

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

“Detección de auto-anticuerpos en pacientes con cáncer de mama empleando un panel de antígenos asociados a tumor (AATs)”.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

IBQ. Elsa Cecilia Pagaza Straffon

Director de tesis

Dr. Mario César López Camarillo

México, D.F. Enero, 2015.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario Cesar López Camarillo

Profesor Titular, Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. Yadira Palacios Rodríguez

Investigadora. Unidad de Investigación en Bioprocesos

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Profesor Titular, Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. José de la Luz Díaz Chávez

Investigador. Subdirección de Investigación Básica

Instituto Nacional de Cancerología



Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Proteómica y Oncogenómica del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, bajo la dirección del Dr. Mario César López Camarillo.

El alumno recibió una beca CONACYT durante la realización de su proyecto de Maestría (no. de apoyo 341800).

También se contó con apoyo económico otorgado por la UACM, mediante la convocatoria “Beca para obtención de Grado 2014-II”.

Así mismo, este Proyecto fue financiado por el SECITI, DF. Convenio ICYTDF/214/2012.

DEDICATORIA

A MIS HIJOS

MAX

NUBY

SETH

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por permitirme vivir y seguir creciendo como persona y profesionista.

A mis padres porque gracias a ellos soy quien soy en la vida.

A la Dra. Yadira Palacios Rodríguez por estar conmigo desde el inicio de este proyecto, apoyarme, enseñarme desde lo básico en el laboratorio, pero sobre todo tenerme toda la paciencia.

Al Dr. Mauricio Castañón Arreola por cumplir su palabra, por trabajar lado al lado conmigo, por todo el apoyo brindado.

Al Dr. César López por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, confiar en mí, entender que soy madre y apoyarme.

Les agradezco, no dejarme CLAUDICAR.

Agradezco la dedicación y esfuerzo de todos y cada uno de los profesores del Posgrado (Martha Yocupicio, Cesar López, Mavil López, Mauricio Castañón, Elizbeth Álvarez, José de Jesús Trejo, Minerva Camacho, Humberto Nicolini, Elisa Azuara, Lorena Orozco, Selene Zarate, Itzel Quintas, Lilia López). También agradezco a todo el grupo de profesores invitados que tuvieron la paciencia de enseñarnos y compartir sus conocimientos.

Agradezco a mis compañeros de generación y compañeros de laboratorio por el apoyo y amistad que me brindaron, gracias chicos: Hugo, Nayeli, Kenji, Ada, Mariana, Montse, Edgar, David, Francisco, Ricardo, Karla, Juan Carlos, Itzel López, José Luis, Olga, Ali, Rubí, Elios, Laura, Jaquelin.

ÍNDICE	págs.
LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
RESUMEN	iv
I.INTRODUCCION	1
1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA	1
1.1 Genética del cáncer	1
1.2 El cáncer de mama	5
1.3 Factores de Riesgo	10
1.4 Clasificación	11
1.5 Estadíos	14
1.6 Costo de la atención medica del cáncer de mama en México	17
2. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO	18
2.1 Anticuerpos	19
2.2 Antígenos	24
2.3 Interacción antígeno-anticuerpo	25
2.4 Anticuerpos monoclonales y policlonales	26
2.5 Técnicas inmunoquímicas	29
2.6 Técnica de enzimoimmunoensayo	31
2.7 Auto anticuerpos	37

2.8	Métodos de identificación de auto anticuerpos asociados a tumor	39
3.	ESTADO DEL ARTE	43
3.1	Antígenos asociados a tumor	43
4.	IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO DEL TEMA	45
4.1	La proteína p53	46
4.2	Las proteínas Hsp27 y Hsp70	47
4.3	El oncogen c-Myc	48
4.4	La proteína ciclina B1	49
4.5	El antígeno carcinoembrionario (CEA)	49
4.6	La proteína Ki-67	50
4.7	La proteína DJ1	51
4.8	La proteína PRDX6	52
4.9	La enzima Nm23	52
4.10	La proteína eIF5A	54
4.11	La proteína glioxalasa 1	54
II	OBJETIVOS	56
1.	OBJETIVO GENERAL	56
2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
III.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	57
IV.	MÉTODOLOGÍA	58
1.	MUESTRAS DE SUERO	58

2. ELECCIÓN DE PROTEÍNAS A EVALUAR	60
3. ENSAYOS DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)	62
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
V. RESULTADOS	64
1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	64
2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA	69
3. EVALUACIÓN DE ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMOR	75
VI. DISCUSIÓN	89
VII. CONCLUSIONES	92
VIII. APÉNDICE (PREPARACIÓN DE SOLUCIONES)	93
IX. BIBLIOGRAFÍA	95

LISTA DE ABREVIATURAS

6xHis	Etiqueta de 6 hidistidinas
α-6xHis	Anticuerpo anti-etiqueta de 6 histidinas
aa	Aminoácidos
AAT	Antígeno Asociado a Tumor
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
cDNA	Ácido Desoxirribonucleíco complementario
DNA	Ácido Desoxirribonucleíco
D.O.	Densidad Óptica
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetra -acético
h	Horas
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
L	Litros
mA	Miliamperios
min	Minuto
ml	Mililitro
mRNA	RNA mensajero
nt	Nucleótidos
pb	Pares de Bases
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
RNA	Ácido Ribonucleíco
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
μl	Microlitros
U	Unidades
v	Volts

LISTA DE FIGURAS	págs.
Figura 1. Incidencia y Mortalidad de Cáncer en población femenina mexicana en 2012.	9
Figura 2. Estructura de un anticuerpo.	21
Figura 3. Fragmentos de anticuerpos creados por diferentes enzimas.	23
Figura 4. Anticuerpos policlonales y monoclonales.	27
Figura 5. Principio básico de la técnica de ELISA indirecto o competitivo y directo o no competitivo.	33
Figura 6. Enfoques sistemáticos para identificar auto-anticuerpos asociados a tumor.	42
Figura 7. Estandarización del bloqueo de las placas de microtitulación	70
Figura 8. Selección de controles positivos para el sistema de ELISA.	72
Figura 9 Selección de controles positivos para el sistema de ELISA 2.	74
Figura.10. Evaluación de la existencia de auto anticuerpos en pacientes con cáncer de mama contra la proteína p53.	76
Figura 11. Gráficas del total de sueros analizados contra el AAT	77
Figura 12. Panel p53/CEA/PRDX6.	84
Figura 13. Panel p53/Hsp70/ Perosxirredoxina-6/ c-Myc.	85
Figura 14. Panel p53/Hsp70/ Perosxirredoxina-6/ c-Myc/ Nm23	87

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de nuevos casos y muertes en el mundo y en México por cáncer de mama en mujeres.	8
Tabla 2. Subtipos de marcadores biológicos.	13
Tabla 3. Clasificación TNM.	16
Tabla 4. Principales métodos analíticos basados en la interacción Ag-Ac.	30
Tabla 5. Marcadores enzimáticos más comúnmente utilizados.	35
Tabla 6. Proteínas recombinantes.	61
Tabla 7. Características de las pacientes con cáncer de mama.	65
Tabla 8. Características clínicas de los tumores de las pacientes con cáncer de mama.	66
Tabla 9. Características de marcadores biológicos de los tumores con cáncer de mama	67
Tabla 10. Características de los sujetos sanos.	68
Tabla 11. Frecuencia de auto anticuerpos contra 12 AAT's.	80
Tabla 12. Frecuencia de pacientes positivos contra los 12 AAT's	81
Tabla 13. Frecuencia de sujetos sanos positivos contra los 12 AAT's.	82
Tabla 14. Sensibilidad y especificidad de los paneles.	88

RESUMEN

Estudios previos han demostrado que el suero de sujetos con cáncer contiene anticuerpos, los cuales reaccionan contra un grupo de proteínas antigénicas denominadas antígenos asociados a tumor (AAT). En este estudio se determinó si se pueden detectar anticuerpos contra un panel de AAT's y evaluar su utilidad en la detección de mujeres con cáncer de mama. Se emplearon 5 AAT's previamente reportados incluyendo: CEA, c-myc, ciclina B1, p53 y Ki-67. Además se consideraron 7 proteínas que previamente habíamos detectados que mostraron expresión diferencial en tejido mamario sano y tejido maligno de mujeres mexicanas con cáncer de mama y evaluamos su utilidad como potenciales AAT's, como es el caso de Nm23, PRDX6, eIF5A, DJ1, glioxalasa, Hsp27 y Hsp70. Para la detección se empleó el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) contra los 12 AAT's recombinantes en 104 muestras de sueros de pacientes con cáncer de mama y 50 muestras de suero de sujetos sanos. 94 de las muestras fueron mujeres con carcinoma conductal y 10 lobulillar, 19 se encontraban en estadio II, 80 en estadio III y 5 en estadio IV. La frecuencia de detección para cada uno de estos AAT's en cáncer de mama fue variable para el caso de glioxalasa y ciclina B1 la sensibilidad fue de 0.96% en ambas proteínas, para CEA, eIF5A y DJ1 la sensibilidad fue de 1.9%, mientras que para Nm23, Ki-67 y Hsp70 fue de 2.88%. c-Myc y p53 mostraron una sensibilidad de 3.8% y 4.8% respectivamente. Aun cuando estos valores de sensibilidad fueron bajos se generaron 3 paneles de múltiples AAT's para incrementar el nivel de detección. El primero panel fue el conformado por P53/PRDX6/CEA, el segundo panel de 4 AAT's formado por P53/PRDX6/c-myc/Hsp70 con una sensibilidad de 28% y el tercer panel de 5 AAT's constituido por P53/PRDX6/c-myc/Hsp70/Nm23 con sensibilidad del 24%. Nuestros resultados mostraron que la sensibilidad de detección aún en estos paneles fue baja indicándonos que la generación de anticuerpos contra los AAT's seleccionados en esta población en estudio es discreta.

I.INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

1.1 Genética del cáncer

El cáncer es el crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo. Las células cancerosas también se denominan células malignas. Se origina de células normales en el cuerpo. Las células normales se multiplican cuando el cuerpo las necesita y mueren cuando el cuerpo ya no las necesita. De manera natural, las células normales se multiplican cuando el cuerpo las necesita y mueren cuando el cuerpo ya no las necesita o bien, cuando presentan alguna alteración identificada por mecanismos sensores. El cáncer parece ocurrir cuando el crecimiento de las células en el cuerpo está fuera de control y éstas se dividen demasiado rápido. Igualmente, puede ocurrir cuando las células pierden el control sobre los mecanismos que regulan la muerte celular.

Existen diferentes tipos de cáncer. Puede aparecer en casi cualquier órgano o tejido, como el pulmón, el colon, los senos, la piel, los huesos o el sistema nervioso.

El cáncer es una de las enfermedades más devastadora en el mundo debido a que no existe aún una cura o prevención efectiva que pueda disminuir los altos niveles de mortalidad (1). Existen 5 pasos primordiales en el desarrollo del cáncer: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-crecimiento, evasión de apoptosis potencial de replicación ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión de tejido y metástasis (2). A continuación se describen cada uno de estos procesos:

Autosuficiencia en señales de crecimiento

Aunque la mayoría de los factores de crecimiento mitogénicos solubles son producidos por un tipo de célula para estimular la proliferación de otro (un proceso conocido como señalización heterotípica), muchas células cancerosas adquieren

la capacidad de sintetizar sus propios factores de crecimiento a los cuales responden. Esto crea un *bucle de señalización-retroalimentación positiva* que se conoce como estimulación autócrina. Algunos de los factores de crecimiento autócrinos que se producen por las células tumorales no sólo proporcionan señales estimuladoras de crecimiento sino también pueden subvertir la respuesta inmune simultáneamente (3).

Insensibilidad a señales anti-crecimiento

En el tejido sano operan múltiples señales de anti-proliferación que mantienen la quiescencia celular y la homeostasis del tejido. Tales señales incluyen aquellas mediadas por inhibidores de crecimiento solubles y por inhibidores de crecimiento inmovilizados que están embebidos en la matriz extracelular y en la superficie de las células vecinas. Una de las más importantes señales anti-proliferativas es mediada por el factor de crecimiento transformante β (TGF β), y algunos componentes de los tumores inhabilitan la vía de señalización mediada por TGF β : por ejemplo, por mutación o pérdida de receptores de TGF β . La resistencia de TGF β inhibe la presentación del antígeno, proliferación de células T, la citotoxicidad de células asesinas naturales en la respuesta inmune (4).

Evasión y apoptosis

La apoptosis se lleva a cabo a través de dos vías principales: la vía mitocondrial o intrínseca, lo que implica la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y la vía de los receptores de muerte o extrínseca, que implica la señalización a través de receptores de la membrana plasmática, llevando a la formación de un complejo de señalización inductor de la muerte. Ambas vías culminan en la activación de las caspasas para la desestabilización celular y finalmente su muerte de manera ordenada. La apoptosis defectuosa no es crucial para iniciar la oncogénesis pero esto contribuye a la adquisición de resistencia a la quimioterapia y efectores inmunes (5).

Inhibidores endógenos importantes de MOMP son las proteínas anti-apoptóticas de linfoma de células B 2 (BCL2) familia, que incluye BCL2, BCL-X y leucemia de células mieloides secuencia1 (MCL1).

Las células tumorales pueden desarrollar resistencia a la lisis por linfocitos T citotóxicos específicos, son particularmente resistentes a los efectos transcripcionales inducidos por *IFN-γ*, incluyendo la expresión inducida por CD95 y la muerte inducida por CD95 (6).

Potencial de replicación ilimitado

La replicación ilimitada de las células requiere del mantenimiento de los extremos de los cromosomas, los cuales son conocidos como telómeros. La mayoría de las células malignas logran hacerlo a través de la expresión sobre-regulada de la enzima telomerasa, que añade repeticiones de hexanucleótidos a los extremos del ADN telomérico. Entre el 10-15% de células malignas pueden activar un mecanismo que se conoce como alargamiento alternativo de los telómeros, que parece mantener los telómeros a través de intercambios inter-cromosomales por recombinación de la secuencia. La *subunidad catalítica de la telomerasa humana TERT (telomerasa transcriptasa reversa)* es un antígeno tumoral que en pacientes con enfermedades malignas, - tales como cáncer de mama y leucemia mieloide crónica monta una respuesta inmune. En adición, para asegurar el potencial replicativo las células tumorales puede tener mutaciones o perder expresión de, proteínas que inducen senescencia, tales como p53 (la cual puede funcionar como antígeno tumoral) (7). En tumores que no expresan p53, la expresión del regulador de ciclo celular, ciclina B1 se incrementa. La ciclina B1 es un antígeno tumoral potencial, sin embargo, no se conocen efectos inmunomoduladores en cáncer, además de los antígenos específicos de tumores mencionados anteriormente que pueden provocar respuestas inmunes espontáneas.

Angiogénesis sostenida

Algunas células de tumor muestran alta expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y /o factor de crecimiento de fibroblasto 1 y 2 (FGF1 y

FGF2) que es su contraparte en los tejidos sanos. Estos factores son cruciales para mediar un cambio angiogénico del estado de quiescencia vascular. En adición a la promoción de la angiogénesis, VEGF puede inhibir la inmunidad antitumoral, ambos por la inhibición de la activación del factor nuclear κB (NF- κB) en las células dendríticas, previniendo su maduración y por supresión de la activación de las células T.

Invasión de Tejido y Metástasis

El asentamiento de células tumorales en lugares que son distantes del tumor primario –metástasis- es la causa del 90% de las muertes por cáncer, las células cancerosas se diseminan a sitios donde no son detectadas por el sistema inmune o donde el sistema inmune no es tan eficiente para eliminarlas. La invasión de sitios distantes por las células tumorales requiere alteraciones en las proteínas que están involucradas en la adhesión y uniones de las células a su entorno, así como en la secreción de proteasas.

La investigación oncológica se ha centrado en la búsqueda de los genes involucrados en las diversas etapas del cáncer. Los genes supresores inhiben el desarrollo de los tumores, mientras que los oncogenes y proto-oncogenes lo promueven (8); sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales operan aún no son bien entendidos, por lo que la búsqueda de nuevo conocimiento de procesos biológicos que regulen el crecimiento, la proliferación y la apoptosis es de vital importancia en el entendimiento del desarrollo del cáncer. El cáncer puede ser causado por agentes que dañan los genes involucrados en el control de la proliferación celular (proto-oncogenes), los cuales actúan en conjunto con agentes que potencian selectivamente el crecimiento de las células tumorales. El cáncer aparece cuando una sola célula acumula varias mutaciones, generalmente durante varios años, escapando de los procesos de control de la proliferación y muerte celular (9).

1.2 El cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es una enfermedad que se desarrolla a partir de células malignas en los tejidos de la mama. Una célula cancerosa de mama generalmente se duplica de 100-300 días (10). Una neoplasia de mama de 1 cm de diámetro realiza cerca de 30 duplicaciones antes de alcanzar este tamaño, por lo que este cáncer tiene aproximadamente siete años de evolución. Esta simple estimación sugiere la utilidad de la detección temprana, con métodos capaces de visualizar alteraciones (subclínicas) de tamaño inferior a 1 centímetro (11).

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común en el mundo y, el más frecuente entre las mujeres, con un estimado de 1,67 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2012 (25% de todos los cánceres). Es el cáncer más común en las mujeres, tanto en regiones desarrolladas como en regiones menos desarrolladas, con poco más casos en los países menos desarrollados (883.000 casos) que en los más desarrollados (794.000). La tasa de incidencia varía del 27/100000 habitantes en África Media y Asia del Este a 96/100000 en Europa Occidental (Tabla 1).

En la tabla 1 se observa que aunque en los países más desarrollados el número de casos nuevos es ligeramente mayor que en los países pobres, el número de muertes es mayor en estos últimos, lo cual se ve reflejado por el estilo de vida, patrones reproductivos, la cultura y la sociedad quienes pueden contribuir a los factores de riesgo. El sesgo en los diferentes métodos de detección y registro de cada país puede influir en los datos de la incidencia. El acceso a procedimientos eficaces de detección y tratamiento presentes en los países industrializados genera una reducción en la mortalidad (12).

El cáncer de mama se ubica como la quinta causa de muerte por cáncer en general (522.000 muertes) y la causa más frecuente de muerte por cáncer en las mujeres en regiones en desarrollo (324.000 muertes, el 14,3% del total), y la segunda causa de muerte por cáncer en las regiones más desarrolladas (198.000 muertes, 15,4%) después del cáncer de pulmón. El rango de las tasas de mortalidad entre las regiones del mundo es menor que el de incidencia debido a la

supervivencia más favorable en regiones desarrolladas, con tasas que van del 6/100000 en Asia del Este a 20/100000 en África occidental (1).

El panorama epidemiológico de esta patología en la población mexicana se transformó en los últimos 50 años y ha pasado a ser un problema de salud pública. Sus principales factores de riesgo están asociados a múltiples factores entre ellos la exposición prolongada a estrógenos, los cuales son indicadores de estilos de vida y patrones reproductivos y por tanto resultan difíciles de modificar. La OMS recomienda que en países de altos ingresos, las campañas de prevención se enfoquen a la realización de mastografías, y en los de bajos y medios ingresos, en el uso de la autoexploración como técnica de detección de lesiones palpables (OMS, 2012). En México, la auto-detección es alta pero sólo entre el 5 y 10% de los tumores son identificados en estadio I (13).

El éxito en la autoexploración tiene que ver con que sea adecuada, rutinaria y se acuda al médico ante cualquier síntoma. Para reducir la mortalidad se requiere, entonces mejorar la detección temprana y las estrategias de tratamiento (14). La Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011 para la Prevención, Diagnóstico, Tratamiento, Control y Vigilancia Epidemiológica del Cáncer de mama, indica que la población de 20 años y más debe realizarse la autoexploración; a partir de los 25 años una exploración clínica anual realizada por un profesional de la salud (médico o enfermera capacitados); de los 40 a 69 años una mastografía cada dos años; y en las de 70 años y más, mastografías de seguimiento en las mujeres con antecedentes de cáncer de mama o bien por indicación médica (Diario Oficial de la Federación, 2011). En nuestro país, a partir del 2006 la mortalidad por cáncer de mama superó a la de cáncer cervicouterino (CaCu) como principal causa de muerte por tumores malignos; asimismo, se ha colocado como segunda causa de muerte en mujeres de 30 a 54 años, solo detrás de la diabetes mellitus (Figura 1) (1, 5, 9). Bajo estas perspectivas, el diagnóstico molecular temprano sería de gran ayuda debido a que se podría detectar el cáncer antes de que el tumor sea visible y aparezcan metástasis en tejidos cercanos, mejorando el pronóstico y sobrevida durante y después del tratamiento (11).

