–1532.
6. Bohnenkamp H, Coleman J, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Noll T., Breast carcinoma cell lysate-pulsed dendritic cells cross-prime MUC1-specific CD8+ T cells identified by peptide-MHC-class-I tetramers. *Cell Immunol.* 2004; 231(1-2):112-25.
7. Callagan R, Voynow J. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006; 86:245-278.
8. Cáncer. http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/pulmon-celulas-no-pequenas/HealthProfessional#Section_335 consultado el 10 de enero de 2011.
9. Chandrasekaran V, Xue J, Neelamegham S, Matta K. "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". *Carbohydrate Res* 2006; 341:983-94.
10. Characiejus D, Pasukoniene V, Jonusauskaite R. Pheripheral blood CD8 higCD57+ lymphocyte levels may predict outcome in melanoma patients treated with adjuvant interferon alpha. *Anticancer Res* 2008; 28:1139-1142.
11. Chen D, Koidos S, Li Y, Gendler S, Gong J. T cell Suppression as a mechanism for tolerance to MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2000; 60(2):107-115.

12. Clausen H, Bennett E. A family of UDP-GalNAc:polypeptide Nacetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology* 1996; 6: 635-46.
13. Copin M, Devisme L, Buisine M, Marquette C, Wurtz A, Aubert J. From normal respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes. *Int J Cancer* 2000; 86(2):162-168.
14. Couldrey C, Green J. Metastases: the glycan connection. *Breast Cancer Res* 2000; 2:321-323.
15. Croce M, Isla-Larrain M, Rua C, Rabassa M, Gendler S, Segal-Eiras A. Patterns of MUC1 Tissue Expression Defined by an Anti-MUC1 Cytoplasmic Tail Monoclonal Antibody in Breast Cancer. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2003; 51: 781-788.
16. Dall'Olio F, Chiricolo M. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J* 2001;18:841-850
17. Eerola A, Soini Y, Paakko P. A High Number of Tumor-infiltrating Lymphocytes Are Associated with a Small Tumor Size, Low Tumor Stage, and a Favorable Prognosis in Operated Small Cell Lung Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2000; 6:1875-1881.
18. El-Torky M, El-Zeky F, May J. Significant changes in the distribution of histologic types of lung cancer. A review of 4,928 cases. *Cancer* 1990; 65:2361-2367.
19. Freire T, Osinaga E. Immunological and biomedical relevance of the Tn antigen. *Inmunología* 2003; 22 (1): 27-38.
20. Freire T, Robello C, Casaravilla C, Álvarez D, Medeiros SA, Carmona C, Osinaga E. Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. *Actas de Fisiología* 2002; 8: 89-107.
21. Freire T, Zhang X, Dériaud E, Ganneau C, Vichier-Guerre S, Azria E, Launay O, R Lo-Man, Bay S, Leclerc C. Glycosidic Tn-based vaccines targeting dermal dendritic cells favor germinal center B-cell development and potent antibody response in the absence of adjuvant. *Blood* 2010; 116(18):3526-3536.
22. Garber M, Troyanskaya O, Schluens K. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:13784-9.
23. Gazdar A. The molecular and cellular basis of human lung cancer. *Anticancer Res* 1994; 14:261-267.