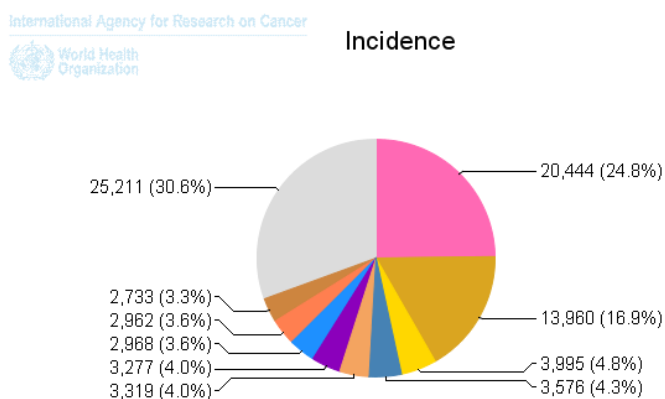
En la tabla 1 se observa que aunque en los países más desarrollados el número de casos nuevos es ligeramente mayor que en los países subdesarrollados, el número de muertes es mayor en estos últimos, lo cual se ve reflejado por el estilo de vida, patrones reproductivos, la cultura y la sociedad quienes pueden contribuir a los factores de riesgo. El sesgo en los diferentes métodos de detección y registro de cada país puede influir en los datos de la incidencia. El acceso a procedimientos eficaces de detección y tratamiento presentes en los países industrializados genera una reducción en la mortalidad (14).

Tabla 1. Número de nuevos casos y muertes en el mundo y en México por cáncer de mama en mujeres. GLOBOCAN 2012 (1).

Región o País	Nuevos casos	Muertes	Tasa ASR de Morbilidad	Tasa ASR de Mortalidad
Mundial	1676633	521907	43.3	12.9
Más desarrollados	793684	197618	74.1	14.9
Menos desarrollados	882949	324289	27.1	11.5
México	20444	5680	35.3	9.7

La tasa ASR es por 100,000 mujeres. ASR. Tasa Estandarizada por Edad.

A



B

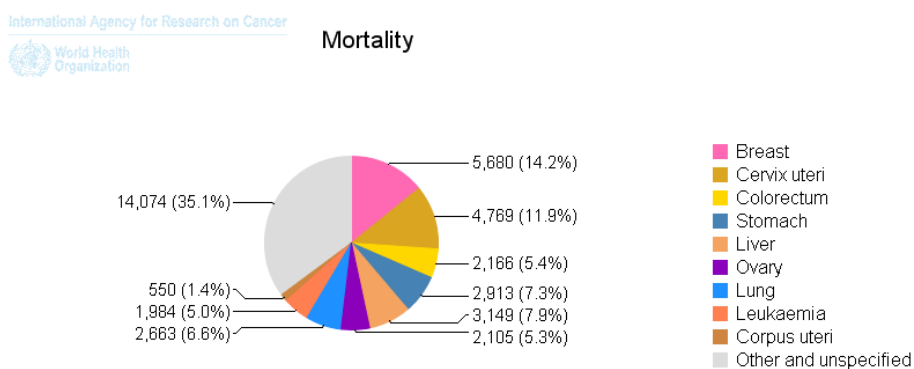


FIGURA 1. Incidencia y Mortalidad de Cáncer en población femenina mexicana en 2012.

(A) Diagrama que muestra que la incidencia del cáncer de mama (en rosa) con un porcentaje del 24.8% mayor al de cáncer cervicouterino del 16.9%. (B). Diagrama que muestra la mortalidad de cáncer en mujeres en México siendo mayor el cáncer de mama (5680 casos*) y en segundo lugar el cervico uterino (4769

casos*) y en tercer lugar el de hígado con 3149 casos*. * Por 100,000 mujeres. GLOBOCAN 2012 (1).

1.3 Factores de Riesgo

Por estudios epidemiológicos se han identificado una serie de factores que podrían aumentar el riesgo de padecer cáncer de mama y otros factores que por el contrario son protectores.

Edad. La incidencia de cáncer de mama se incrementa con la edad, duplicándose cada 10 años hasta la menopausia, etapa en que el ritmo de crecimiento celular disminuye y se presentan cambios hormonales. Aunque actualmente se ha documentado el aumento en la incidencia en mujeres entre 20 y 30 años. En el 46% de las mujeres mexicanas con cáncer de mama, se presenta entre los 40-49 años, lo cual es contrario con lo observado en los Estados Unidos, donde la edad media de aparición del cáncer de mama es de 63 años.

Menstruación. Cuanto más tarde se presente la primera menstruación, más bajo será el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Las mujeres que comenzaron a menstruar antes de los 12 años tienen un riesgo relativo mayor comparado con mujeres que comenzaron después de los 15 años. Se considera como edad temprana de menstruación si ésta ocurre antes de los doce años, y menopausia tardía si ésta sucede después de los 55 años (15).

Menopausia. Las mujeres que experimentan la menopausia en edades avanzadas están en mayor riesgo de presentar cáncer de mama. Las mujeres que entran en la menopausia hasta los 55 años o después muestran un riesgo relativo mayor comparadas con aquellas que la experimentan antes de los 45 años (15).

Edad y número de alumbramientos. La edad avanzada en que una mujer da a luz a su primer hijo se considera un factor de riesgo. Esto es considerado a partir de los 34 años. El efecto de un nacimiento es protector contra la enfermedad. Comparado con las mujeres nulíparas, las mujeres que han tenido al menos un embarazo a término promedian un 25% de reducción en el riesgo de padecer

cáncer de mama, lo cual se ve incrementado con un mayor número de embarazos a término. Una mujer con cinco o más niños tiene aproximadamente la mitad de riesgo que una mujer nulípara (15).

Historia Familiar. Los estudios sobre riesgo familiar en cáncer de mama muestran que existe cerca del doble de riesgo para parientes de primer grado (madres, hermanas e hijas) con pacientes afectados. Parientes de segundo grado afectados (abuelas, tías, etc.) indican un riesgo menor (15).

Alteraciones genéticas. Hasta el momento se han descrito alteraciones en la secuencia y expresión de genes que participan en la reparación del DNA, control del ciclo celular, proliferación y apoptosis. Estos incluyen genes tales como *BRCA1*, *BRCA2*, *P53*, *PTEN*, *HER2/neu*, *ATM*, *NM23*, *receptor de estrógenos* y *progesterona* entre otros. Las mutaciones en *BCRA1* y *BCRA2* pueden provocar aumento en el riesgo de CÁNCER DE MAMA hereditario, así como cáncer de ovario (15).

Alcohol y Tabaquismo. El consumo de alcohol y tabaco parecen estar asociado con un incremento moderado en el riesgo de desarrollar cáncer de mama (10).

Exceso de peso. Se ha estimado que un aumento en el índice de masa corporal aumenta el riesgo de cáncer de mama. En mujeres postmenopausicas, la obesidad incrementa el riesgo de cáncer de mama hasta en un 50% en comparación con mujeres delgadas (15).

1.4 Clasificación

El carcinoma de mama representa un grupo de tumores que muestra un comportamiento biológico muy diverso y una gran variabilidad clínica.

El avance de las tecnologías de análisis genómico ha permitido clasificar los carcinomas de mama en cinco subtipos: luminal A y B, HER2-positivo, basal y similar a la mama normal (16). Los carcinomas de mama de tipo luminal son los subtipos con mejor pronóstico y se caracterizan por expresar el gen del receptor estrogénico, genes asociados (*LIV1* y *ciclína D1*) y queratinas de bajo peso

molecular (CK7, CK8, CK18, etc.), de forma semejante al epitelio luminal de los conductos mamarios. Al expresar receptores de estrógenos (RE), estos tumores pueden tratarse con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa pero muestran una baja respuesta a la quimioterapia neoadyuvante (17). El carcinoma de mama HER2-positivo muestra expresión aumentada de genes asociados a c-erbB-2 y suele asociarse a otros marcadores de mal pronóstico, incluyendo alteraciones de otros genes como topoisomerasa II alfa, GATA4, genes de angiogénesis y proteólisis. Aunque muestran una mejor respuesta a la quimioterapia y cerca de 50% responde al tratamiento con trastuzumab, el pronóstico es malo. El subtipo basal se caracteriza por la sobreexpresión de citoqueratinas características de la capa basal (CK5/6, CK17) y la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Estos tumores suelen presentar mutaciones en el gen oncosupresor p53, sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y se caracterizan por la ausencia de expresión de RE, receptor de progesterona (RP) y de HER2. Este subtipo se asocia a la mutación BRCA1 y presenta el comportamiento más agresivo a pesar de su alta sensibilidad a la quimioterapia. El carcinoma de mama de tipo normal comparte características del tejido mamario normal, muestra una fuerte expresión de genes normalmente expresados en el tejido adiposo y baja expresión de genes epiteliales luminales (1,19).

Otro marcador extensamente evaluado y con un mayor empleo es el Ki-67, una proteína nuclear que indica proliferación celular. Adicionalmente a su capacidad para identificar tumores más agresivos, Ki-67 puede discriminar entre tumores luminal A y luminal B. (20).

La descripción descrita anteriormente se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Subtipos de marcadores biológicos.

Subtipo	RE	RP	HER2/neu	Índice de proliferación Ki-67
Luminal A	+	y/o +	-	Bajo (<14%)
Luminal B	+	y/o +	-	Alto (> 14%)
HER2/neu	-	-	+	Alto
Basal	-	-	-	

1.5 Estadíos

Después de que se diagnostica el cáncer de mama, se realizan pruebas para determinar si las células cancerosas se diseminaron dentro de la mama o hasta otras partes del cuerpo, este proceso se llama estradificación. La información que se obtiene en el proceso de estradificación determina el estadio de la enfermedad. Es importante conocer el estadio a fin de planificar el tratamiento. Para el proceso de estadiaje, se pueden utilizar las siguientes pruebas y procedimientos:

Biopsia de ganglio linfático centinela: extracción del ganglio linfático centinela durante una cirugía. El ganglio linfático centinela es el primer ganglio linfático que recibe el drenaje linfático de un tumor es además el primer ganglio linfático donde es posible que el cáncer se disemine desde el tumor. Se inyecta una sustancia radiactiva o un tinte azul cerca del tumor. La sustancia o el tinte fluye a través de los conductos linfáticos hasta los ganglios linfáticos. Se extrae el primer ganglio que recibe la sustancia o el tinte. Un patólogo observa el tejido al microscopio para verificar si hay células cancerosas. Cuando no se detectan células cancerosas, puede no ser necesario extraer más ganglios linfáticos.

Radiografía del tórax: radiografía de los órganos y huesos del interior del pecho. Un rayo X es un tipo de haz de energía que puede atravesar el cuerpo y plasmarse en una película que muestra una imagen de áreas internas del cuerpo.

Exploración por TC (exploración por TAC): procedimiento mediante el que se toma una serie de imágenes detalladas del interior del cuerpo, desde ángulos diferentes. Las imágenes son creadas por una computadora conectada a una máquina de rayos X. Se inyecta un tinte en una vena o se ingiere, a fin de que los órganos o los tejidos se destaquen de forma más clara. Este procedimiento también se llama tomografía computada, tomografía computarizada o tomografía axial computarizada.

Exploración ósea: procedimiento que se utiliza para verificar si hay células en los huesos que se multiplican rápidamente, como las células cancerosas. Se inyecta

una cantidad muy pequeña de material radiactivo en una vena y este recorre todo el torrente sanguíneo. Cuando el material radiactivo se acumula en los huesos, se puede detectar con un escáner.

Exploración con TEP (**exploración con tomografía por emisión de positrones**): procedimiento para encontrar células de tumores malignos en el cuerpo. Se inyecta en una vena una cantidad pequeña glucosa (azúcar) radiactiva. El explorador por TEP rota alrededor del cuerpo y toma una imagen de los lugares del cuerpo que absorben la glucosa. Las células de tumores malignos tienen aspecto más brillante en la imagen porque son más activas y absorben más glucosa que las células normales.

El cáncer se puede diseminar a través del tejido, el sistema linfático y la sangre.

Cuando el cáncer se disemina a otra parte del cuerpo, se llama metástasis.

Las células cancerosas se desprenden de donde se originaron (tumor primario) y se desplazan a través del sistema linfático o la sangre.

La herramienta que se usa con mayor frecuencia para describir el estadio es el sistema TNM. TNM es la abreviatura en inglés de tumor (T), ganglio (N) y metástasis (M). Los médicos examinan estos tres factores para determinar el estadio del cáncer y se denominan: Estadío 0 (carcinoma in situ), estadío I, estadío II, estadío III y estadío IV .Tabla 3 (21).

Tabla 3. Clasificación TNM.

Estadío	Tumor	Nódulos	Metástasis
0	<i>In situ</i>	No	No
I	≤ 2 cm	No	No
IIA	≤ 2 cm	Si	No
	2 y 5 cm	No	No
IIB	2 y 5 cm	Si	No
	> 5 cm	No	No
IIIA	2 y 5 cm	Si, axilares	No
	> 5 cm	Si	No
IIIB	Cualquiera	Si, tórax	No
IV	Cualquiera	Si	Si

1.6 Costo de la atención medica del cáncer de mama en México

Estudios realizados señalan que la detección temprana y oportuna es la alternativa más efectiva en términos del costo de atención del cáncer de mama. Además de generar un ahorro de recursos en la atención, la detección temprana permite aumentar la sobrevida de las pacientes y mejorar su calidad de vida (22). Los avances en el conocimiento sobre la enfermedad, la tecnología médica y la actual disponibilidad de tratamientos han logrado mejorías en la sobrevida y la calidad de vida de las pacientes con cáncer mamario. Sin embargo, también han elevado considerablemente el costo por unidad de mejoría en el nivel de salud (año de vida ganado, año de vida ajustado por calidad, etc.). El aumento del número de casos y la detección temprana, supone notorios aumentos de la carga económica para el sistema de salud mexicano y un desafío para la estabilidad económica de las pacientes y sus hogares (23).

Un reporte reciente muestra el costo de atención de las pacientes con cáncer de mama en México en el sistema de atención del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en un grupo de mujeres diagnosticadas en 2002, y seguidas hasta 2006, (24). Con un total de 1,904 casos, 13.8% se diagnosticó en la etapa I generando un costo de atención promedio por año-paciente de 74,522 pesos; 39.6% en la II y costo de 102,042 pesos; 33.9% en la III cuyo costo fue 154,018 pesos y el restante 12.7% en la IV elevándose el costo del tratamiento a 199,274 pesos. El cáncer mamario representa un presupuesto significativo en el IMSS y en las demás Instituciones de salud. Entre más tardía es la etapa de detección, más altos resultan los costos económicos por año-paciente y más baja la probabilidad de sobrevida (18). En nuestro país se tiene la infraestructura y los recursos médicos para el óptimo tratamiento, pero los costos son altos debido al diagnóstico tardío, (más de 80% de los casos de cáncer de mama se identifica en etapas avanzadas de la enfermedad). La detección oportuna del cáncer de mama

es una prioridad para el óptimo control de esta enfermedad (19). Es por ello la importancia del desarrollo de nuevas tecnologías, metodologías y pruebas clínicas/moleculares con valor diagnóstico o pronóstico en el paciente en cáncer de mama. La investigación e implementación de nuevas pruebas moleculares diagnósticas representan un coadyuvante de gran valor clínico que se sumaría a las pruebas diagnósticas actuales de cáncer de mama como son la mamografía, el análisis histopatológico de biopsias tumorales y las pruebas genéticas en el caso del cáncer de mama hereditario (25).

2. Antecedentes particulares del proyecto

Desde hace décadas se sabe que los pacientes con cáncer presentan auto-anticuerpos séricos dirigidos contra un grupo de proteínas derivadas de los tumores conocidas como antígenos asociados a tumores (AAT's). Los auto anticuerpos asociados a tumores muestran propiedades interesantes. Ellos son fácilmente accesibles en muestras de sangre y su tiempo de vida medio es largo, lo cual confiere ventajas sobre otras proteínas biomarcadoras empleadas comúnmente. Además, la naturaleza de una respuesta de amplificación anticuerpo a un antígeno significa que incluso una cantidad relativamente pequeña de antígeno en la etapa temprana de la tumorigénesis puede desencadenar una respuesta inmune grande (26). Los auto-anticuerpos asociados a tumores pueden considerarse reporteros del sistema inmune, que permiten identificar los cambios antigénicos en las proteínas celulares involucradas en el proceso de tumorigénesis (27). Lo que se ha observado en el lupus y otras enfermedades autoinmunes es que cada trastorno tiene un perfil de auto anticuerpos característicos, aunque hay otros auto-anticuerpos que son compartidos (28). Al parecer, esta situación también se observa en el cáncer, y hay perfiles de auto anticuerpos únicos para un determinado tipo de cáncer y otros que son compartidos entre muchos tipos de cáncer. Estos perfiles de auto anticuerpos pueden ser utilizados como marcadores de diagnóstico para la diferenciación del cáncer (29). Los auto-anticuerpos asociados a tumores son de fácil acceso en muestras de sangre y tienen una vida media larga que confieren ventajas sobre otras proteínas

biomarcadoras utilizados en la actualidad. Una de ellas es el incremento en el título de anticuerpos en respuesta al antígeno, significa que incluso una cantidad relativamente pequeña de antígeno en la fase temprana de la tumorigénesis puede desencadenar una respuesta inmune más grande, lo que hace que sea útil como un marcador de diagnóstico precoz (30).

De manera importante se ha observado que los AATs se encuentran ausentes o en muy bajas cantidades en los individuos sanos o que padecen alguna condición no relacionada al cáncer. En consecuencia, existe un creciente interés en la comunidad médica en utilizar a los auto-anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con cáncer como una herramienta inmunodiagnóstica barata, sencilla y no invasiva. Sin embargo, es importante tener en cuenta que no todos los auto-anticuerpos detectados en pacientes con cáncer corresponden a AATs. Las deficiencias en el reconocimiento de auto anticuerpos en el estado pre-maligno del tumor puede resultar en la inclusión de antígenos erróneos como AATs. Las ventajas de utilizar los auto-anticuerpos dirigidos contra los AATs como marcadores de la enfermedad radican en que son muy estables en sueros y pueden persistir largos periodos de tiempo. Además la disponibilidad de métodos diagnósticos basado en pruebas de rutina para detectar los auto anticuerpos en sueros de pacientes, facilita su detección y caracterización lo que permite vislumbrar el desarrollo de pruebas y kits diagnósticos sencillos.

Fernández Madrid y cols. (31) hipotetizaron que un biomarcador para el diagnóstico temprano de cáncer debe estar presente en las primeras etapas de la carcinogénesis, esto debido a que probablemente refleja cambios moleculares en las vías de transducción de señales responsables del desarrollo del cáncer (31). Otros estudios en cáncer de mama reportan una alta incidencia y títulos elevados de anticuerpos dirigidos contra las oncoproteínas HER2 y MUC1 en etapas tempranas de la enfermedad (32, 33). La expresión de HER2/neu se relaciona con características clínico-patológicas de la enfermedad, incluyendo el tamaño tumoral, ganglionar y el estado de la menopausia, el estrógeno y los receptores de progesterona (34).

2.1 Anticuerpos

Un anticuerpo se define como una inmunoglobulina (Ig) capaz de una combinación específica con el antígeno que ha causado su producción en un animal susceptible. Ellos son producidos en respuesta a la invasión de moléculas foráneas en el cuerpo. Los anticuerpos existen como una o más unidades en forma de Y, compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas. Cada Y contiene dos copias idénticas de una cadena pesada (HC, heavy chain), y dos copias idénticas entre sí de una cadena ligera (LC, light chain), llamadas así por sus pesos moleculares relativos que son de aproximadamente 50kDa la cadena pesada y de cerca de 25kDa la cadena ligera. Estas cadenas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuros intercatenarios. Estas cadenas pueden separarse por reducción de los enlaces S-S y acidificación (Figura 2).

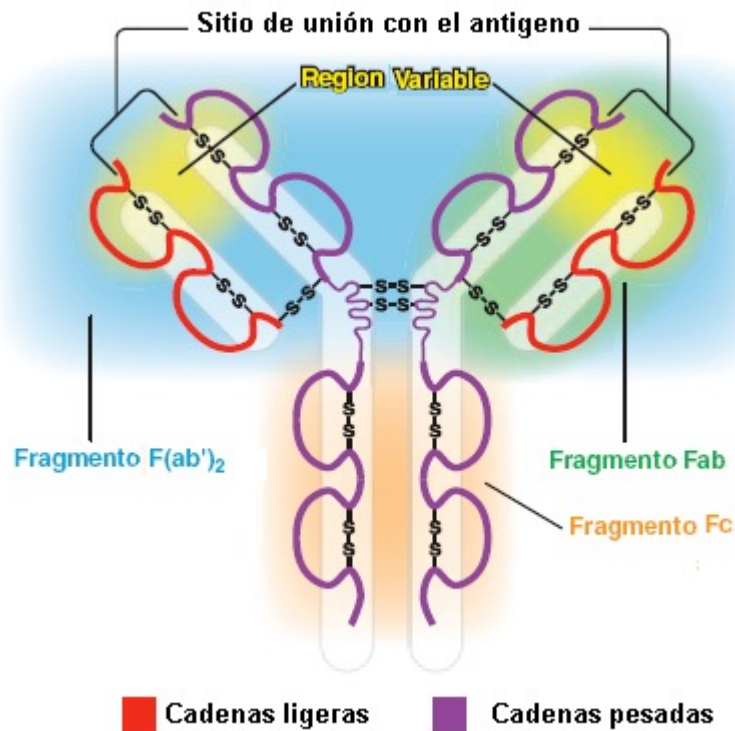


Figura 2. Estructura de un anticuerpo. La forma clásica de “Y” está compuesta de 4 cadenas polipeptídicas. Dos copias idénticas de una cadena pesada y dos copias idénticas de una cadena ligera. Esta unidad monomérica en forma de Y está compuesta de dos regiones variables integradas tanto por las cadenas ligeras como por las pesadas y son específicas para la interacción con el antígeno (región FAb). El resto se denomina fragmento Fc (cristalizable) y es constante.

Los anticuerpos pueden ser divididos en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, basado en el número de unidades y en el tipo de cadena pesada. Las cadenas pesadas de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, son conocidas como *gamma*, *mu*, *alpha*, *delta* y *epsilon* (γ , μ , α , δ y ϵ), respectivamente.

El anticuerpo más comúnmente usado en ensayos inmunoquímicos es el de la clase IgG debido a que de manera general, son las inmunoglobulinas más abundantes en la respuesta a antígeno. La región bisagra expuesta tiene una estructura extendida debido al alto contenido de prolina, por lo que es vulnerable al ataque proteolítico; en consecuencia, es muy fácil escindir la molécula en el laboratorio mediante papaína, para obtener dos fragmentos Fab un tercer fragmento, Fc, que carece de capacidad para fijar el antígeno. La pepsina ataca en otro punto y escinde el Fc del resto de la molécula, para separar un fragmento 5S de gran tamaño que se designó F(ab')₂, dado que se mantiene divalente con respecto a la fijación al antígeno, al igual que el anticuerpo original (Figura 3). La región entre los fragmentos Fab y Fc es a la que se le llama bisagra. Este segmento le permite movimiento lateral y rotacional de los dos dominios que se unen al antígeno. Una cadena ligera asociada con la región amino-terminal de una cadena pesada forman un domino de unión al antígeno.

La clásica forma Y de un IgG está compuesta de dos variables: brazos antígeno específico F(ab), los cuales son críticos para la unión del antígeno, y la “cola” constante Fc que sirve como “mango” para la manipulación del anticuerpo y anclarlo a platos en ensayos de ELISA.

El número de regiones Fab en un anticuerpo, corresponde con su subclase, y determina la valencia del anticuerpo (el número de brazos con el que el anticuerpo puede unirse al antígeno).

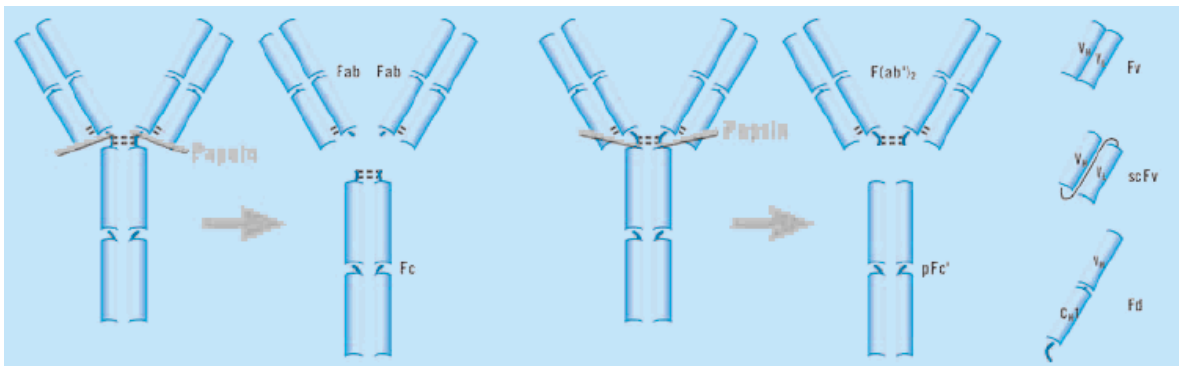


Figura 3. Fragmentos de anticuerpos creados por diferentes enzimas

2.2 Antígenos

El principio básico de cualquier técnica inmunoquímica es el de que un anticuerpo específico se unirá con un antígeno específico para dar un complejo anticuerpo-antígeno exclusivo.

La definición clásica de antígeno es cualquier sustancia externa que estimula una respuesta inmune cuando éste ingresa a un organismo susceptible. Los antígenos son generalmente de alto peso molecular y comúnmente son proteínas o polisacáridos. Polipéptidos, lípidos, ácidos nucleicos y otras moléculas pueden también funcionar como antígenos. Una variedad de moléculas como drogas, azúcares simples, aminoácidos, pequeños péptidos, fosfolípidos o triglicéridos pueden funcionar como haptenos. De tal manera que de ser necesario, cualquier sustancia extraña podrá ser identificada por el sistema inmune estimulará la producción de anticuerpos específicos. Sin embargo, esta respuesta inmune específica es altamente variable y depende del tamaño, estructura y composición de los antígenos. Los antígenos que estimulan una fuerte respuesta inmune se dice que son altamente inmunogénicos.

Las partes de las regiones hipervariables del anticuerpo que interaccionan con el antígeno se denominan parátomos y la región de un antígeno que puede específicamente unirse a un anticuerpo es llamado epítome. Un epítome no tiene una propiedad intrínseca de alguna estructura particular. Estos son usualmente 5-12 residuos de aminoácidos que se encuentran en el antígeno. El epítome reconocido por un anticuerpo puede depender de la presencia de una conformación específica tridimensional del antígeno (por ejemplo, un sitio único formado por la interacción de dos asas o subunidades de una proteína nativa) o el epítome puede corresponder a una región de una secuencia primaria simple, así, los epítomes son descritos como conformacionales y lineares, respectivamente. El rango de posibles sitios de unión es enorme, ya que cada sitio de unión tiene sus propias propiedades estructurales derivadas de enlaces covalentes, iónicos e interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas. Para que exista una eficiente interacción entre el antígeno y el anticuerpo, el epítome debe estar fácilmente disponible para

la unión. Si la molécula blanco es desnaturalizada, por ejemplo, por la fijación, cambios de pH o durante la preparación en un gel de electrofóresis, el epítipo puede ser alterado y esto puede afectar su habilidad para interactuar con un anticuerpo. Por ejemplo, algunos anticuerpos no son efectivos en un Western blot pero pueden interaccionar muy bien en inmunohistoquímica debido a que en el proceso, un complejo sitio antigénico puede ser mantenido en el tejido, mientras que en el otro procedimiento la preparación de la muestra altera la conformación de la proteína lo suficiente para destruir el sitio antigénico y así elimina el sitio de unión con el anticuerpo (35-36). Estos aspectos deben ser tomados en cuenta al elegir o desarrollar métodos de interacción Antígeno-Anticuerpo.

2.3 Interacción antígeno-anticuerpo.

Los antígenos y anticuerpos interaccionan mediante la suma de fuerzas débiles como los puentes de hidrogeno, las interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y las fuerzas de van der Waals. No obstante, la interacción antígeno-anticuerpo puede ser fuerte y estable. Al igual que los anticuerpos, los antígenos pueden ser multivalentes, ambos a través de múltiples copias del mismo epítipo, o a través de la presencia de múltiples epítopes que son reconocidos por múltiples anticuerpos. Las interacciones que involucran multivalencias pueden producir mayor estabilidad a los complejos, sin embargo la multivalencia puede también resultar en dificultades estéricas, reduciendo por lo tanto la posibilidad de unión.

La afinidad se refiere a la fuerza de interacción entre anticuerpo y antígeno en un solo sitio antigénico. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del anticuerpo interactúa a través de fuerzas débiles no covalentes con el antígeno en numerosos sitios. Por otro lado, la avidéz es la fuerza con la que el Ac multivalente se une a un Ag multivalente. Aunque depende de las afinidades individuales de cada uno de los determinantes individuales de ese antígeno, su valor es mucho mayor que la suma de afinidades.

Pero por otro lado, hay que considerar que los Ag suelen tener más de un tipo de determinante antigénico. Cuando un antígeno de este tipo entra en un individuo, éste produce un antisuero, que presenta varios tipos de anticuerpos, cada uno de ellos dirigidos a un tipo diferente de determinante antigénico del Ag original. En este caso se habla de avidez del antisuero, que es la fuerza conjunta de los distintos anticuerpos de ese antisuero que reconocen al antígeno multivalente complejo.

Los factores que contribuyen a la avidez del antisuero son complejos, pero uno muy interesante es el derivado de la multivalencia del antígeno. La fuerza de unión de un antígeno complejo multivalente a varios tipos de Ac es mucho mayor que la suma aritmética de las fuerzas de unión de cada anticuerpo: La avidez refleja mejor la situación fisiológica, pero la afinidad nos caracteriza lo que ocurre con cada tipo de anticuerpo concreto en su interacción con el epítipo.

La avidez es quizá una medida más informativa de toda la estabilidad o la fuerza del complejo antígeno-anticuerpo. Esto es controlado por tres factores: la afinidad paratopo-epítipo; las valencias de ambos, antígeno y anticuerpo; y el arreglo estructural de las partes que interactúan (37).

Anticuerpos monoclonales y policlonales.

Una característica de grandes moléculas antigénicas es que inducen la activación de diferentes clonas de linfocitos B productores de anticuerpos en el animal inmunizado. Esto genera una mezcla de anticuerpos policlonales resultantes pueden reconocer una variedad de epítopes sobre el antígeno, el cual puede ser una característica de uso especial en algunos procedimientos experimentales (figura 4). Debido a que esta mezcla de anticuerpos policlonales reacciona con múltiples epítopes sobre la superficie del antígeno, ellos pueden ser más tolerantes de cambios menores en el antígeno, por ejemplo, polimorfismo, heterogeneidad de glicosilación o ligera desnaturalización, que los anticuerpos monoclonales (homogéneos).

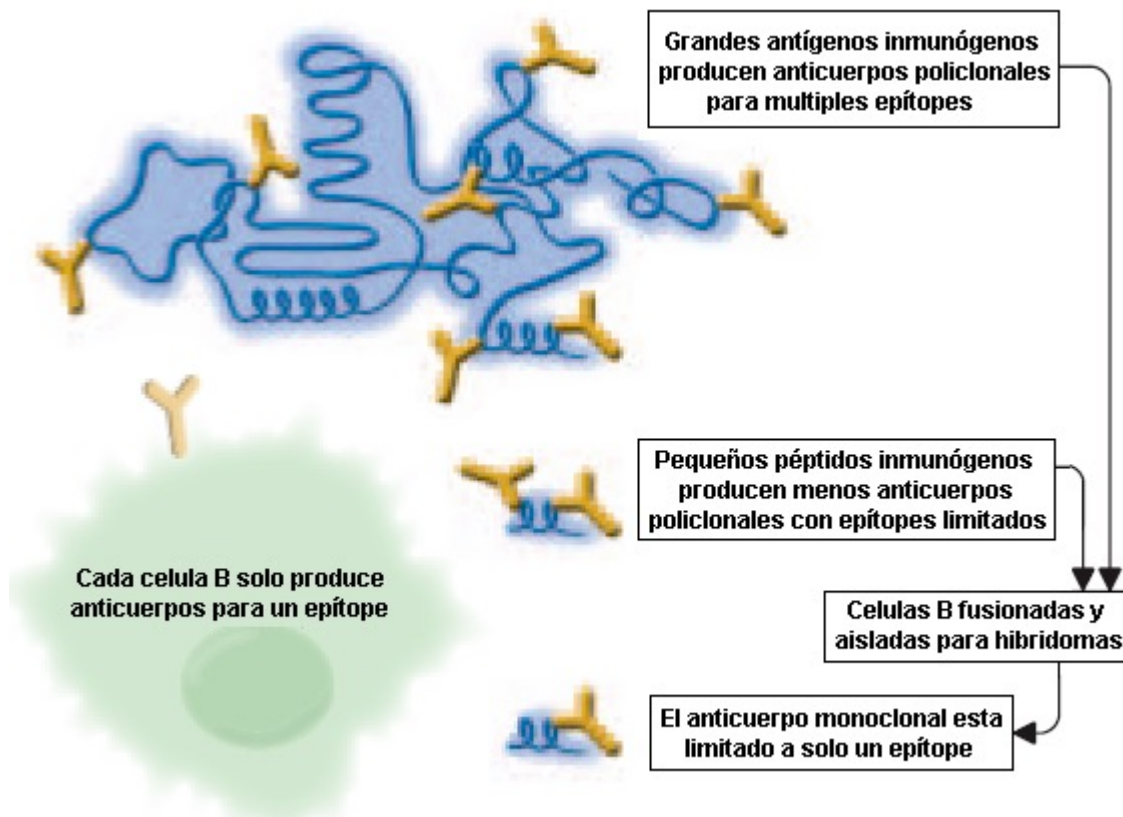


Figura 4. Anticuerpos policlones y monoclonales.

Una población homogénea de anticuerpos (anticuerpos monoclonales) puede ser generada por la fusión de linfocitos B con cultivos de células inmortales para producir hibridomas. Los hibridomas producen muchas copias del mismo anticuerpo. Este fenómeno ha sido fundamental en el desarrollo de anticuerpos con aplicaciones de diagnóstico. Debido a que los anticuerpos monoclonales reaccionan con un epítipo específico del antígeno, estos son más vulnerables a la pérdida del epítipo a través de tratamientos químicos del antígeno que los anticuerpos policlonales. Esto puede ser compensado por el uso de dos o más anticuerpos monoclonales del mismo antígeno.

Algunas de las propiedades de anticuerpos policlonales son:

Los anticuerpos policlonales frecuentemente reconocen múltiples epítopes haciéndolos más tolerantes a pequeños cambios en la naturaleza del antígeno. Son frecuentemente la opción preferida para la detección de proteínas desnaturalizadas.

Pueden ser generados en una variedad de especies, incluyendo el humano, conejos, cabras, ovejas, asnos, gallinas y otros, dándole al usuario muchas opciones en el diseño experimental.

Los anticuerpos policlonales son a veces usados cuando la naturaleza del antígeno en una especie no estudiada no se conoce.

Los anticuerpos policlonales se unen a múltiples epítopes y así ellos generalmente proveen una detección más robusta.

Algunos usos y propiedades de anticuerpos monoclonales son:

Debido a su especificidad, los anticuerpos monoclonales son excelentes como anticuerpos primarios en un ensayo, o para detectar antígenos en un tejido y frecuentemente dan significativamente menos tinción de fondo que los anticuerpos policlonales.

Cuando se compara con los anticuerpos policlonales, la homogeneidad de los anticuerpos monoclonales es muy alta. Si las condiciones experimentales se mantienen constantes, los resultados provenientes de anticuerpos monoclonales son altamente reproducibles entre experimentos.

La especificidad de los anticuerpos monoclonales los hacen extremadamente eficientes para la unión al antígeno dentro de una mezcla de moléculas relacionadas, como para el caso de la purificación por afinidad (38,39).

2.5 Técnicas inmunoquímicas

Dado que los antígenos y anticuerpos se definen por sus interacciones mutuas, uno de ellos puede utilizarse para cuantificar al otro. Si disponemos de una solución de un anticuerpo monoclonal, podemos definir su afinidad y especificidad con considerable confiabilidad y, si está en estado puro y en su conformación nativa, conoceremos que la concentración de anticuerpos es la misma que la de la inmunoglobulina, en mg/ml u otra unidad. Cuando se determina el contenido de anticuerpos en un antisuero, el problema es diferente debido a que la fracción inmunoglobulina está compuesta de una serie enorme de moléculas en cantidades y afinidades variables.

Los sueros pueden compararse de acuerdo con su contenido de anticuerpos, ya sea por la determinación de cuantos anticuerpos se unen al antígeno en una dilución fija del suero o por la comprobación de una dilución seriada del suero para comprobar a que nivel una cantidad estándar de antígeno es suficiente para dar un resultado positivo de la unión. Éste es denominado título de anticuerpos. Para tomar un ejemplo, un suero podría diluirse, digamos, 10,000 veces y aun dar una prueba de aglutinación positiva. Este título de 1:10,000 permite realizar una comparación con otro suero mucho “más débil” que solo posea un título, digamos 1:100. El título de un suero dado variará de acuerdo con la sensibilidad de la prueba, ya que se necesitan cantidades mucho más pequeñas de anticuerpos para unirse al antígeno cuando la prueba posee una alta sensibilidad, como la aglutinación, que en el caso de una prueba de baja sensibilidad, como la precipitación, la cual requiere concentraciones altas del producto antígeno-anticuerpo.

Existen diversos métodos basados en procedimientos distintos para visualizar la interacción Ag-Ac (Tabla 4).

Tabla 4. Principales métodos analíticos basados en la interacción Ag-Ac.

Trazador	Denominación
Complejo Ag-Ac	Técnicas de inmunoprecipitación (técnica de Ouchterlony, Inmunoelectroforesis, difusión radial Mancini, nefelometría, etc.)
Aglutinación	Técnicas de inmunoaglutinación. (Hemaglutinación directa e indirecta y otras técnicas con látex, etc.
Fluorocromo	Técnicas inmunofluorimétricas usadas principalmente en citometría de flujo.
Radioisótopos	Técnicas inmunorradiológicas (Radioinmunoensayo -RIA-)
Enzimas	Técnicas inmunoenzimáticas como ensayos de ELISA y Western blot.

Así tenemos:

1. Técnicas de aglutinación. Cuando el antígeno se encuentra unido o formando parte de células, bacterias o partículas, la reacción Ag-Ac se puede detectar y cuantificar por el aglutinado celular o bacteriano formado.
2. Técnicas de fluorescencia y citometría de flujo. Para la realización de estas técnicas el anticuerpo se marca con un fluorocromo detectándose la formación del complejo Ag-Ac por la fluorescencia emitida.
3. Técnicas de radioinmunoensayo. En estas técnicas al anticuerpo se une un isótopo radiactivo siendo posible la cuantificación del complejo Ag-Ac a través de la radiactividad emitida.
4. Inmunoprecipitación e inmunoblotting. Permite detectar la presencia y cantidad de antígenos y anticuerpos específicos.

2.6 Técnica de enzimoimmunoensayo.

Dada la importancia de esta técnica en el presente estudio, se describe con mayor detalle. Es conocida también como ensayo de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). La identificación de los complejos Ag-Ac, se hace mediante el empleo de enzimas, usualmente acopladas al anticuerpo. El ensayo de ELISA puede ser directo o no competitivo, constando de manera general de los siguientes pasos:

- a) Se sensibiliza la placa con el anticuerpo específico frente al antígeno a determinar.
- b) Se añade la muestra con el antígeno.
- c) Se adiciona el anticuerpo secundario marcado con la enzima que en presencia de su sustrato da un producto coloreado soluble, este producto es cuantificado mediante el lector de ELISA (figura 5),

e indirecto o competitivo, se diferencia del caso anterior en que se añaden los anticuerpos, previamente incubados con la muestra, los anticuerpos que no se han unido a los antígenos de la muestra lo harán a los antígenos de los pocillos. Como enzimas se suelen utilizar la peroxidasa, la galactosidasa o la glucosa oxidasa.

Esta técnica se utiliza para la medida de hormonas, antígenos de la hepatitis y otras muchas sustancias que se encuentran a muy bajas concentraciones.

Una variante de esta técnica de gran utilidad se conoce como ensayo en fase sólida y está orientada a la determinación de anticuerpos frente a un determinado antígeno. Para ello el antígeno se encuentra fijo a un soporte (por ejemplo tubo de plástico). Al añadir la muestra con el posible anticuerpo se unirá y podrá ser detectado añadiendo anti-inmunoglobulinas marcadas con el enzima.

En la tabla 5 se recogen los marcadores enzimáticos más comúnmente empleados en ensayos ELISA, los sustratos que se emplean para su revelado y el modo de prepararlos.

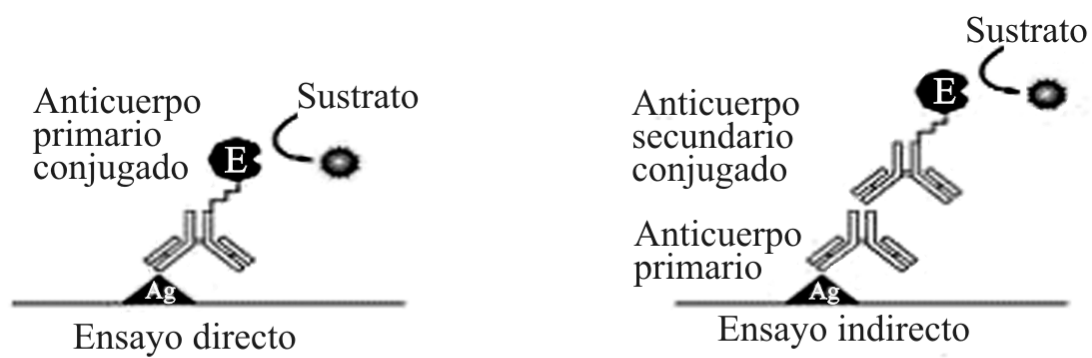


Figura 5. Principio básico de la técnica de ELISA indirecto o competitivo y directo o no competitivo.

Tabla 5. Marcadores enzimáticos más comúnmente utilizados.