24. Gendler S. MUC1, the renaissance molecule. *J Mamm. Gland Biol. Neoplasia* 2001; 6:339-353.
25. Gorocica P, Atzín J, Saldaña A, Espinosa B, Urrea F, Vázquez N, Lascurain R. Comportamiento tumoral y glicosilación. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2008; 21
26. Graziano S. Non-small cell lung cancer: clinical value of new biological predictors. *Lung Cancer*, 1997, 17: S37-58.
27. Green LS, Fortoul 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.
28. Hakomori S. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2001, 491:369-402.
29. Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57–70.
30. Hanish F, Ninkovic Tanja. Immunology of O-Glycosylated Proteins: Approaches to the Design of a MUC1 Glycopeptide-Based Tumor Vaccine. *Current Protein and Peptide Science* 2006; 7:307-315.
31. Hayes D, Zurawski J, Kufe, D. Comparison of circulating CA15-3 and carcinoembryonic antigen levels in patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1986; 4:1542–1550.
32. Hilkens J, Ligtenberg J, Vos H. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biochem Sci.* 1992; 17:359-363.
33. Ho S, Kim Y. Carbohydrate antigens on cancer-associated mucin-like molecules. *Semin Cancer Biol* 1991; 2: 389–400.
34. Ho S, Niehans G, Lyftogt C, Yan P, Cherwitz D, Gum E, Dahiya R, Kim Y. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1993; 53: 641–651.
35. Hollingsworth M, Swanson B. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4: 45-60.
36. INEGI
<http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/español/prensa/contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf> consultado el 17 de noviembre de 2010.
37. Irazoqui F, Sendra V, Lardone R, Nores G. Immune response to Thomsen-Friedenreich disaccharide and glycan engineering. *Immunol Cell Biol* 2005;83(4):405-12.

38. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 88:577-83.
39. Jonckheere N, Van Seuning I. The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie*. 2010; 92:1-11.
40. Keith R. Chemoprevention of lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 15; 6:187-93.
41. Kerr K. Pulmonary adenocarcinomas: classification and reporting. *Histopathology* 2009; 54:12–27.
42. Ko J, Miyoshi E, Noda K, Ekuni A, Kang R, Ikeda Y, Taniguchi N. Regulation of the GnT-V promoter by transcription factor Ets-1 in various cancer cell lines. *J Biol Chem*. 1999; 274:22941-22948.
43. Kündig T, Bachmann M, DiPaolo C, Simard J, Battegay M, Lothar H, Gessner A, Kuhlcke K, Ohashi P, Hengartner H. Fibroblasts as efficient antigen-presenting cells in lymphoid organs. *Science* 1995; 268:1343-1347.
44. Laidler P, Litynska A. Tumor cell N-glycans in metastasis. *Acta Biochim Pol* 1997; 44:343-357.
45. Leroy X, Buisine MP, Leteurtre E, Aubert S, Buob D, Porchet N, Copin MC. MUC1 (EMA): A key molecule of carcinogenesis?. *Ann Pathol* 2006; 26(4):2.57-66.
46. Lee T, Horner R, Silverman J, Chen Y, Jenny C, Scarantino C. Morphometric and morphologic evaluations in stage III non-small cell lung cancers. Prognostic significance of quantitative assessment of infiltrating lymphoid cells. *Cancer*. 1989; 63(2):309-316.
36. Levitin F, Stern O, Weiss M, Gil-Henn C, Ziv R, Prokocimer Z, Smorodinsky N, Rubinstein D, Wreschner D. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *J Biol Chem* 2005 Sep 30; 280(39):33374-86.
37. Lisowska E. The role of glycosylation in protein antigenic properties. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(3):445-55.
48. Liu B, Lague D, Nunes P, Toselli F, Oppenheim R, Soares R, Offner D. Expression of membrane-associated mucins MUC1 and MUC4 in major human salivary glands. *J Histochem Cytochem* 2002; 50:811.
49. Mahmoud S, Paish E, Powe D, Macmillan R, Lee A, Ellis L, Green A. An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells human breast cancer. *Breast Cancer Research*. DOI 10.1007/s10549-010-0987-8.

50. Makitaro R, Paakko P, Huhti E, Bloigu R, Kinnula V. An types in a general population in northern Finland. *Eur Respir* 1999; 13:436-440.
51. McDermott K, Crocker P, Harris A. Overexpression of MUC1 reconfigures the binding properties of tumor cells. *Int J Cancer* 2001; 94:783-791.
52. McGuckin M, Every A, Skene C, Linden S, Chionh Y, Swierczak A, McAuley J, Harbour S, Kaparakis M, Ferrero R, Sutton P. MUC1 mucin limits both *Helicobacter pylori* colonization of the murine gastric mucosa and associated gastritis. *Gastroenterology* 2007; 133(4):1210-8.
53. McNerlan S, Rea I, Alexander H, Morris T. Changes in natural killer cells, the CD57CD8 subset, and related cytokines in healthy aging *J Clin Immunol* 1998;18:31-38.
54. Merlo G, Siddiqui J, Cropp C, Liscia D, Lidereau R, Callahan R, Kufe D. Frequent Alteration of the DF3 Tumor-associated Antigen Gene in Primary Human Breast Carcinomas. *Cancer Research* 1989; 49:6966-6971.
55. Meyerson, M., Franklin, W.A., Kelley, MJ. Molecular classification and molecular genetics of human lung cancers. *Semin Oncol* 2004; 31 :4-19.
56. Minami Y, Matsuno Y, Iijima T, Morishita Y, Onizuka M, Sakakibara Y, Noguchi M. Prognostication of small-sized primary pulmonary adenocarcinomas by histopathological and karyometric analysis. *Lung Cancer* 2005; 48(3): 339-48.
57. Mitchell M, Lund T, Sewell A, Marincola F, Paul E, Schroder K, Wilson D, Kan-Mitchell J. The cytotoxic T cell response to peptide analogs of the HLA-A*0201-restricted MUC1 signal sequence epitope, M1.2. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(3):287-301.
58. Mouritsen S, Meldal M, Christiansen-Brams I, Elsner H, Werdelin O. Attachment of oligosaccharides to peptide antigen profoundly affects binding to major histocompatibility complex class II molecules and peptide immunogenicity. *Eur J Immunol* 1994; 24:1066-1072.
59. Müller S, Alving K, Peter-Katalinic J, Zachara N, Gooley A, Hanisch F. High Density O-Glycosylation on Tandem Repeat Peptide from Secretory MUC1 of T47D Breast Cancer Cells *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274:18165–18172.
60. 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; 61:5132–5136.

61. Niklinska W, Chyczewski L, Laudanski J, Sawicki B, Niklinski J. Detection of P53 abnormalities in non-small cell lung cancer by yeast functional assay. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; 39:147-148.
62. Ninkovic T, Kinarsky L, Engelmann K, Pisarev V, Sherman S, Finn O, Hanisch F. Identification of O-glycosylated decapeptides within the MUC1 repeat domain as potential MHC class I (A2) binding epitopes. *Mol Immunol* 2009; 47(1): 131–140.
63. Ohno, S, Ohno Y, Nakada H, Suzuki N, Soma G, Inoue M. Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in endometrial cancer: its relationship with tumor-produced cyclooxygenase-2, tumor-infiltrated lymphocytes and patient prognosis. *Anticancer Res.* 2006; 26:4047-4053.
64. Okada T, Liai T, Kawachi Y. Origin of CD57+ T cells which increase at tumor, sites in patients with colorectal cancer. *Clin Exp Immunol* 1995; 102:159-166.
65. Osinaga E. Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. *IUBMB Life* 2007, 59:269-73.
66. Parry S, Hanisch F, Leir S, Sutton-Smith M, Morris H, Dell A, Harris A. N-Glycosylation of the MUC1 mucin in epithelial cells and secretions. *Glycobiology* 2006; 16:623-34.
67. Peracaula R. Altered glycosylation in tumour proteins: biological implications. *Revista de química teórica y aplicada* 2007; 64(529):346-355.
68. Peracaula R, Barrabés S, Sarrats A, Rudd P, de Llorens R. Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Dis Markers.* 2008; 25:207-218.
69. Perng D, Perng R, Kuo B, Chiang S. 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.
70. Polit D, Hungler B.. Estadística inferencial. En *Investigación Científica en Ciencias de la Salud: Principios y Métodos* 2000. 6ª ed. México: Mc Graw Hill. p.485 – 520
71. Reis C, 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.
72. Rivera R, Salazar M. Cáncer pulmonar: Distribución de metástasis de acuerdo al tipo histológico. Estudio de autopsias. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2002; 15: 84-89.