Enzima	Sustrato	Tampón
HRP Peroxidasa de rábano	OPD	10mg/25mL de tampón citrato sódico 0.15 M pH 5; añadir μ L de 30% peróxido de hidrógeno 30%
	TMB	2.5mg/250 μ L de DMSO; hasta 25mL con tampón citrato sódico 0.1M pH 6; añadir 5 μ L de peróxido de hidrógeno 30%
	ABTS	60mg/100mL de tampón citrato sódico 0.1 M pH 6; añadir 35 μ L de peróxido de hidrógeno 30%; parar con fluoruro sódico 1.25%; detección a 405nm
	DAB	10mg/20mL de tampón Tris 50mM pH 7.4; filtrar y añadir 20 μ L de peróxido de hidrógeno 1%
	CNP	6mg en 1mL de metanol; añadir 10mL de tampón Tris 50mM pH 7.4; filtrar y añadir 40 μ L de peróxido de hidrógeno 30%
	AEC	80mg en 1mL de N,N'-dimetilformamida + 200 μ L de tampón acetato 0.1 M pH 4.5; filtrar y añadir 50 μ L de peróxido de hidrógeno 30%
	ASA	80mg/100mL de agua destilada caliente; ajustar a pH 6.0 con

AP (Fosfatasa alcalina)	PNPP	1mM NaOH y añadir 10 % por volumen de 0.05% peróxido de ureasa
	NAPFB	hidrógeno; parar con 25µL de NaOH 1M 5mg/5mL de tampón dietanolamina-HCl 0.1M pH 9.8 +1mM cloruro de magnesio
	NAPR	(A) 4mg de fosfato de naftol en 200µL de dimetilformamida en un tubo de vidrio, (B) 10mg de sal Fast Blue BB/ 10mL de tampón Tris 0.05M pH 9.2 - 2mM cloruro de magnesio. Mezclar A + B y filtrar.
		(A) 4mg de fosfato de naftol en 200µL de dimetilformamida en un tubo de vidrio, (B) 10mg de sal Red BB/ 10mL de tampón Tris 0.05M pH 9.2 - 2mM cloruro de magnesio. Mezclar A + B y Filtrar
beta-G	BCIP	1mg/mL en solución AMP (2-amino-2-metil-propanol)
	ONPG	2.5mg/ml en tampón fosfato sódico 0.1M pH 7.0 + 1mM cloruro de magnesio + 0.1M beta-mercaptoetanol
	BP	8mg/1.48ml de 0.01M NaOH; llevarlo a

PG	IS	100mL con agua desionizada; añadir 100mg de urea y EDTA a 0.2mM; ajustar el pH a 4.8 con 1mM NaOH o HCl; almacenar a 4°C Añadir a cada placa de ELISA 25µL de cada uno de los reactivos sig. en secuencia: (A) 1% (peso/vol) gelatina en 0.1M tampón fosfato pH 7.0, (B) 1% (peso/vol) almidón en agua destilada caliente, (C) 3.04mg/mL de benzil-penicilina en 0.1M tampón fosfato pH 7.0 (5000 U/mL), (D) 0.01 N ioduro en 0.1M KI solución stock (en una botella oscura).
----	----	--

2.7 Auto anticuerpos.

Un auto anticuerpo es un anticuerpo desarrollado por el sistema inmunitario que actúa directamente en contra de uno o más antígenos del propio individuo. Los anticuerpos son normalmente producidos por el sistema inmunitario, en concreto por las células plasmáticas, en respuesta a antígenos (proteínas y sustancias extrañas para el organismo), que generalmente corresponde a organismos infecciosos.

Una idea general del proceso de generación de anticuerpos es la siguiente:

1. Un linfocito T_H virgen o de memoria entra en contacto con una célula presentadora de antígeno (APC) profesionales como lo son macrófagos monocitos, células dendríticas, que le presenta un péptido antigénico enclavado en su MHC-II; ello provoca la activación y proliferación clonal del linfocito T_H .
2. Por otro lado, la célula B (virgen o de memoria) reconoce al antígeno nativo, pero interaccionando con otro epítipo diferente al que reconoció el T_H . Acto seguido internaliza este Ag y lo procesa, presentando algunos de los péptidos resultantes en sus moléculas MHC-II.
3. El linfocito T_H cebado del paso #1 reconoce por su TCR a la combinación específica péptido-MHC-II en la superficie del linfocito B del paso #2, formándose el llamado conjugado $T_H:B$. En dicho conjugado, el linfocito coadyuvante suministra dos tipos de señales químicas al linfocito B:

El T_H expresa en su membrana la molécula CD40L (=CD154) y

Secreta citosinas.

Estas señales son transducidas ("reemitidas") al interior del linfocito B, lo que provoca cambios en el patrón de expresión génica. Las proteínas producidas por estos genes inducidos provocan la proliferación clonal del linfocito, y finalmente la diferenciación hasta células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células B de memoria. (La célula B que no reciba estas señales del T_H quedará anérgica) (39).

Normalmente, este sistema es capaz de reconocer e ignorar aquellos antígenos de las células propias del cuerpo, además de otras sustancias inofensivas, como aquellas provenientes de los alimentos, y de este modo no reaccionar en contra de ellas. Sin embargo, hay ocasiones en que el sistema inmunitario termina reaccionando contra uno o más antígenos propios, generando una producción de auto-anticuerpos. Estos auto-anticuerpos terminan por atacar las propias células, tejidos y órganos del cuerpo, causando inflamación y daño. Los auto-anticuerpos pueden ser la causa de la enfermedad autoinmune, pero generalmente solo son una señal de ésta, no su motivo. Se pueden detectar en la sangre y pueden usarse como marcadores de diagnóstico de enfermedades específicas.

En condiciones fisiológicas, la auto-tolerancia evita reacciones del sistema inmune dirigida contra los antígenos propios. La perturbación de la auto-tolerancia puede conducir a enfermedades autoinmunes. Está bien establecido que las respuestas inmunitarias contra antígenos propios pueden ocurrir en pacientes con cáncer y, aunque a veces pueden resultar en trastornos como enfermedades autoinmunes, el inicio de estas reacciones inmunes es diferente de enfermedades autoinmunes primarios. Aparte de la pérdida de auto-tolerancia que se considera importante para el desarrollo de enfermedades autoinmunes, la respuesta inmune en pacientes con cáncer puede ser iniciada por alteraciones en el propio tumor que se traducen en una mayor inmunogenicidad de los antígenos propios. Se han identificado varios antígenos que se expresan en células tumorales pero no en absoluto o sólo en niveles muy bajos en células normales y por lo tanto pueden funcionar como antígenos asociados a tumores capaces de estimular el sistema inmune para reconocer las células tumorales.

Los AAT's pueden surgir a través de diferentes mecanismos, tales como la codificación de las mutaciones del ADN que conducen a nuevos epítomos en las proteínas expresadas (por ejemplo, P53), con modificaciones postraduccionales relevancia inmunológica (por ejemplo, baja glicosilación de MUC1), y los patrones o los niveles de expresión específica de tejido alterado que puede dar lugar a la exposición de los antígenos normalmente expresados únicamente en sitios inmuno privilegiados (por ejemplo, NY-ESO-1) (7).

2.8 Métodos de identificación de auto anticuerpos asociados a tumor.

El análisis serológico de antígenos tumorales mediante clonación de expresión de ADNc recombinante (SEREX)

SEREX implica la identificación de los AAT mediante el tamizaje de sueros de pacientes contra una biblioteca de expresión de cDNA obtenido a partir de los tejidos tumorales autólogas. Mediante el uso de SEREX, Sahin *et al.* (40) fue el primero en mostrar que los antígenos del cáncer de testículo (CTA) provocan una respuesta humoral en pacientes con cáncer. Posteriormente, un gran número de TAA asociado con numerosos tipos de cáncer se han identificado utilizando este método. Muchos de estos TAA son potenciales biomarcadores serológicos, aunque varios tienen una baja sensibilidad. El método SEREX tiene algunas limitaciones para identificar auto-antígenos. En primer lugar, los clones de expresión de ADNc recombinante son productos de genes expresados en bacterias, que sólo presentan epítopos lineales. Además, no se muestran las modificaciones post-traduccionales (PTMs), tales como glicosilación, acetilación, fosforilación y la escisión proteolítica, que se sabe que es importante para la neo-antigenicidad de proteínas asociados a tumores. En segundo lugar, ya que los clones de expresión de ADNc se construyen a partir de una muestra de tejido del tumor, SEREX se limita a la identificación de los AAT del tumor de un paciente. Debido a la heterogeneidad de la expresión génica en los diferentes tipos de células en los tejidos tumorales, la biblioteca de expresión de ADNc derivada de un paciente no es suficiente para identificar TAA como candidatos. Las mejoras en el enfoque SEREX se han hecho por la combinación con las tecnologías de presentación en fagos basados en soluciones o mediante el uso de sistemas de expresión eucariotas (por ejemplo, la levadura, el sistema de baculovirus), o mediante la ampliación del repertorio de la biblioteca de expresión de ADNc.

Análisis del proteoma serológica (SERPA)

Otra técnica comúnmente utilizada para la identificación de AAT es el enfoque basado en proteómica-denomina "SERPA", que implica el descubrimiento de AAT usando una combinación de electroforesis de dos dimensiones (2D), Western Blot y espectrometría de masas (MS). Las proteínas de los tejidos tumorales o líneas celulares se separan por electroforesis 2D, se transfieren a membranas de celulosa por electro-blotting y posteriormente se sondean con sueros de individuos sanos o pacientes con cáncer. A continuación, los respectivos perfiles inmunorreactivos se comparan y los lugares antigénicos asociados con el cáncer se identifican por MS. Los inconvenientes de SERPA se relacionan con las limitaciones inherentes de la electroforesis 2D. Estos incluyen el sesgo de abundantes proteínas, las limitaciones en la resolución de ciertas clases de proteínas (por ejemplo, proteínas de membrana) y la dificultad en la producción de geles 2D reproducibles. Además, a causa de la forma en que se preparan las transferencias del Western, sólo epítomos secuenciales pueden ser detectados.

Perfiles de proteínas afinidad múltiple (mapeo)

Mapeo implica cromatografía de inmunofinidad 2D seguida de la identificación de los AAT por MS tándem (nano-LC MS/MS). En la primera fase de cromatografía de inmunofinidad, los AAT no específicos en una línea celular de cáncer o tejido tumoral lisado se unen a la inmunoglobulina G (IgG) obtenido de controles sanos, en la columna de inmunofinidad y se retiran a partir del lisado. El lisado pre-aclarado se somete entonces a la columna de inmunofinidad 2D que contiene IgG de pacientes con cáncer. TAA que se unen en la segunda fase es probable que sean específica del cáncer y se eluyen por digestión enzimática y la identificación por MS tándem. El Mapeo mantiene el antígeno tumoral en solución, lo que permite el potencial de identificación de epítomos conformacionales. Sin embargo, la inmunoprecipitación usando columnas de afinidad a menudo restringe el descubrimiento de los AAT a las interacciones de anticuerpos con baja constante de velocidad de disociación.

Microarreglos de captura reversa

Ehrlich *et al.* (41) presentaron un método “*Microarreglos de captura reversa*” basado en un sandwich de doble anticuerpo ELISA. Lisados celulares de cáncer o lisados tumorales se incuban con los arreglos de anticuerpos comerciales de modo que cada antígeno se inmoviliza en un lugar diferente en sus configuraciones nativas. Mientras tanto, las IgG de paciente y sueros control se purifican y se marcan con diferentes colorantes fluorescentes y luego se incuban con los microarreglos unidos al antígeno. Esto permite la identificación instantánea de autoanticuerpos específicos de cáncer utilizando antígenos nativos expresados en las células tumorales, lo que permite la detección de los AAT presentes con sus modificaciones post-traduccionales. Sin embargo, sólo se pueden analizar los antígenos conocidos con anticuerpos disponibles comercialmente, por lo que este método es apropiado para la validación en lugar del descubrimiento de biomarcadores. La figura 6 muestra un resumen de estos métodos.

Microarreglos de proteínas

Los microarreglos de proteínas constituyen una tecnología rápida y conveniente para la caracterización de la respuesta inmune humoral en el suero. Las plataformas de gama pueden ser dos (por ejemplo, láminas de vidrio, membranas de nitrocelulosa y placas de microtitulación) o tres dimensiones (por ejemplo, los beads y las nano-partículas). Las proteínas recombinantes, las proteínas fraccionadas a partir de lisado de células de cáncer o péptidos sintéticos se detectaron sistemáticamente en microarreglos y luego se incuban con sueros específicos. Debido a su plataforma en miniatura, la cantidad de muestras y reactivos necesarios se reducen en gran medida. La tecnología de matriz de proteína permite la identificación de antígenos en la configuración nativa y especialmente útil para el descubrimiento de antígenos modificados después de la traducción. Debido a que la tecnología de microarrays proporciona análisis multiplexados de miles de proteínas, este método permite la identificación de alto rendimiento de firmas de AAT's para el desarrollo de diagnósticos de cáncer (41).

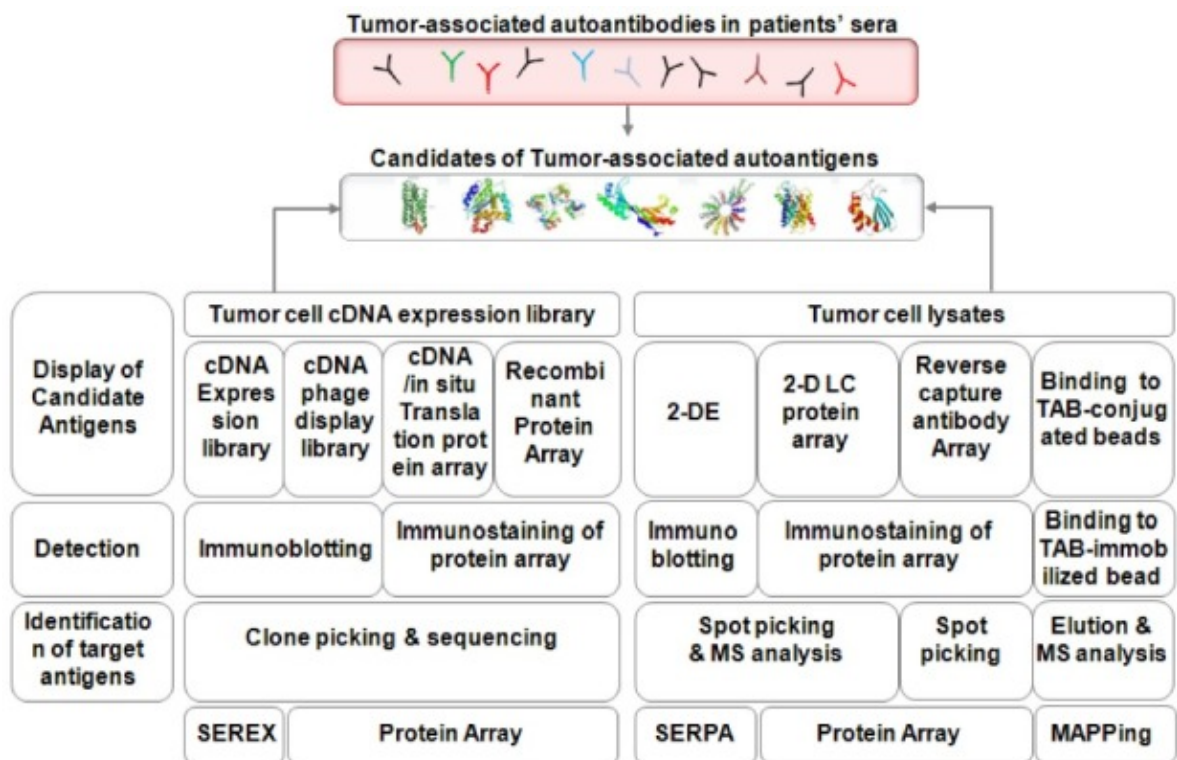


Figura 6. Enfoques sistemáticos para identificar auto-anticuerpos asociados a tumor.

3. Estado del arte.

La investigación ha demostrado que la detección temprana de cáncer de mama, por ejemplo mediante la mamografía, mejora significativamente las posibilidades de supervivencia de una mujer y si el cáncer de mama se diagnostica y se trata cuando todavía está confinada a la mama, la tasa de curación puede acercarse al 100%.

Sin embargo, la mamografía está lejos de ser el método de diagnóstico ideal la sensibilidad de detección de cáncer con las mamografías tiene un 70% -80% en todos los grupos de edad y especificidad 5% -10%. Si sólo al 5% -10% de esas mujeres se les realizan pruebas adicionales se encontrará un cáncer de mama, lo que significa que entre el 4% y el 9% de las mujeres sometidas a tamizaje por mamografía tiene un resultado falso positivo (42-44).

Otras herramientas para el diagnóstico del cáncer de mama son el ultrasonido y las imágenes de resonancia magnética. Sin embargo aún es necesario desarrollar una modalidad alterna de cribado para el diagnóstico temprano. Se ha sugerido por ejemplo el uso de antígenos de tumor solubles en suero, tal como la glicoproteína CA 15-3, empleada como biomarcador para la detección del cáncer de mama. Sin embargo, su uso ha sido limitado por su insuficiente especificidad y sensibilidad, particularmente por órganos confinados en la etapa temprana de la enfermedad. De manera consecuente la glicoproteína CA 15-3 no se recomienda en el tamizaje o detección del cáncer de mama. Esto es en parte debido a la elevación de CA 15-3 en condiciones benignas incluyendo mama, hígado y enfermedades del riñón y otros cánceres. Es por ello que existe la necesidad de buscar nuevos biomarcadores, tales como los auto-anticuerpos séricos específicos a los AAT's en CM y utilizarlos en el cribado, diagnóstico temprano, predicción de pronóstico y monitoreo de tratamiento (45).

3.1 Antígenos asociados a tumor

Se ha reportado que la respuesta humoral en pacientes con cáncer está dirigida a proteínas que poseen diversas funciones celulares. Los AATs pueden generarse por diferentes mecanismos, como altas concentraciones de antígenos, mutaciones

a nivel de DNA generando cambios en epítomos significativos para proteínas como p53, modificaciones post- traduccionales con relevancia inmunológica.

Los factores que inducen la producción de los auto-anticuerpos no son bien entendidos, sin embargo, los datos muestran que muchas de las proteínas blanco de los anticuerpos corresponden a proteínas celulares cuya expresión o estructura aberrantes contribuyen de manera importante en el proceso tumorigénico (25,46).

Se han postulado dos hipótesis en cuanto a la generación de los auto-anticuerpos, la primera de ellas postula que al morir las células tumorales las proteínas intracelulares modificadas se liberan y son procesadas por el sistema inmune en un ambiente inflamatorio (31)

La segunda teoría plantea el desprendimiento de microvesículas (MV) (47) de las células tumorales. La carga bioactiva de las MV incluye factores de crecimiento y sus receptores, proteasas, moléculas de adhesión, moléculas de señalización, así como de ADN, ARNm y micro-RNA's. Las células tumorales liberan grandes cantidades de MV's que pueden ser absorbidas por las células cancerosas y normales. Las MV's que no son absorbidas se dispersan en la sangre y estimulan la respuesta inmune humoral (48).

Diversos estudios han reportado decenas de diferentes AATs, en donde los antígenos se derivaron de proteínas tumorales sobre expresadas o mutadas. El 42% de las proteínas fueron citoplásmicas, 26.1% nucleares (factores de transcripción, reguladores del ciclo celular), 21.4% membranales (receptores y proteínas de adhesión) y 10.3% proteínas extracelulares (proteínas de matriz extracelular y proteínas secretadas). De los AAT's descritos, solo veinte de ellos han sido analizados en más de un estudio, ocho en más de 5 estudios y tres en más de 10 estudios. Los AAT's de proteínas analizados en más de cinco estudios son: p53, MUC1 (CA15-3; CA27.29), NY-ESO-1, c-myc, survivina, p62, ciclina B1 y HER2 (49). Las frecuencias de sueros positivos o seropositividad a AAT's ha sido alta para p53, Her2-neu, NY-ESO-1. La presencia de anticuerpos contra MUC1 está asociada a un pronóstico favorable (50-52), mientras que la presencia de anticuerpos contra p53 está asociado con un mal pronóstico (53-55).

4. Importancia de continuar el estudio del tema

Chapman y cols. (56) reportaron datos de pacientes con cáncer de mama donde proponen que los auto-anticuerpos dirigidos contra los AAT's pueden ser detectados hasta 4 años antes de que el tumor sea evidente en una imagen en una mamografía. Esos datos implicarían que los AAT's inducen una respuesta inmune humoral temprana en el proceso de la enfermedad.

Para el diagnóstico de cáncer de mama se incluye mamografía, ultrasonido y resonancia magnética; sin embargo todos estos métodos son invasivos y aportan resultados cuando el cáncer se ya se encuentra establecido, por ello, es de suma importancia desarrollar una modalidad alternativa para el diagnóstico temprano que además pueda ser de utilidad en el pronóstico y monitoreo del tratamiento (56).

La seroprevalencia de los auto anticuerpos a algún AAT por ejemplo en cáncer de colón varía en un rango de 15.2% a 23.9%. El uso de varios AATs incrementa la positividad alcanzando una sensibilidad de 60.9% y una especificidad del 89.7% (30). En otros estudios donde se evaluaron sueros de pacientes con diferentes tipos de cáncer (mama, pulmón y próstata) se observaron perfiles separados y distintivos. En cáncer de próstata se encontró una mayor frecuencia de lo auto anticuerpos hacia p62, ciclína B1 y Koc, mientras que en cáncer de mama fue para c-myc, Koc y IMP1, lo que sugiere que sería posible desarrollar un mini-arreglo de antígenos para distinguir entre algunos tipos de cáncer (57).

Los métodos más utilizados en el estudio de AATs, son el de ELISA (77%) seguido de Western blot (20%), radio-inmunoensayos y serología multiplex (3%). Así mismo, el 80% de los estudios reporta el uso de proteínas recombinantes como antígenos blanco, y el resto utilizan extractos celulares (12%) o péptidos sintéticos (8%) (58).

A continuación se describen algunas proteínas las cuales varios investigadores las han considerado potenciales AAT's para la generación de auto anticuerpos cuando se les coloca dentro de un panel y algunas otras como es el caso de glioxalasa, PRDX6, Nm23, eIF5A, Hsp27, Hsp70 y DJ1 fueron identificadas y reportadas previamente por nuestro grupo de trabajo mostrando una expresión

diferencial en tejido mamario de mujeres mexicanas con cáncer de mama y tejido sano y las cuales proponemos evaluar para ser consideradas como potenciales AAT's (59).

4.1 Proteína P53

La proteína p53 es esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño al ADN, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. El gen p53 es un gen supresor tumoral que desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular. Una p53 defectuosa podría permitir que las células anormales proliferen dando por resultado cáncer (alrededor de un 50 % de todos los tumores humanos contienen mutaciones en p53).

En cáncer de mama las mutaciones en p53 sugieren un panorama de mal pronóstico para la paciente, también ha sido implicado en resistencia a terapias anti-cáncer (59-62). Las mutaciones puntuales, representan más del 85% de las anormalidades de los genes y permiten un cambio conformacional, el cual inactiva a la proteína p53 y permite que esta se acumule en el núcleo a niveles relativamente altos (59-62). La acumulación de la mutante p53 en la célula de tumor puede desencadenar la respuesta inmune humoral permitiendo la producción de auto-anticuerpos anti-p53. Los carcinomas de mama junto con los carcinomas de ovario epitelial, están entre las malignencias más inmunogenicas induciendo la respuesta de los auto-anticuerpos anti-p53. De hecho, mientras que la mutaciones de p53 parecen un evento seminal en carcinogénesis y están presentes en aproximadamente 30% de los pacientes de cáncer de mama, no está aún claro por qué solo un subconjunto de los pacientes con cáncer de mama son positivos para mutación p53 (aproximadamente 50%) generan auto-anticuerpos anti-p53. Esto ha sugerido que solo las mutaciones p53 localizadas en los exones 5 y 6 con una conformación de proteína alterada y que enlaza con Hsp70 están asociadas con los auto-anticuerpos anti-p53 (63, 64).

Otros estudios, sin embargo, han demostrado que otros factores contribuyen a la respuesta inmune humoral a la proteína p53 y sugieren que la capacidad de inducir una respuesta inmune humoral esta enlazado al contexto biológico de los

pacientes (65,66). Es posible que para una mutación idéntica, la respuesta inmune humoral sea dependiente de la combinación específica de las moléculas del MHC clase I y II expresadas por cada individuo (67).

4.2 Proteínas Hsp27 y Hsp70

Las proteínas de choque térmico (Hsp's) son proteínas citoplasmáticas que actúan como chaperonas moleculares en varios procesos intracelulares. Ellas tienen un papel importante en la interacción proteína-proteína, incluyendo plegamiento y conformación, así como prevención de agregación inapropiada de proteína. Ellas son llamadas proteínas de choque térmico desde que fueron descubiertas en células expuestas a altas temperaturas. Sin embargo, su síntesis está también acentuada bajo otras condiciones de estrés, tales como exposición de la célula a inflamación, infección, isquemia, toxinas, drogas citotóxicas y transformaciones malignas. Las Hsp's han sido clasificadas en familias de acuerdo a su peso molecular (68-70).

La sobreexpresión de Hsp27 en cáncer de mama ha sido asociada con una corta supervivencia libre de la enfermedad (71, 72-75). Conroy y col. (72) demostraron que los auto-anticuerpos dirigidos contra Hsp27 estaban presentes en el suero el 37.8% (219/579) de los pacientes con cáncer de mama, comparado a 1.9% (1/53) en sujetos sanos ($P < 0.001$). La tasa de mortalidad fue más baja en mujeres con auto-anticuerpos para Hsp27 ($P = 0.006$). Se ha encontrado una asociación significativa entre la presencia de auto-anticuerpos a Hsp27 en el suero y la supervivencia en pacientes con cáncer de mama (76). En pacientes sin afectación ganglionar, la alta expresión de Hsp70 se asoció con una supervivencia corta libre de la enfermedad y, en pacientes quienes fueron sometidos a quimioterapia, fue el único predictor independiente de supervivencia (77).

Diferentes estudios han mostrado que la Hsp70, enlaza péptidos antigénicos, que son blancos de células dendríticas y provocar respuestas específicas de linfocitos T contra tumor (78-80). Las proteínas de choque térmico pueden activar a las células dendríticas y promover la respuesta inmune. Por estas razones, antígenos basados en células tumorales como Hsp 70 han sido empleados ampliamente

como vacunas para el control de crecimientos tumorales(81-83). La HSP70 secretada enlaza a la superficie celular vía receptores scavenger y participa en el reconocimiento de las células del tumor por el sistema inmune (84). Esos estudios también muestran que la circulación del Hsp70 secretado a partir de células del tumor correlacionan con las etapas del cáncer. Recientemente, se encontró que la Hsp70 se encuentra elevada en el suero de pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas (58), indicando que la Hsp70 secretada no solo enlaza a la superficie de células de tumor, sino que también circula en el suero de forma soluble. Una predicción es que la producción de la Hsp70 debe ser alta en las primeras etapas del tumor pero disminuye con el tiempo, permitiendo al tumor evadir la respuesta del sistema inmune y generar metástasis. Por lo tanto, la alta expresión de Hsp70 en un tumor recientemente desarrollado ofrece un mejor pronóstico para el paciente, sin embargo en un tumor avanzado con una baja expresión de Hsp70 pudiera correlacionar con un pobre pronóstico.

4.3 Oncogen c-Myc

Los genes *myc* participan en la regulación de factores de transcripción, la proteína *c-myc* que es esencial para el crecimiento celular y proliferación y en general está implicado en tumorigénesis (85-86).

En suero se detectó auto-anticuerpos anti-*c-myc* por ensayos de ELISA en 12.7% (12/94) en pacientes diagnosticadas con cáncer de mama y 7.5% (3/40) en pacientes con carcinoma ductal *in situ* (45). La sensibilidad y especificidad para carcinoma de mama fue 13% y 97% respectivamente, y de 8% y 97%, para carcinoma ductal *in situ*. Con esto se concluyó que la medición de auto-anticuerpos en suero hacia la proteína *c-myc* solo tiene un valor pequeño para tamizaje y diagnóstico temprano de cáncer de mama; sin embargo se ha sugerido que los auto-anticuerpos contra *c-myc* prometen un diagnóstico potencial cuando se incorporan en ensayos de auto-anticuerpos contra un panel de AATs (87).

4.4 Proteína ciclina B1

Las ciclinas son moléculas que controlan la progresión a través del ciclo celular. La ciclina B1 es importante en la progresión del ciclo celular de la fase G2 a la M y se ha observado que se sobre-expresa en diferentes tumores (88,89). Diferentes estudios han mostrado (90,91) la presencia de auto-anticuerpos hacia la proteína ciclina B1 en pacientes con varios tumores, y pudiera ser empleada como marcador de diagnóstico en combinación con auto-anticuerpos contra diferentes antígenos de tumor. Suzuki et al. (88) examinaron por ELISA la presencia en suero de auto-anticuerpos contra ciclina B1 en 120 pacientes (7 con cáncer de mama, 17 con cáncer pancreático, 27 con cáncer de colón y 69 con cáncer de pulmón) y encontraron que la proporción mayor de pacientes positivos en el grupo de cáncer de mama (3/7) 42.8%. Se encontró una correlación de auto anticuerpos en suero a ciclina B1 con un nivel mayor que la expresión de ciclina B1 en tumores. Los auto-anticuerpos en pacientes con carcinoma de mama o colón fueron principalmente del anticuerpo IgG, mientras que en pacientes con carcinoma de páncreas y pulmón adicionalmente presentaron auto-anticuerpos IgA. Los autores (89) proponen que los auto-anticuerpos anti-ciclina B1 podrían ser utilizados como un marcador de suero para la detección temprana del cáncer.

Por otro lado, Hiroyuki Suzuki y col. (88) muestran que además de que la ciclina B1 esta sobreexpresada en células de tumor en comparación con células sanas en proliferación, se encuentra en el citoplasma en lugar del núcleo, y esta expresión aberrante (sobre-expresión y localización errónea), es un resultado de la inactivación de p53 (92).

4.5 Antígeno carcinoembrionario (CEA).

El CEA es una glicoproteína que se produce durante el desarrollo fetal. Puede ser detectada en varias células del cuerpo, pero es frecuentemente asociada con diversos tumores (94).

El CEA es un marcador sérico de tumor empleado en la práctica clínica para monitoreo de terapia. Fue el primer antígeno tumoral en ser estudiado. El CEA es

un tipo de molécula de adhesión celular, se produce en exceso en carcinomas de colon humano aunque también pueden encontrarse en carcinomas de otros sitios. Los niveles de CEA en sangre se incrementan una vez que el cáncer ha metastatizado (95). En recientes años el valor pronóstico preoperatorio del CEA en cáncer de mama ha ganado mucha atención. Los reportes han sugerido que los niveles preoperatorios del CEA están relacionados con factores pronósticos como tamaño de tumor, estado de los ganglios linfáticos axilares, estatus del receptor hormonal, en pacientes con cáncer de mama. De acuerdo con el Grupo Europeo de Marcadores de Tumores, se recomendó usar los niveles de CEA en suero como marcador de pronóstico, detección temprana de progresión de la enfermedad, y en el monitoreo del tratamiento del cáncer de mama (81), sin embargo, la evidencia muestra que este marcador no es suficientemente sensible o específico para la detección temprana del cáncer de mama (96-97). La Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) no recomienda el empleo del CEA en el proyección, diagnóstico, etapa y monitoreo del tratamiento en cáncer mama (84), pero si se recomienda en un panel con otros marcadores.

En una investigación llevada a cabo por el grupo de Huan-xin Lib (98) trabajando con pacientes con cáncer de mama, encontraron que el nivel de CEA en sangre fue más bajo en pacientes con cáncer de mama triple negativo que en otros subtipos (99).

4.6 Proteína Ki-67

Ki-67 también conocido como MKI67 es una proteína nuclear presente en todas las células que están proliferando y es de gran interés su papel como marcador de proliferación. Esta proteína se expresa durante la mitosis, localizándose en la superficie de los cromosomas. Cuando las células están en estado no proliferativo (G0), esta proteína es rápidamente degradada. En células cancerosas sin embargo, se han observado grandes cantidades de la proteína en el núcleo y citoplasma, por lo que además de tener una sobre-expresión de ella también existe una localización aberrante (100).

Un tumor con alta expresión de Ki-67 tiene un mal pronóstico. El nivel de expresión de este marcador puede tener un mayor impacto sobre decisiones en el tratamiento particularmente en pacientes con tumores luminal HER2 –negativo. De acuerdo a diferencias biológicas, el cáncer de mama con receptor de hormona positivo se clasifica en dos grupos: Luminal A y Luminal B, con buen y mal pronóstico, respectivamente. Esos dos grupos pueden distinguirse basándose en alta o baja expresión de Ki-67.

Uno de los resultados del 13th St Gallen International Breast Cancer Conference (2013) "14%" ha sido considerado como el valor de corte Ki67 para distinguir entre tumores luminal A-y B- y, como un índice que sirve como base para la toma de decisiones de tratamiento. Además, se ha reportado que los tumores luminales con alta expresión de Ki67 responden bien a la quimioterapia lo que probablemente refleja su alta actividad proliferativa (101).

4.7 Proteína DJ-1.

DJ-1 se encuentra predominantemente en el citoplasma, se transloca a la mitocondria y posteriormente al núcleo en respuesta al estrés oxidativo por lo que protege a las células contra el estrés oxidativo.

La enfermedad de Parkinson está asociada a esta proteína por lo también es conocida como Park7 DJ1 tiene un efecto sobre Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor), que es un regulador maestro de la respuesta transcripcional antioxidante. Si DJ1 presenta algún daño, la proteína Nrf2 es inestable, y de este modo la respuesta transcripcional se disminuye basalmente después de la inducción. El efecto de DJ-1 en Nrf2 y los efectos posteriores sobre las respuestas antioxidantes pueden explicar cómo DJ-1 afecta a la etiología del cáncer y de la enfermedad de Parkinson. El eje funcional DJ-1 / Nrf2 representa una diana terapéutica en el tratamiento del cáncer y justifica el uso de DJ-1 como un biomarcador tumoral (102).

Por otro lado se ha observado que la hiperactividad de DJ1 está asociada a varios tipos de cáncer, la sobre-expresión de esta incrementa la resistencia de las células

de cáncer a la apoptosis. Estudios genéticos recientes muestran que en adición a las vías de apoptosis DJ1 se encuentra involucrada en la defensa celular contra especies reactivas de oxígeno. La actividad apoptótica y vías de defensa celular son clave en la determinación de la droga como tratamiento a emplear. La baja expresión de DJ1 es un predictor importante de una mala evolución clínica de los pacientes con cáncer de mama (103).

DJ1 fue inicialmente descrito como un oncogen putativo, que podía transformar a NIH-3T3 en cooperación con RAS, más tarde se encontró que la expresión de DJ1 es relativamente alta en cáncer de pulmón y biopsias de cáncer de próstata, y que su expresión correlaciona positivamente con la recaída en pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas.

Con el empleo de perfiles proteómicos, se encontró a DJ-1 en el 37% de los sueros de pacientes con diagnóstico reciente de cáncer de mama y que se sobreexpresa en el jugo pancreático de pacientes con Adenocarcinoma pancreático ductal (104).

4.8 La proteína PRDX6.

La peroxirredoxina-6 es una enzima peroxidasa de 224 aminoácidos que cataliza la transferencia de electrones de grupos sulfhídricos a peróxidos, se encuentra en el citoplasma e interviene en la regulación redox de la célula. La peroxirredoxina puede reducir el H_2O_2 y las cadenas orgánicas cortas, cadenas grasas y los hidroperóxidos fosfolipídicos. Además puede jugar un papel en el recambio de los fosfolípidos también como en la protección contra las lesiones oxidativas.

Debido a su acción se le denomina enzima “antioxidante específica de tioles”. Posteriormente recibió otros nombres como alquil hidroperóxido reductasa, tioredoxin peroxidasa, y actualmente se les denomina peroxirredoxinas (93).

4.9 Enzima Nm23.

La Nm23 (nucleósido difosfato cinasa A), también conocida como factor de inhibición de la metástasis es una enzima que en los humanos está codificada por el gen NME1. Este gen fue identificado debido a sus reducidos niveles de

transcripción en células altamente metastásicas. Fue el primer gen supresor de metástasis descubierto. Esta enzima es un hexámero de dos subunidades diferentes (A y B, de 152 aminoácidos cada uno, que presentan 88% de homología entre sí, denominado y NDP quinasa B (105).

Los niveles de ARN nm23 son más altos en líneas celulares con bajo potencial metastásico, pero no se correlacionan con la sensibilidad de las células a respuestas inmunes del huésped (106). La no expresión de Nm23 es causada, entre otras cosas por deleciones, y se correlaciona con un alto potencial de metástasis de algunos tumores incluyendo mamarios y carcinomas colorectales. Sin embargo, esto no es un fenómeno general y no se observa en todos los tumores. La expresión de Nm23 se mejora en muchos tumores sólidos. En contraste, elevada expresión de Nm23 está relacionada con una enfermedad más agresiva en neuroblastomas y muchas neoplasias malignas hematológicas. En la leucemia mieloide aguda (AML) y el linfoma de alto grado, Nm23 A y B a menudo se sobreexpresan y se correlacionan con el paciente un recuento de glóbulos blancos, y disminución de la supervivencia general de los pacientes (107-109). Los niveles de Nm23 A son elevados en el suero de pacientes con AML, donde los niveles pueden alcanzar hasta 200 ng/ml, de 25-50 veces más que los encontrados en individuos normales (105). Por otra parte, los pacientes con altos niveles de Nm23 A en suero tienen tasas de supervivencia significativamente más bajos que aquellos con niveles séricos bajos (105). Recientemente se ha demostrado que Nm23 A recombinante (rNm23 A) apoya el crecimiento y la supervivencia de las células de AML primarias, lo que indica un papel para Nm23 A extracelular en la exacerbación de la carga tumoral (106). Los autores mostraron que la actividad pro-supervivencia de Nm23 A se asoció con la activación de la proteína cinasa activada por el mitógeno p38 (MAPK), las vías de STAT, y la liberación de una serie de citoquinas de apoyo, incluyendo el factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF), interleucina 1 β (IL1 β), e IL6 (109). Los mecanismos por los que las proteínas extracelulares Nm23 activan las vías de supervivencia siguen siendo poco claros. En un estudio en el linfoma no Hodgkin (NHL), más de 20% de las células fueron positivas para la

expresión de Nm23A en la superficie celular en más de 25% de los casos (109). Los autores llegaron a demostrar que los pacientes con NHL con alta expresión en la superficie celular Nm23A habían reducido significativamente las tasas de supervivencia (109).

4.10 Proteína eIF5A.

eIF5A es una proteína pequeña de 16-18 kDa , formada por 154 aa, esta proteína es ubicua y altamente conservada en eucariontes y arqueas; presenta una modificación post-traducciona en una lisina específica conocida como hipusina [Nε-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine], a partir de la poliamina de la espermidina por dos pasos catalíticos (110).

Su localización celular es en el núcleo, citoplasma, membrana del retículo endoplásmico. La modificación con la hipusina promueve la exportación nuclear y localización en citoplasma (110).

Es una proteína de enlace al RNAm involucrada en la elongación de la traducción. Está involucrada en la dinámica de la actina y la progresión del ciclo celular, decaído del RNAm y probablemente en una vía de involucrada en respuesta al estrés y mantenimiento de la integridad de la pared celular (110).

En cáncer cervical se ha encontrado que eIF5A está sobre-expresada en humanos. Otras investigaciones confirman que para la expresión de Hsp27 en células de cáncer cervical se requiere a eIF5A y DOHH (deoxihipusina hidroxilasa). Con lo anterior se argumenta que el eIF5A maduro controla un grupo de genes que conducen al cáncer (111).

4.11 Proteína glioxalasa GLO 1

Es una proteína de 184 aminoácidos. Pertenece al sistema glioxalasa, formado por la GLO1 y GLO2. La GLO 1 cataliza la conversión de metilglioxal (CH_3COCHO) (MG), un metabolito derivado de la glucólisis, con glutatión para S-lactoylglutathione, mientras GLO2 hidroliza este glutatión tiolester a D-láctico y a glutatión. El metilglioxal es tóxico debido a su alta reactividad, el sistema

glyoxalase es crucial para garantizar el flujo metabólico eficiente de este aldehído reactivo (112).

La función fisiológica de expresión GLO1 en respuesta al estrés osmótico es para combatir el aumento en los niveles de metilglioxal en las células durante la producción de glicerol como osmolito compatible (113).

Evidencia acumulativa sugiere un papel importante de expresión GLO1 en la protección contra MG dependiente de la proteína y el daño celular asociado con la diabetes, el cáncer y el envejecimiento cronológico (114).

La expresión de GLO1 está regulado en los tejidos de carcinoma hepatocelular (HCC) en comparación con los tejidos no tumorales adyacentes, y la delección de la expresión de GLO1 inhibe significativamente la proliferación de líneas celulares de HCC humanos. La caída de GLO1 resulta en la acumulación de su sustrato citotóxico, MG. Por lo tanto GLO1 podría ser esencial para el HCC progresión y puede ser designado como una posible diana terapéutica para el HCC en el futuro (115).

También se ha observado la sobreexpresión de GLO1 en melanoma. Consistente con el papel esencial de GLO 1 en defensa de células de melanoma contra citotoxicidad MG (99). En estudios recientes se ha encontrado a GLO1 sobre-expresada en tejidos de tumores de pacientes con cáncer de páncreas y no así en los tejidos adyacentes libres de la enfermedad (115).