73. Sasaki A, Tanaka F, Mimori K. Prognostic value of tumor-infiltrating FOXP3+ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34:173–179.
74. Sheu B, Chang W, Cheng C, Lin H, Chang D, Huang S. Cytokine regulation networks in the cancer microenvironment. *Front Biosci.* 2008; 13:6255-6268.
75. Singhal A, Hakomori S. Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *BioEssays* 1990, 12:223-230.
76. Soorae A, Stevenson J. Survival with residual tumor on the bronchial margin resection for lung cancer in octogenarians. *Ann Thorac Surg* 1997; 63:785.
77. Springer G, Desai P. Tn epitopes, immunoreactive with ordinary anti-Tn antibodies, on normal, desialylated human erythrocytes and on Thomsen-Friedenreich antigen isolated therefrom. *Mol Immunol* 1985; 22(11):1303-10.
78. Springer G. Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Journal of Molecular Medicine.* 1997; 75(8):594-602.
79. Stepensky D, Tzehoval E, Vadai E, Eisenbach L. O-glycosylated versus non-glycosylated MUC1-derived peptides as potential targets for cytotoxic immunotherapy of carcinoma. *Clin Exp Immunol.* 2006; 143:139-149.
80. Sun S, Schiller J, Gazdar A. Lung cancer in never smokers a different disease. *Nature Rev* 2007; 7:778-790.
81. Taylor C. An exaltation of experts: concerted efforts in the standardization of immunohistochemistry. *Applied immunohistochemistry* 1993 ;1:223-243
82. Taylor-Papadimitriou J, Burchell JM, Plunkett T, Graham R, Correa I, Miles D, Smith M. MUC1 and the immunobiology of cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7:588–94.
83. Tomsova M, Melichar B, Sedlakova I, Steiner I. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2008;108: 415–420.
84. Travis W, Brambilla E, Muller-Hermlink H, Harris C. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. IARC Press. Lyon 2004.

- 85.** Tsuta K, Ishii G, Kim E, Shiono S, Nishiwaki Y, Endoh Y, Kodama T, Nagai K, Nagai K. Primary lung adenocarcinoma with massive lymphocyte infiltration. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123(4):547-52.
- 86.** Ugorski M, Laskowka A. Sialil Lewis (a): a tumor-associated carbohydrate antigen involved adhesion and metastatic potential of cancer cells. *Acta Biochem Pol.* 2002; 49(2):303-311.
- 87.** Van den Steen P, Rudd P, Dwek R, Opdenakker G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem.* 1998; 33:151-208.
- 88.** Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. *Essentials of Glycobiology.* 1999. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp.653.
- 89.** Vlad A, Muller S, Cudic M, Paulsen H, Otvos L, Hanisch F, Finn O. Complex carbohydrates are not removed during processing of glycoproteins by dendritic cells: processing of tumor antigen MUC1 glycopeptides for presentation to major histocompatibility complex class II-restricted T cells. *J Exp Med* 2002; 196(11):1435-1446.
- 90.** Weinberg R. How cancer arises. *Scientific American* 1996. 62-70.
- 91.** WHO <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> consultado el 17 de noviembre de 2010.
- 92.** Yamashita Y, Chung S, Horie R, Kannagi R, Sowa M. Alterations in gastric mucin with malignant transformation: novel pathway for mucin synthesis. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:441-446.
- 93.** Yao H, Guo L, Jiang B, Luo J, Shi X. Oxidative stress and chromium(VI) carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2008; 27:77-88.