II.OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la seroprevalencia a un panel de AAT en pacientes con cáncer de mama.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

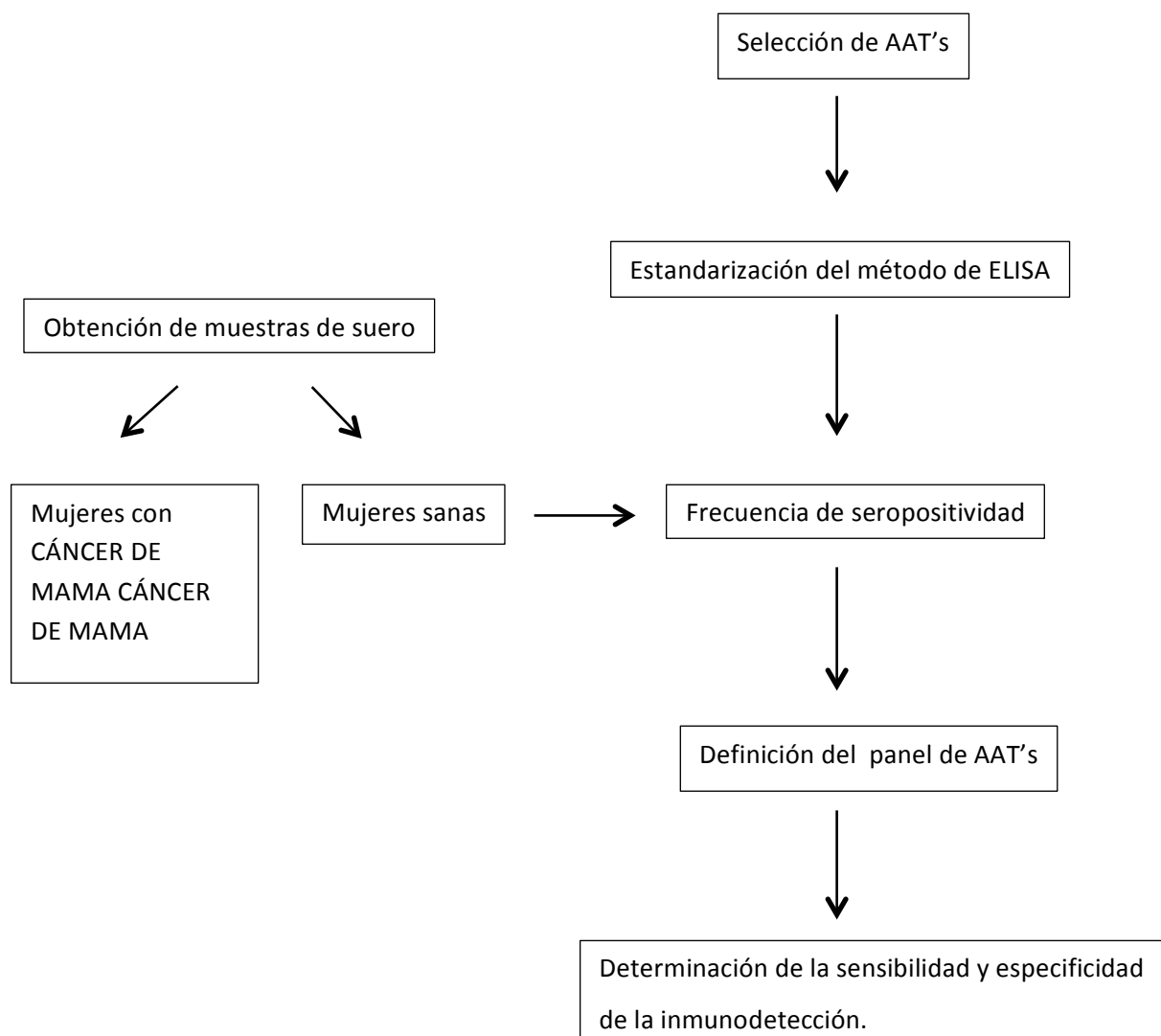
1.- Seleccionar potenciales antígenos asociados a tumor (AAT's) correspondientes a proteínas previamente identificados como desreguladas en tumores de mama de pacientes Mexicanas.

2.- Implementar y validar el método de ELISA para las proteínas seleccionadas.

3.- Definir los AATs que son reconocidos con mayor frecuencia por auto-anticuerpos presentes en sueros de pacientes con cáncer de mama.

4.- Evaluar el potencial del panel de AAT's seleccionado para diferenciar el grupo de pacientes con cáncer de mama del grupo sano.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



IV METODOLOGÍA

Tipo de estudio: Se realizó un estudio transversal de casos y control.

1. Muestras de suero. Se analizaron 104 sueros provenientes de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama y 50 sueros de mujeres clínicamente sanas. Las muestras de suero de pacientes fueron obtenidas del Instituto Nacional de Cancerología tomando los siguientes criterios de inclusión para participar en este estudio

1. No haber recibido tratamiento alguno como terapia hormonal, quimioterapia o radioterapia.
2. Firmar carta de consentimiento informado.
3. Estar en ayuno para la toma de la muestra de sangre

Las muestras de las mujeres sanas empleadas como controles fueron obtenidas del Banco de Sangre del Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE. Los criterios de inclusión corresponden a los establecidos por la NOM. 253 SSA1 2012, entre los cuales se establece lo siguiente:

La selección de donante y la disposición de la sangre y componentes sanguíneos para uso alogénico, deberá efectuarse a través de los procedimientos siguientes:

- a) Identificación del donante
- b) Evaluación clínica
- c) Evaluación de laboratorio
- d) Autoexclusión del donante
- e) Exclusión por terceros.

Se excluirán permanentemente de donar sangre o componentes sanguíneos quienes tengan antecedentes o padezcan cualquiera de lo siguiente:

1. Las personas que pudieran transmitir el virus de la inmunodeficiencia humana.
2. Las personas que pudieran transmitir el virus B o C de la hepatitis.
3. Las personas que pudieran transmitir el agente causal de la Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas).
4. Las personas que sean potencialmente transmisores del agente causal de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.
5. Se excluirán las personas que tengan historia de haber padecido malaria o que tengan antecedentes de reactividad en una prueba inmunológica de anticuerpos contra el parásito.
6. Las personas que tengan antecedentes clínicos o de laboratorio de las enfermedades siguientes:
 - a) Leishmaniasis visceral o enfermedad de Kala-Azar
 - b) Babesiosis
 - c) Meningitis y encefalitis crónicas ocasionadas por bacilos ácido alcohol resistentes, criptococo, toxoplasma y las producidas por virus lentos
 - d) Fiebre Q crónica
 - e) Retrovirus, tales como: HTLV-I, HTLV-II.
7. Las personas que tengan antecedente o padezcan cualquier neoplasia.
8. Las personas que tengan antecedentes o padezcan cualquiera de las enfermedades cardiovasculares que se indican a continuación:
 - a) Infarto al miocardio
 - b) Trombosis arterial o venosa recurrente
 - c) Esclerosis de las coronarias
 - d) Angina inestable
 - e) Hipertrofia aórtica
 - f) Arritmias
 - g) Fiebre reumática que hubiese dejado secuelas crónicas
 - h) Historia sugestiva de retención hídrica
9. Las personas que requieren continuamente transfusiones, tales como los que padecen hemofilia u otros trastornos hemorrágicos.

10. Las personas que padezcan enfermedades hepáticas activas o crónicas.
11. Las personas que padezcan diabetes mellitus dependiente de insulina.
12. Las personas que padezcan trastornos autoinmunes que cursen con afección en más de un órgano.

Los donadores firmaron carta de consentimiento informado.

El nombre y el número de identificación de los pacientes y mujeres sanas que participaron en el análisis no fue revelados a los investigadores, esto en conformidad a el reglamento de bioética establecido en el Instituto Nacional de Cancerología y el Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE.

Todos los sueros fueron centrifugados previo a su uso para descartar eritrocitos que pudieran estar presentes. Adicionalmente, los sueros lipémicos fueron descartados para los ensayos. Finalmente, todos los sueros fueron alícuotados para evitar ciclos de congelación-descongelación que pudieran afectar la conformación de las inmunoglobulinas. Las alícuotas fueron conservadas a -20°C.

2. Elección de proteínas a evaluar. Se eligieron proteínas reportadas en la literatura en donde se sugiere que son reconocidas por auto anticuerpos en pacientes con cáncer de mama y en otros tipos de cáncer CEA, Ki67, Hsp 27, Cíclina B1, p53, c-Myc. Se evaluó la significancia de AATs para detectar el cáncer de mama y que no han sido previamente analizados en cáncer de mama pero sí en otros tumores. Así mismo se incluyeron algunas proteínas previamente identificadas en nuestro grupo de trabajo como sobre-expresadas en cáncer de mama y se evaluaron como posibles AATs: peroxirredoxin-6, Hsp70, Nm23, DJ1, eIF5A1 y glioxalasa. Cabe señalar que ningún estudio de este tipo ha sido reportado hasta ahora para población mexicana.

Las proteínas seleccionadas fueron adquiridas de manera comercial como proteínas recombinantes. Las proteínas fueron reconstituidas y conservadas siguiendo las instrucciones de los proveedores. Se alícuotaron para evitar ciclos de congelación-descongelación que pudieran afectar su conformación. La información general se integra en la tabla 6.

Tabla 6. Proteínas recombinantes.

Proteína	Edo. en que se recibió	Etiqueta (tag)	Sistema de expresión	Compañía
c-Myc (169901)	Líquida	11R	<i>E. coli</i>	ABCAM
CEA (287)	Líquida	Sin etiqueta	<i>Baculovirus</i>	Prospec
P53 (14-865)	Líquida	Sin etiqueta	<i>E. coli</i>	Milipore
Ciclína B1 (128445)	Líquida	6-Histidinas	<i>E. coli</i>	ABCAM
Ki-67 (92248)	Liofilizada	6-Histidinas	<i>E. coli</i>	ABCAM
Glioxalasa (P3478)	Líquida	Sin etiqueta	<i>E. coli</i>	Abnova
eIF5A (674)	Líquida	Sin etiqueta	<i>E. coli</i>	Prospec
Nm23 (715)	Líquida	Sin etiqueta	<i>E. coli</i>	Prospec
Hsp27 (027)	Líquida	Sin etiqueta	<i>E. coli</i>	Prospec
Hsp70 (78427)	Líquida	6-Histidinas	<i>E. coli</i>	ABCAM
PRDX6 (87631)	Líquida	6-Histidinas	<i>E. coli</i>	ABCAM
DJ1 (575)	Líquida	6-Histidinas	<i>E. coli</i>	Prospec

3. Ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se estandarizó un sistema de ELISA indirecto en donde las proteínas recombinantes purificadas fueron diluidas en buffer de carbonatos a una concentración final de 1 µg/ml. Para sensibilizar las placas de microtitulación (*Corning high binding*) se depositaron 100 µl de las proteínas diluídas y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se se bloquearon con BSA 1% toda la noche. Las muestras de suero fueron diluidas 1:200 y se incubaron individualmente en los pozos sensibilizados con los antígenos a 37°C durante 4 h. Al final de la incubación se realizaron 3 lavados con amortiguador PBS al 0.05% Tween 20 (PBST-0.05%). Los lavados se realizaron con un lavador de placas (modelo 1575 **Bio-Rad**).

Posteriormente, se incubaron durante 2 h con un anticuerpo secundario anti-human IgG, IgM, IgA acoplado con peroxidasa de rábano (HPR) diluido 1:50000 (MARCA) y se lavaron en 6 ocasiones con PBST-0.05%. Como sustrato se empleó el reactivo diclorhidrato de o-fenilendiamina (oPD) (Sigma-Aldrich). La densidad óptica (D.O.) de cada pozo fue determinada a 450nm en un espectrofotómetro modelo 1681135 (Bio-Rad, USA). Cada muestra fue analizada por triplicado. El valor de corte para determinar una reacción positiva fue la media de la absorbancia del grupo de sueros de personas sanas más 2 desviaciones estándar (media $\pm$ 2DS). Con base en lo reportado por Liu, W. (30).

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

4. Análisis estadístico

La evaluación de los resultados para cada auto anticuerpo anti-AAT incluye: métodos para calcular la sensibilidad y especificidad de acuerdo a lo reportado por Liu, W. y Wang J. (30, 118)

En términos epidemiológicos la sensibilidad se define como la probabilidad de que un individuo enfermo tenga un resultado positivo y lo calculamos como el cociente de la proporción de positivos que tenemos entre los que tienen la patología.

La especificidad es la proporción de positivos que tenemos entre los que tienen la patología. Esta se calcula como el cociente de los individuos que no tienen la enfermedad entre los que salen negativos en la prueba.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Número de pacientes positivos}}{\text{Núm. de pacientes positivos} + \text{Número de pacientes negativos}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{número de sujetos sanos negativos}}{\text{Número de sujetos sanos negativos} + \text{núm. de sujetos sanos positivo}}$$

V.RESULTADOS

1. Características clínicas de la población de estudio.

En primer lugar, es importante mencionar las características de las 104 pacientes analizadas. Estas se encontraban en un rango de edad de 26-69 años, mujeres que no han presentado embarazo hasta aquellas con siete embarazos, 85 de las mujeres nos reportaron que no tienen el hábito tabáquico. Estos parámetros se presentan en la tabla 7.

Dentro de los parámetros clínicos se clasificó el tipo de tumor que presentaron registrándose que 94 de las pacientes tienen cáncer de mama ductal y 10 del tipo lobulillar, por otro lado el estadio en el que se encontraron estos tumores fueron 80 en etapa III, 19 en etapa II y 5 en etapa IV. Tabla 8.

Otro aspecto molecular en la clasificación del cáncer de mama está directamente relacionado con la presencia de marcadores biológicos, en particular con el receptor de progesterona (PR), el receptor de estrógenos y el receptor epidermal humano tipo 2 (HER 2). Cuando estos receptores están ausentes, el tumor se clasifica como triple negativo. La presencia o ausencia de estos es importante no solo en la predicción de la evolución del cáncer sino en la elección del tratamiento. Las características de las muestras empleadas en el estudio en términos de los receptores descritos se presentan en la tabla 9.

Respecto a las muestras control, las características de las mujeres donantes se describe en la tabla 10.

Tabla 7. Características de las pacientes con cáncer de mama.

Parámetros	Rango
Edad	26-69 años Promedio: 49.66
Número de embarazos	0-7 Promedio: 2.87
Tabaquismo	19: si 85: no

Tabla 8. Características clínicas de los tumores de las pacientes con cáncer de mama.

Parámetro	Número
Etapa clínica:	
II	19
III	80
IV	5
Histopatología	
Ductal	94
Lobulillar	10

Tabla 9. Características de marcadores biológicos de los tumores con cáncer de mama

Biomarcadores tumorales	
Luminal A y B	69
HER2+	17
Triple negativo	18

Tabla 10. Características de los sujetos sanos.

Parámetros	Rango
Edad	27-65 años Promedio 44.7
Número de embarazos	0-5 Promedio 1.7
Tabaquismo	40: no 4: si 3: ocasionalmente 3: lo dejaron
Historia Familiar con cáncer de mama	40: no 9: si 1: ignora

2. Estandarización de la técnica:

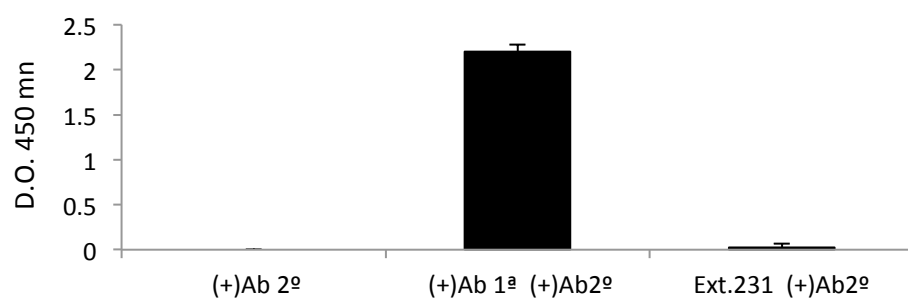
Debido a que se estandarizó todo el sistema de ELISA, es importante describir los parámetros definidos durante el proceso de estandarización.

Para el anticuerpo primario (Ab 1º) realizamos una serie de diluciones de 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800 empleando el suero de las mujeres sanas frente a extractos totales de proteínas de líneas celulares de cáncer de mama: MDA-MB-231, MCF-7 y ZR75-1 (como antígenos) a una concentración de 0.1ug por pozo en la placa de microtitulación. Cada muestra se analizó por triplicado. La densidad óptica (D.O.) se determinó a 450 nm. Se decidió trabajar con una dilución 1:200 ya que aquí tuvimos lecturas de reactividad que estaban entre de 0.2 y 0.7.

Para el anticuerpo secundario (Ab 2º) empleamos un anti-human IgG, IgM e IgA acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Se realizaron diluciones en serie en un rango de 1:3000, 1:50000, 1:25000, 1:50000 y 1:75000, con base en las sugerencias del proveedor, decidiendo trabajar con la dilución 1:50000, ya que no se presentaba fondo y las lecturas de DO estaban en un rango por arriba de 0.2.

Para realizar el bloqueo de la placa se probaron dos tipos de bloqueadores: leche al 5% y BSA 1%. Como antígeno se emplearon los extractos totales de proteínas de la línea celular triple negativo MDA-MB 231, MCF-7 y ZR75-1 a una concentración de 0.1ug/100ul en cada pozo. Los resultados muestran que con BSA 1% en PBS dejando toda la noche a 4°C, obteníamos un buen bloqueo. Figura. 7.

A.



B.

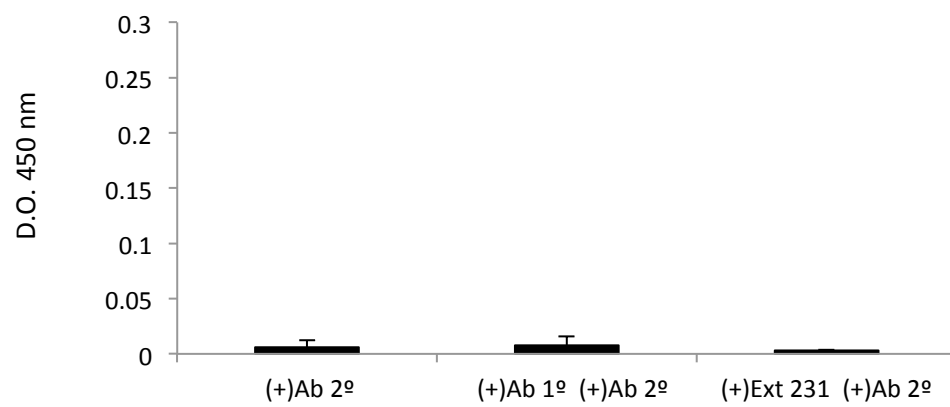


Figura 7. Estandarización del bloqueo de las placas de microtitulación. (A). Bloqueo con Leche 5% toda la noche (B). Bloqueo con BSA 1% toda la noche. Se empleó como antígeno extracto proteico total de la línea celular MDA-MB 231 a una concentración 0.1ug/100ul, como anticuerpo primario se utilizó el suero del control 3 y como anticuerpo secundario anti-human IgG, IgM, IgA-HRP. La densidad óptica (D.O.) se midió a 450nm. En la primera posición no se colocó antígeno ni anticuerpo 1º, únicamente anticuerpo 2º, en la segunda posición no había antígeno pero si anticuerpo 1º y anticuerpo 2º. En la posición 3 hay antígeno y anticuerpo 2º pero no anticuerpo 1º.

Relativo a la elección de control positivo del sistema de ELISA, se emplearon tres estrategias para buscar un control positivo de reacción, es decir un control interno que indicara que el ensayo de ELISA se llevó a cabo de manera correcta y que los resultados obtenidos eran confiables.

La primera estrategia empleada fue para aquellas proteínas antigénicas propuestas como potenciales AAT's que contienen una etiqueta de 6- Histidinas y para ellas se empleó un anticuerpo anti-Histidinas, como anticuerpo primario. La segunda estrategia fue probar algunos anticuerpos comerciales con los que se contaba en el laboratorio específicamente para las proteínas Ki-67, p53 y GLO1. Para ambos casos se realizó un ensayo de ELISA obteniendo D.O. en un rango de .28-0.64 lo cual es un rango que nos permite trabajar adecuadamente con cualquiera de las dos estrategias propuestas, (Figura 8).

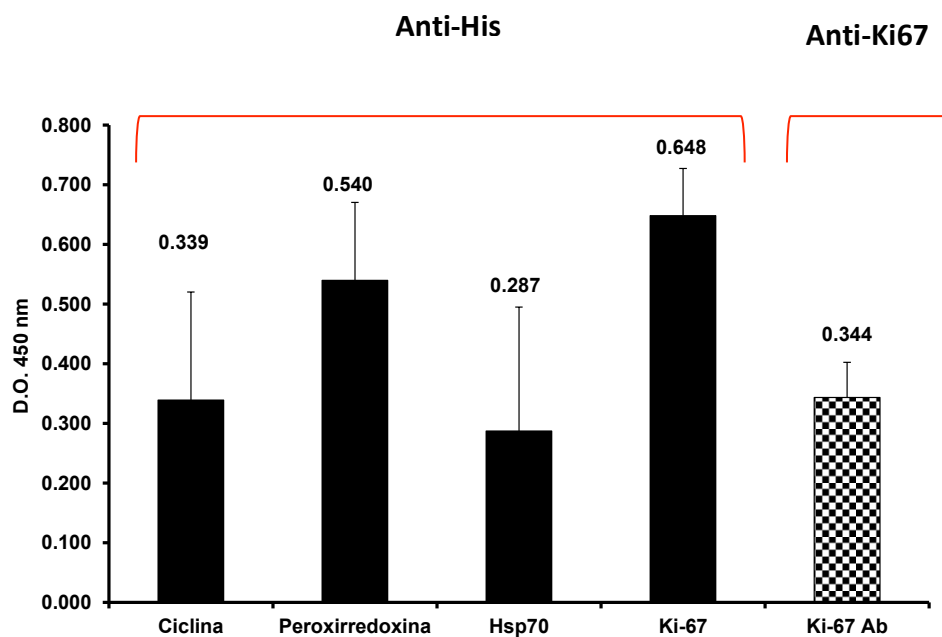
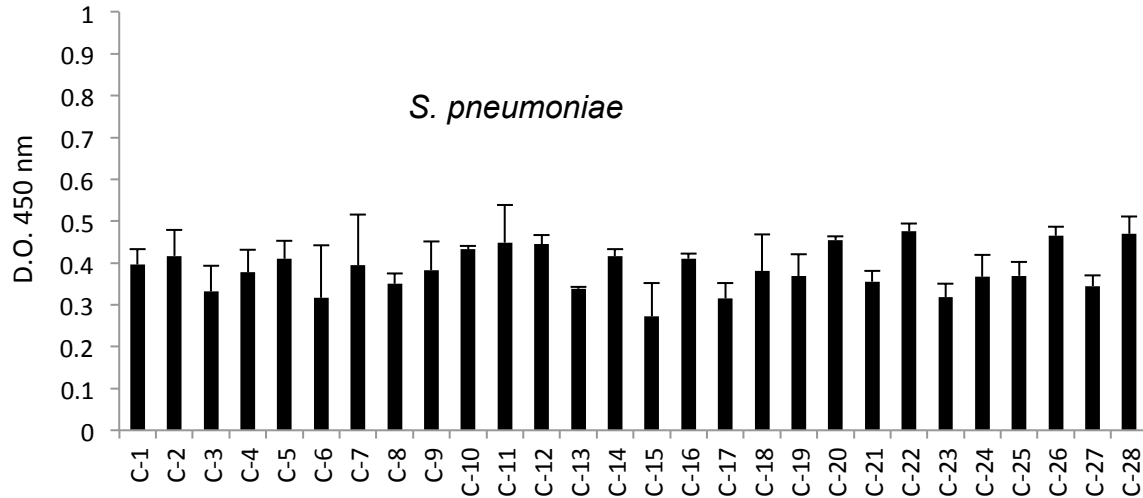


Figura 8. Selección de controles positivos para el sistema de ELISA. Las barras representan la D.O. a 450 nm, para los antígenos Cíclica B1, PRDX6, Hsp70 y

Ki67 empleando como anticuerpos anti-Histidina además para el caso de Ki-67 se empleó como anticuerpo anti-Ki67.

Como tercera estrategia para la búsqueda del control de reacción definida para los casos en que las proteínas antigénicas no contenían la etiqueta de 6- histidinas o bien, no se contábamos con los anticuerpos contra ellas en el laboratorio, se probaron extractos proteicos totales de diferentes líneas celulares de cáncer de mama triple negativo entre ellas: ZR75-1, MDA-MB 231, MCF-7 así como extractos totales de bacterias a las que comúnmente estamos expuestos por lo que pudieran existir ya anticuerpos contra estos antígenos. Se eligieron extractos totales de *Escherichia coli* enteropatógena, *Streptococcus pneumoniae* y *Helicobacter pylori* a una concentración de 0.1ug/100ul en cada pozo, como anticuerpo primario se emplearon los sueros de las mujeres sanas, con un título de 1:200 observando que los extractos proteico de *H. pylori* daban una buena reactividad de señal Se consideró Consideramos el suero del sujeto sano 4 como control interno positivo de reacción, ya que presentó la reactividad más alta, D.O. 0.531 (Figura 9).

A



B.

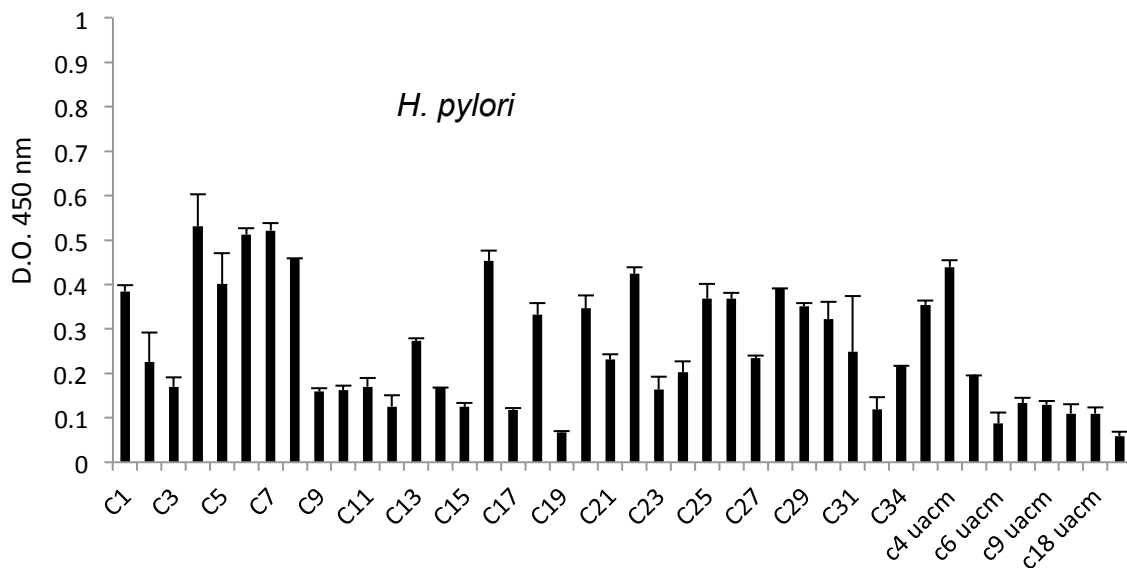


Figura 9. Selección de controles positivos para el sistema de ELISA 2. (A). muestra la reactividad obtenida para los sueros de las mujeres sanas frente a extractos proteíco totales de *S. pneumoniae* no observandose una diferencia marcada entre las barras. (B).Reactividad de los sueros de mujeres sanas contra extractos proteícos totales de *Helicobacter pylori*. Las barras nos muestran diferencias en las reactividades siendo C4 la de mayor lectura a una D.O. 450nm. C=Sujeto sano.

4. Evaluación de los antígenos asociados a tumor.

Una vez que se estandarizó el método de ELISA se procedió a realizar la reactividad de los sueros de las pacientes y de las mujeres sanas para determinar si existen auto-anticuerpos generados contra cada uno de las proteínas y AAT's seleccionados. Cada muestra de suero se analizó por triplicado. La figura 15 muestra los resultados obtenidos para el Ag p53, la reactividad positiva se determinó como el promedio de las lecturas de los sujetos sanos + 2SD, observándose claramente que el paciente 51 (p51), quien mostró una lectura de 0.64 O.D. estuvo por arriba de la línea de corte (0.36), por lo cual se sugiere que en esta paciente existen auto-anticuerpos contra el AAT p53 (Figura 10). Una vez que se evaluaron todas las muestras de los pacientes (n=104) y las de los sujetos sanos, (n=50) los resultados se representaron en gráficos de grupos no pareados (Graphpad Prism) para cada una de las proteínas estudiadas (Figura 11 (A) p53, (B) DJ1, (C) Hsp70, (D) Ciclina B1, (E) c-Myc, (F) PRXD6, (G) eIF5A, (H) Nm23, (I) Hsp27, (J) Ki67, (K) GLO1, (L) CEA)

Teniendo como objetivo en estos gráficos el eliminar los outliers del grupo sano (posibles falsos negativos) y con eso tener un valor de corte más adecuado.

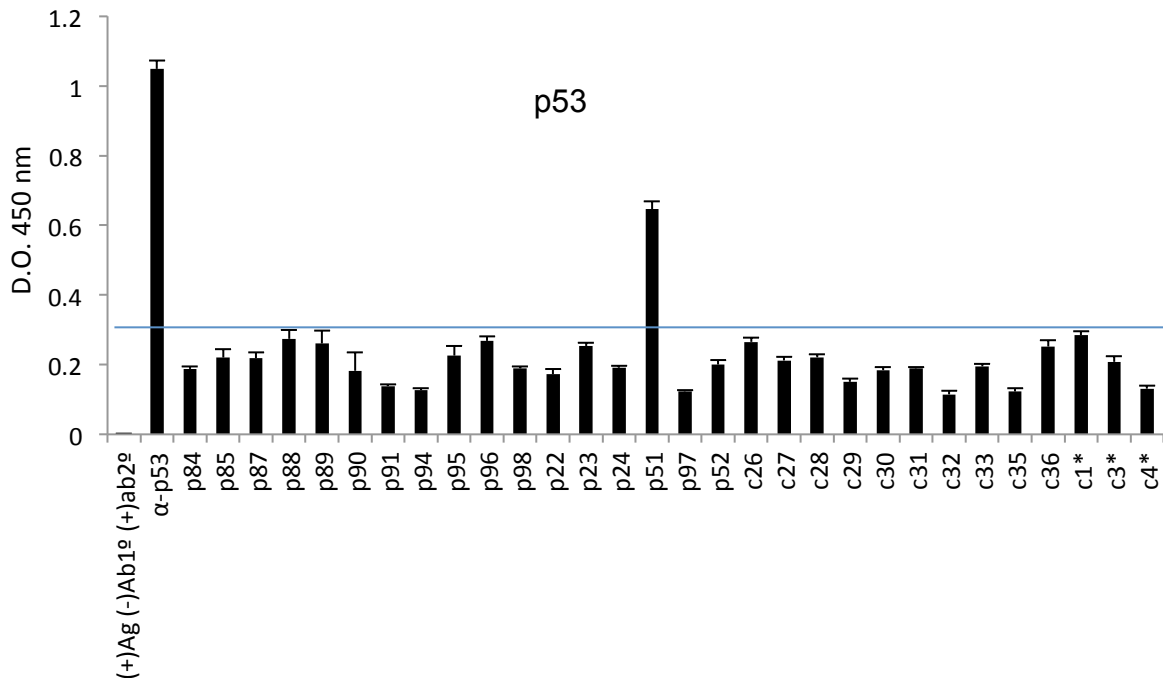
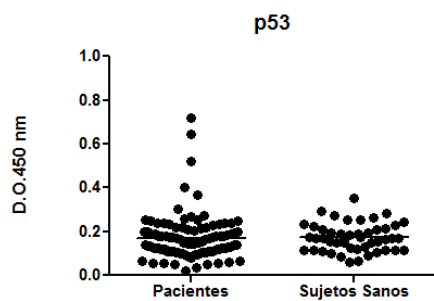
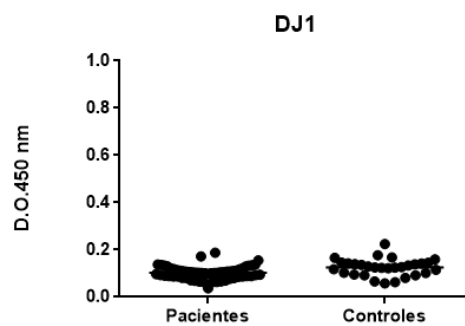


Figura.10. Evaluación de la existencia de auto anticuerpos en pacientes con cáncer de mama contra la proteína p53. La gráfica muestra las lecturas D.O. obtenidas de la reacción de inmunodetección mediante ELISA en 17 pacientes y 13 sujetos sanos. Como control de reacción negativo de reacción no se colocó anticuerpo primario al sistema y el control positivo de reacción estuvo dado por el anti-p53. Las barras muestran el promedio del triplicado de la lectura obtenida para cada muestra. La reactividad positiva se dio como el promedio de los sujetos sanos más 2SD, siendo esta nuestra línea de corte representada por la línea transversal en el gráfico. La muestra de la paciente p51 muestra una lectura de 0.64 O.D. estando por arriba de la línea de corte, por lo cual se considera positiva para la generación de auto-anticuerpos contra la proteína antigénica p53. P= Paciente, C= Sujeto sano.

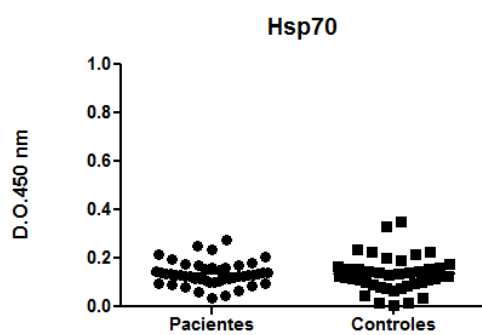
A)



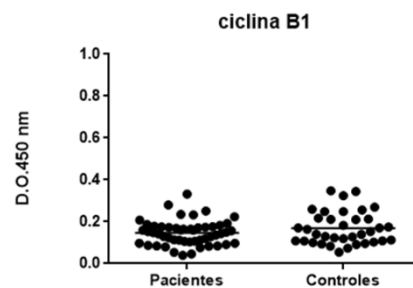
B)



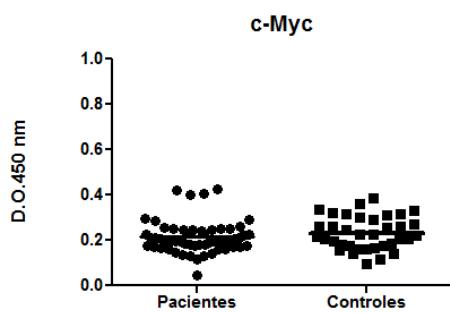
C)



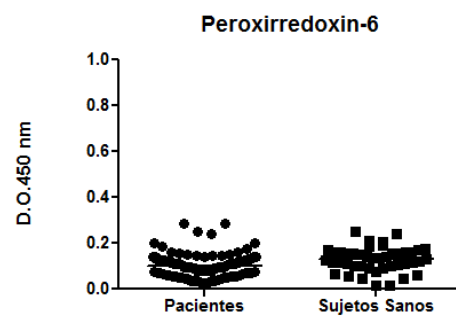
D)



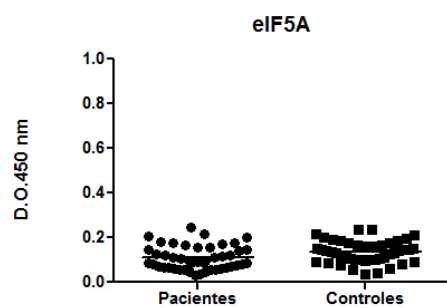
E)



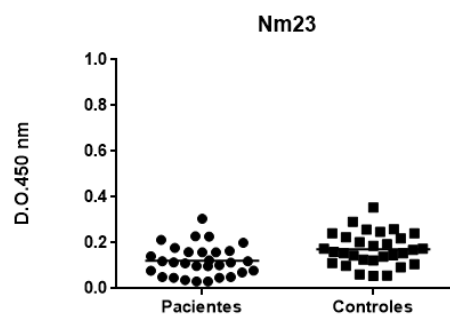
F)



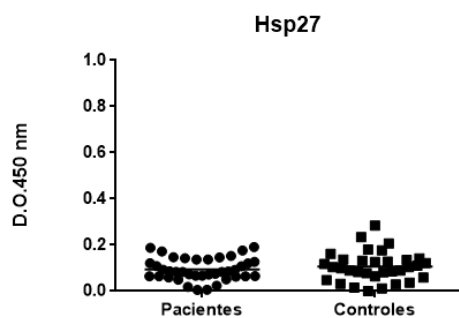
G)



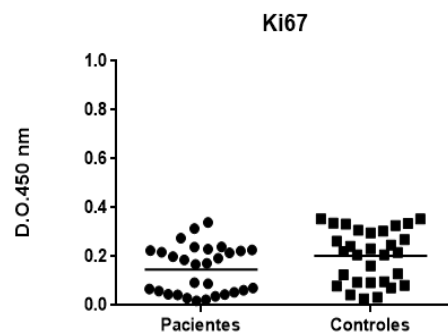
H)



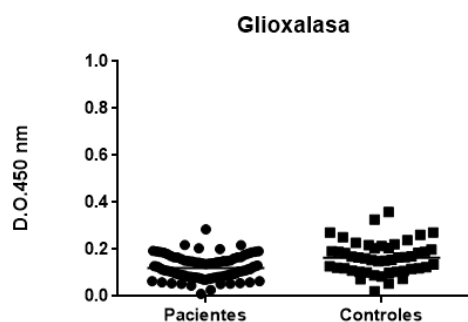
I)



J)



K)



L)

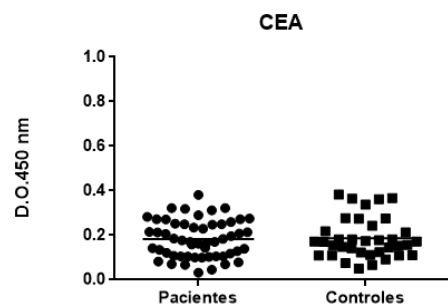


Figura 11. Gráficas del total de sueros analizados contra el AAT. Cada una de las gráficas muestra el conjunto de datos de las muestras de pacientes comparándolas con las muestras de los sujetos sanos como muestras no pareadas, la línea de cada uno de los grupos muestras el promedio de la densidad óptica. (A) p53, (B) DJ1, (C) Hsp70, (D) Ciclina B1, (E) c-Myc, (F) PRXD6, (G) eIF5A, (H) Nm23, (I) Hsp27, (J) Ki67, (K) GLO1, (L) CEA.

El análisis de las 104 muestras de suero mediante ELISA muestra que el porcentaje de reacción positiva más alta fue para p53 con una sensibilidad de 5% (5/104) y ningún sujeto sano dio positivo por lo que presentó una especificidad 100% (0/50). Por otra parte c-Myc y PRDX6 presentaron con una sensibilidad de 3.8% (4/104) y especificidad de 98% (1/50). Con una sensibilidad del 2.8% (3/104) estuvieron Hsp70 y Ki-67, cuya especificidad fue 96% (2/50) y 98% (1/50), respectivamente. Hsp27 no mostró frecuencia de detección alguna, en contraste con reportes donde lo consideran como un potencial biomarcador (56). Los resultados se integran en la Tabla 11. De manera general, se encontraron 23 pacientes y 7 sujetos sanos que presentaron auto anticuerpos para al menos uno de los antígenos es decir se localizaron pacientes que mostraron seropositividad para dos o más de los AAT's, como en el caso del paciente 38 que dio positivo para 5 de los AAT (Hsp70, Cíclina B1, CEA, Nm23 y Ki-67). De igual manera para los sujetos sanos, como C2 quien fue positivo para 5 AAT's. (Tablas 12 y 13).

Tabla 11. Frecuencia de auto anticuerpos contra 12 AAT's. Se muestra la frecuencia para cada uno de los AAT's analizados, así como la sensibilidad y especificidad.

	Frecuencia de auto-anticuerpos en:			
Auto-anticuerpos :	Pacientes (n=104)	Sujetos sanos (n=50)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
P53	5	0	4.8	100
DJ1	2	1	1.9	98
Hsp27	0	0	0	-----
Hsp70	3	2	2.88	96
C-Myc	4	1	3.8	98
Ki67	3	1	2.88	98
eIFG5A	2	2	1.9	96
Peroxiirredoxin-6	4	1	3.8	98
CEA	2	2	1.9	96
Glioxalasa	1	2	0.96	96
Nm23	3	1	2.88	98
Cíclina B1	1	0	0.96	100

Tabla 12.Frecuencia de pacientes positivos contra los 12 AAT's. Se muestran los 21 pacientes con auto-anticuerpos para por lo menos 1 de las 12 proteínas seleccionadas.

Paciente	P53	DJ1	Hsp27	Hsp70	CB1	Prx-6	CEA	c-Myc	GLO	Nm23	elF5A	Ki67	Total AAT
31											1		1
33												1	1
38				1	1		1			1		1	5
40								1					1
44								1					1
47				1									1
48				1						1			2
51	1												1
54	1									1	1	1	4
67						1							1
81								1					1
82								1					1
96		1											1
23									1				1
103							1						1
109		1											1

123	1					1							2
129	1												1
136	1												1
142						1							1
149						1							1
Total paciente.	5	2	0	3	1	4	2	4	1	3	2	3	

Tabla 13. Frecuencia de sujetos sanos positivos contra los 12 AAT's. Se muestran los 7 sujetos sanos con de auto-anticuerpos para por lo menos 1 de las 12 proteínas seleccionadas.

Sujeto sano	P53	DJ1	Hsp27	Hsp70	CB1	Prx-6	CEA	c-Myc	GLO	Nm23	eIF5A	Ki67	Total AAT
C2				1		1	1		1		1		5
C7										1	1		2
C10				1				1					2
C16		1					1						2
C24								1					1
C28												1	1
C33									1				1

Total sujeto sano	0	1	0	2	0	1	2	2	2	1	20	1	
-------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	---	--

Debido a que la detección de auto anticuerpos dirigidos contra los 12 AATs de manera individual fue bajo se procedio a analizar mezclas de AAT's y evaluar si el potencia de detección de pacientes con cáncer de mama incrementaba. El primer panel evaluado fue el comprendido por p53/CEA/PRDX6 con una concentración de 1ug/ml de cada una de las proteínas. Se encontraron 4 pacientes positivos y ningún sujeto sano por lo que la sensibilidad fue de 19% (4/21) y la especificidad del 100. Los sueros de los pacientes detectados corresponden a la detección hecha de manera individual con la proteína antigénica p53, no detectándose los sueros de los pacientes 38 ni 103 que de manera individual fueron detectados para CEA y en el caso de PRDX6 los sueros de los pacientes 67, 123, 142 ,149 tampoco mostraron reactividad. La sensibilidad con respecto al primer panel

propuesto se incrementó pero de manera individual este panel solamente está detectando al parecer a p53 (figura 12).