ANEXO 1

Reactivos utilizados

- CAT Hematoxylin (Biocare Medical)
- Etanol absoluto (Mallinckrodt)
- Acetona (Merck)
- Medio de montaje EcoMount (Biocare Medical)
- Peroxidazed 1 (Biocare Medical)
- Background Eraser (Biocare Medical)
- Labelled Polymer-HRP anti-mouse (DakoCytomation)
- Neuraminidase (sialidase) from *Vibrio cholerae* 1U (Boehringer Mannheim)
- Diva Decloaker 1X (Biocare)
- ImmunoDNA Retriever EDTA 1X (Bio SB)
- ExtrAvidin-Peroxidase (Sigma)
- Aminosilano (Trimethoxysilyl) propyl methacrylate (Sigma)
- DAB1000 Chromogen System (Biocare Medical)
- 1 mL de DAB Substrate Buffer (Biocare Medical)

ANEXO 2

Soluciones utilizadas

Aminosilano al 3% en acetona

Mezclar:

- 7.5 mL de 3-(Trimethoxysilyl) propyl methacrylate (Sigma)
- 242 mL de acetona (Merck)

La solución se almacena a una temperatura de 2-8°C y se utiliza una sola vez.

Solución salina tamponada (TBS)

Mezclar:

- 2.42 g de Trizma® Base (Sigma)
- 8 g de NaCl (J. T. Baker)

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1 litro con agua desionizada. La solución se almacena a una temperatura de 2-8°C.

Alcohol al 60%

Mezclar:

- 60 mL de alcohol absoluto (Mallinckrodt)
- 40 mL de agua desionizada

La solución se almacena a temperatura ambiente.

Alcohol al 70%

Mezclar:

- 70 mL de alcohol absoluto (Mallinckrodt)
- 30 mL de agua desionizada

La solución se almacena a temperatura ambiente.

Alcohol al 80%

Mezclar:

- 80 mL de alcohol absoluto (Mallinckrodt)
- 20 mL de agua desionizada

La solución se almacena a temperatura ambiente.

Alcohol al 96%

Mezclar:

- 96 mL de alcohol absoluto (Mallinckrodt)
- 4 mL de agua desionizada

La solución se almacena a temperatura ambiente.

TBS-Tween al 0.05%

Mezclar:

- 1 litro de TBS pH 7.4
- 0.5 mL de Tween 20 (Sigma)

Almacenar la solución a una temperatura de 2-8°C.

TBS-calcio 2mM

Pesar 0.22 g de cloruro de calcio (Productos Químicos Monterrey) y aforar a 1 litro con TBS. La solución se almacena a una temperatura de 2-8°C.

Solución recuperadora de antígeno Diva Decloaker 1X

Mezclar:

- 45 mL de agua desionizada
- 5 mL de Diva Decloaker 10X, Biocare Medical

La solución debe prepararse justo antes de usarla.

Solución recuperadora de antígeno ImmunoDNA Retriever EDTA 1X

Mezclar:

- 2.5 mL de Diva Decloaker 20X (Bio SB)
- 47.5 mL de agua desionizada

La solución se almacena a temperatura ambiente y es estable durante 2 años.

Solución de revelado

Mezclar:

- 50 μ L de DAB1000 Chromogen System (Biocare Medical)
- 1 mL de DAB Substrate Buffer (Biocare Medical)

Preparar la solución justo antes de usarla.

Solución saturada de carbonato de litio

Mezclar:

- 2 g de carbonato de litio (J. T. Baker)
- 50 mL de agua desionizada

La solución es estable a temperatura ambiente.

Albúmina al 1%

Mezclar:

- 1 g de albúmina libre de Ig (Sigma)
- aforar a 10 mL con TBS

Almacenar a -20°C hasta su uso.

Extravidina-peroxidasa [1:1000]

Mezclar:

- 1 μ L de ExtrAvidin-Peroxidase (Sigma)
- 999 μ L de TBS

Almacenar a una temperatura de $2-8^{\circ}\text{C}$ y si la solución se oscurece debido al almacenamiento prolongado, centrifugar antes de usar.