El segundo panel de AAT's analizado estuvo conformado por: p53/Hsp70/PRDX6/c-Myc. Se detectaron el suero de 6 pacientes positivos y ningún sujeto sano por arriba de la línea de corte que corresponde a D.O. 0.38, teniendo una sensibilidad de 28% (6/21) y especificidad del 100. La sensibilidad de esta mezcla de antígenos se vio incrementada con respecto a la otra evaluada (p53/CEA/PRDX6). Sin embargo, no se están detectando todos los pacientes que se detectaron con los AAT's de manera individual, aunque por otro lado como en el panel anterior no existe detección de sujetos sanos (figura 18).

Con lo observado en este panel (incremento de sensibilidad) se decidió evaluar un tercer panel incrementado una proteína, la cual se determinó en función de la sensibilidad obtenida de manera individual por los AAT's. El panel quedó constituido por 5 AAT's: p53/Hsp70/PRDX6/c-Myc/Nm23. Una vez que se realizó el ensayo de ELISA se determinó en función a la línea de corte que 5 pacientes dieron positivo en dicho ensayo (p51, p54, p123, p129, p136) mostrando una sensibilidad de 24%, ningún sujeto sano dio positivo por lo que la sensibilidad es del 100% (figura 14). La sensibilidad de este panel se incrementó con respecto al primer panel analizado (p53/CEA/PRDX6) y disminuyó ligeramente con relación al segundo panel (p53/Hsp70/PRDX6/c-Myc).

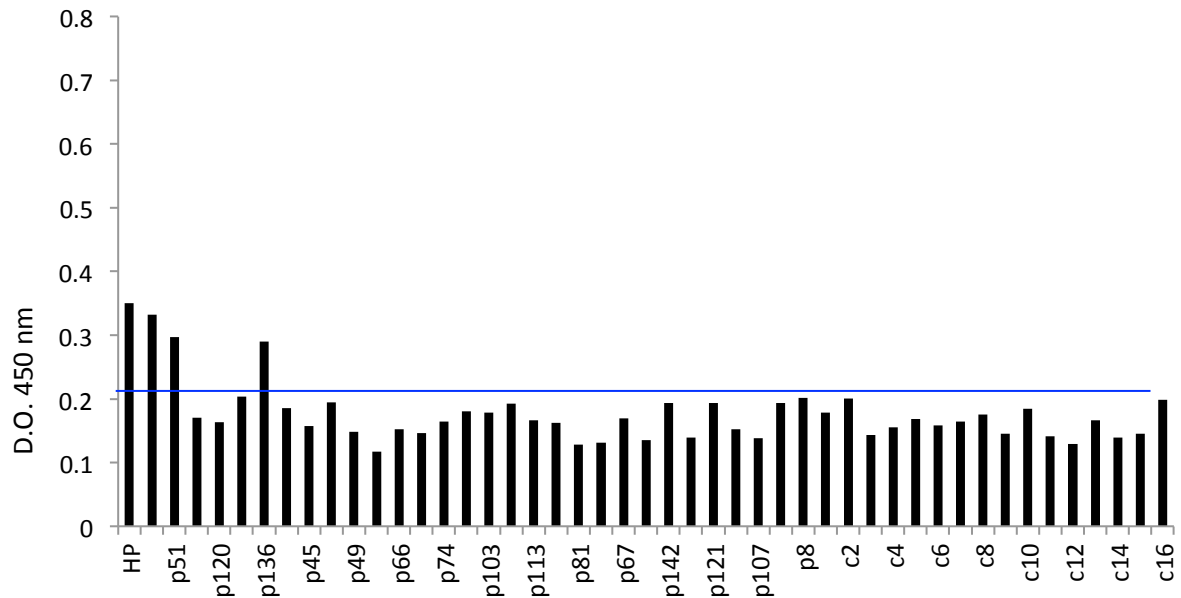


Figura 12. Panel p53/CEA/PRDX6. Las barras representan las lecturas obtenidas del ensayo de ELISA para 3 AAT's a 450 nm de D.O., la línea de corte con valor 0.2 D.O. nos marca la reactividad positiva, observándose el suero de 4 pacientes por arriba de esa línea de corte (p54, p51, p129 y p136), y ningún sujeto sano. Como antígeno del control positivo de reacción se empleó los extractos proteicos de *Helicobacter pylori* (HP), P= Paciente, C=Sujeto sano.

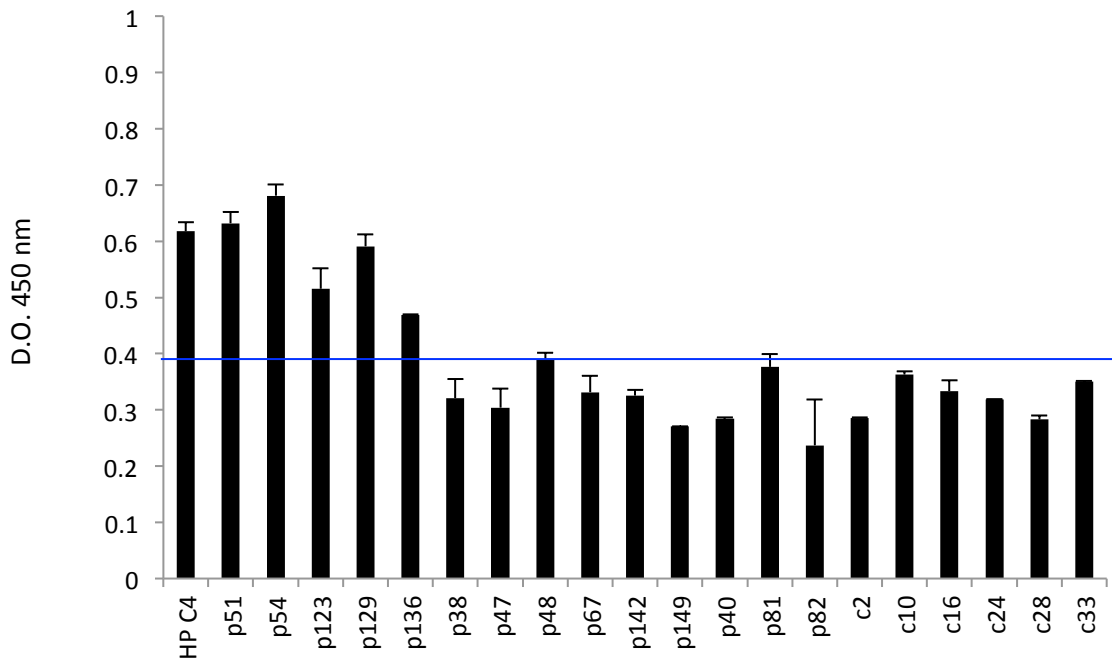


Figura 13. Panel p53/Hsp70/ PRDX6/ c-Myc. Las barras representan la lectura obtenida a una D.O. 450 nm en el ensayo de ELISA realizado con 4 AAT's. La línea de corte representada por la línea transversal en las barras (con valor de 0.38 D.O.) nos muestra la reactividad positiva de los sueros, detectando a 6 pacientes (p51, p54, p123, p129, p136 y p48) y ningún sujeto sano se observa por arriba de esta línea de corte.

En los tres paneles evaluados se detectaron a los sueros de los mismos pacientes a excepción de los sueros de los pacientes p123 que no se detectó en

el primer panel (p53/CEA/PRDX6) y p48 que solo fue detectado en el segundo panel (p53/Hsp70/ PRDX6/ c-Myc).

La tabla 14 muestra en resumen la sensibilidad y especificidad obtenida en los paneles evaluados, así como el número de pacientes detectados en cada panel.

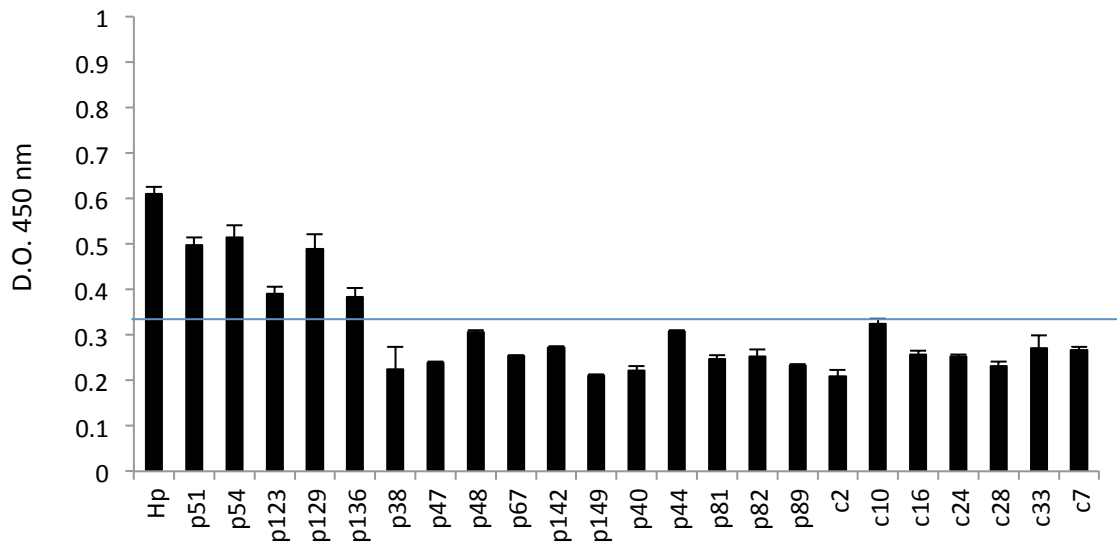


Figura 14. Panel p53/Hsp70/ PRDX6/ c-Myc/ Nm23. Las barras representan la lectura del ensayo de ELISA para 5 AAT's a 450nm de D.O. Cada muestra de suero se analizó por triplicado y la barra muestra el promedio de las lecturas, también se representa la desviación estándar. La línea de corte para determinar la seropositividad está representada por la línea transversal en las barras mostrando a 5 pacientes como positivos para este panel, (p51, p54, p123, p129, p136), no hay ningún sujeto sano por arriba de la línea de corte, por lo que estos se consideran negativos para esta prueba.

Tabla 13. Sensibilidad y especificidad de los paneles.

Número de Positivos				
Panel de AAT's	P (21)	SS (7)	% Sensibilidad	% Especificidad
P53/CEA/PRDX6	4	0	19	100
P53/Hsp70/PRDX6/c-myc	6	0	28	100
P53/Hsp70/PRDX6/c-myc/Nm23	5	0	24	100

VI. DISCUSIÓN

El uso de auto anticuerpos anti- AAT como marcador serológico para la detección del cáncer deriva del reconocimiento de esos anticuerpos, que generalmente están ausentes o en cantidades muy bajas en personas sanas o que tienen una patología diferente al cáncer (exceptuando a las enfermedades auto-inmunes). La persistencia y estabilidad de los auto anticuerpos en el suero de pacientes con cáncer podría ser una ventaja sobre otros marcadores potenciales incluyendo a los mismos AAT's, ya que estos al ser liberados por los tumores rápidamente son degradados y su tiempo de vida es limitado, mientras que los auto anticuerpos son generados en grandes cantidades aun cuando los niveles de AAT son mínimos, el tiempo de vida de los auto anticuerpos es mayor, además de que para su detección se emplea una prueba no invasiva en el sujeto de estudio.

Diversos estudios sugieren que un solo marcador no puede distinguir completamente entre el grupo de personas con cáncer y el grupo sano (31, 51). Sin embargo, la combinación de múltiples marcadores pudiera generar esa vía para la detección temprana del cáncer. Por otro lado, la naturaleza multifactorial de la patogénesis molecular de las neoplasias puede ser considerada tanto en el diseño como en la interpretación de los estudios, para ser empleados en la detección temprana del cáncer.

La frecuencia de detección de auto anticuerpos para cada AAT propuesto en cáncer de mama estuvo en un rango de 0.96% a 4.8%. En el caso de Hsp27 no detectamos a ningún paciente seropositivo, coincidiendo esta información con lo reportado por Fanelli A.M. y cols. (116) donde citan “la determinación serológica de este biomarcador es improbable a ser útil en la detección y seguimiento de pacientes con cáncer de mama”. Sin embargo existe otro reporte dado por Conroy et al. (72) donde reportaron la presencia de auto anticuerpos para Hsp27 con una sensibilidad del 37.8% y mostrando una asociación de la tasa de mortalidad más baja en mujeres con auto anticuerpos para Hsp27 que en aquellas que carecen de tales auto anticuerpos.

De manera individual la mayor detección que tuvimos fue para el AAT p53 con 4.8% de sensibilidad y especificidad del 100%, este valor es bajo comparándolo con lo reportado por otros investigadores, como Chapman et al. (56) donde lo consideran como un AAT prometedor con potencial de diagnóstico cuando sea incorporado en un ensayo de auto anticuerpos en un panel de AAT's.

P53 es una proteína importante en la regulación del ciclo celular y apoptosis, en muchos tipos de cáncer se ha observado que esta proteína se encuentra sobre-expresada y/o mutada por lo que la presencia de auto anticuerpos pudiera deberse a estos dos factores, aunque en este trabajo solo detectamos auto anticuerpos generados por sobre-expresión de proteínas.

La baja sensibilidad de detección de auto anticuerpos hacia AAT's propuestos pudiera deberse a que no existen auto anticuerpos ya que el sistema inmunológico se encuentra abatido en la línea de defensa contra estas proteínas sobre expresadas, esto se sugiere ya que las muestras de suero son de personas en su mayoría en estadio III, donde ya existe inclusive invasión a nódulos. Otra de las razones podría ser que aunque estas proteínas se encuentran sobre expresadas el sistema inmunológico las mantiene dentro del sistema de auto-tolerancia evitando así que pudiera existir una respuesta de auto-inmunidad.

Por otro lado, detectamos auto anticuerpos contra los AAT's en los sueros de sujetos sanos, lo cual no es indicativo de que estos sujetos estén enfermos de cáncer, esta respuesta inmune hacia los AAT's pudo generarse por cualquier otra patología. Estos antígenos están asociados a tumor, es decir tienen una mayor expresión en las células cancerosas pero también se expresan en células sanas, son proteínas constitutivas.

La seropositividad se determinó como el promedio de lectura de los sujetos sanos + 2SD al encontrarse niveles de lectura mayor en los sujetos sanos que en los pacientes, la línea de corte se incrementó, disminuyendo así la sensibilidad de la prueba pero manteniendo nuestra especificidad en un 100%, en el caso de no considerar estas lecturas elevadas, para determinar la reactividad positiva la línea de corte disminuye, incrementando la sensibilidad pero disminuyendo la

especificidad, por lo en este caso se buscó obtener la mayor sensibilidad posible con una especificidad adecuada.

Cuando se evaluaron los paneles no se logró detectar a todos los individuos que de manera individual presentaron reactividad positiva. Lo anterior podría deberse quizás a que cuando se realizan las mezclas de antígenos, las proteínas podrían interaccionar entre ellas dificultando el acceso a los epítopes relevantes para los auto anticuerpos. Por otro lado, existe la posibilidad de competencia de pegado a los pocillos en cada una de las proteínas que conforman las mezclas, de tal manera que quizás, la representación de cada proteína no fue equitativa o pudo verse disminuida respecto al formato de proteínas individuales. Estos factores pudieron contribuir a la pérdida de sensibilidad.

Otro aspecto que debe mencionarse es la elección de un adecuado control positivo. Si bien, se llevaron a cabo distintas propuestas, fue evidente que se obtuvo un buen control para el sistema de ELISA pero no se logró un control positivo para las muestras analizadas. De manera ideal, un control positivo debería permitir identificar que es anticuerpos en los sueros analizados se encuentran viables y que es posible identificar una reacción positiva para un antígeno dado, en diferentes sueros. Por lo que se podría sugerir que un control adecuado debería ser un antígeno frente al cual un amplio espectro de la población mexicana haya generado anticuerpos. Bajo esta perspectiva, un antígeno de vacuna como BCG (*Mycobacterium bovis*) podría ser de utilidad. Resulta interesante que diversos trabajos citados no mencionen claramente algún referente para el control positivo.

No obstante esta investigación representa una primera aproximación para población mexicana con cáncer de mama desde una perspectiva inmunológica. Los resultados obtenidos sientan la base para continuar con esta área de estudio de gran utilidad para una patología como lo es el cáncer de mama.

VII. CONCLUSIONES

En esta investigación se propusieron 12 AAT's para su estudio frente a muestras de suero provenientes de pacientes femeninas con cáncer de mama. Se propusieron un conjunto de 5 proteínas antigénicas (CEA, c-Myc, Ciclina B1, p53 y hsp27) las cuales estaban reportadas como antígenos asociados a tumor. Este grupo de proteínas en las células tumorales se han encontrado sobre-expresadas en su mayoría o bien, con localización aberrante. Además, se propusieron 7 proteínas (DJ1, PRXD6, Nm23, eIF5A, Hsp70, Ki67 y GLO1) las cuales fueron seleccionadas con base en resultados previos en nuestro grupo de investigación, donde se identificó su expresión diferencial entre el tejido sano y tejido con cáncer en mujeres mexicanas con cáncer de mama. Se logró identificar que un solo antígeno tiene una frecuencia no mayor al 5% para detección de auto-anticuerpos en pacientes con cáncer de mama, con lo cual, bajo las condiciones establecidas en la muestra analizada, ninguno de estos AAT pudiera servir como biomarcador en el cáncer de mama de manera individual, sin embargo, podría sugerirse que cuando se encuentran en un panel la sensibilidad se ve incrementada debido a la señal aditiva de las interacciones individuales con las diferentes proteínas.

De esta manera, se detectaron 21 pacientes que presentaron reactividad positiva para al menos un AAT seleccionado en pacientes con cáncer de mama. Los resultados de sensibilidad fueron bajos en relación con los reportados en la literatura lo cual lo atribuimos a diversas posibilidades, en primer lugar el estadio en el cual se encuentran las muestras pues corresponden a un estado avanzado de cáncer por lo que el sistema inmune para estos AATs pudiera estar abatido, no así para algunos otros antígenos, sin embargo no descartamos el hecho de que estos AATs aquí propuestos tengan una sensibilidad mayor en etapas iniciales del cáncer de mama.

VIII. APÉNDICE (Preparación de Soluciones).

PBS 10X

Pesar 80g de NaCl 137 mM, 2 g de KCl 2.7 mM, 11.5 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4.3mM y 2 g KH_2PO_4 1.4 mM, aforar a 1 lt con agua destilada y agitar hasta disolver. El pH se ajusta a 7.4. Se esteriliza en autoclave.

PBS 1x-Tween al 0.05%

Medir 250 ml de PBS1x y agregar 125 μl de Tween 20, mezclar lentamente hasta homogenizar por completo.

Buffer de Carbonatos 0.2M pH 9.5

Na_2CO_3 0.2M

Pesar 2.12g de Na_2CO_3 , aforar a 100 ml con agua destilada y disolver.

NaHCO_3 0.2M

Pesar 1.68g de NaHCO_3 , aforar a 100ml con agua destilada y disolver.

Una vez listas las soluciones, al buffer de NaHCO_3 0.2M adicionar lentamente y en agitación el buffer de Na_2CO_3 0.2 M hasta obtener pH 9.5.

Solución Bloqueadora 1%

Pesar 1g de BSA, aforar a 100ml con PBS 1x y mezclar hasta homogenizar por completo. Almacenar a 4°C.

Solución de Sustrato

Cada set de tabletas cuando se disuelven en 20 ml de agua generan 0.4mg/ml de OPD, 0.4 mg/ml de peróxido de urea y 0.05M de fosfocitrato, pH 5.

Colocar una tableta papel de aluminio plateado, (OPD) en frasco color ámbar que contenga 20 ml de agua destilada y agitar hasta disolver, posteriormente colocar una tableta de papel de aluminio dorado (peróxido de urea) y agitar hasta disolver.

La solución está lista para usarse. Para mejores resultados emplear la solución dentro de la primera hora de preparación.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Cancer Mondial, International Agency for Research on Cancer, IARC, (<http://www-dep.iarc.fr>).
2. Laurence Zitvogel*, Antoine Tesniere. "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion" *Nature Reviews Immunology*.2006. 10(6):715-727.
3. Stassi, G. et al."Thyroid cáncer resistance to chemotherapeutic drugs vía autocrine production of interlukin-4 and interleukin-10". *Cáncer res.* 63, 6784-6790 (2003).
4. Muraoka-cook, R., Dumont, N. et al. "Dual role of transforming grow factor β in mammary tumorigenesis and metastatic progression". *Clin Cáncer Res.* 11, 937-943s (2005).
5. Green, D. R. & Kroemer, G."The pathophysiology of mitochondrial cell death" *Science* 305, 626-629 (2004).
6. Liu, K., Caldwell, S et al. "Immune selection and emergence of aggressive tumor variants as negative consequences of Fas-mediated cytotoxicity and altered IFN- γ -regulated gene expression2 *Cáncer res.* 65, 4376-4388 (2005).
7. Ichiki, Y. et al. "Simultaneous celular and humoral immune response against mutated p53 in a patient with lung cáncer" *J. Immunol* 172, 4844-4850 (2004).
8. Vogelstein B, Kizler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nature*. 2004, 10(8):789-799.
9. Kopans D, Breast Imaging, 2nd ed., 1999, Lippincott-Raven, Philadelphia. EUA.
10. Levi F, Bosetti C, Lucchini F, Negri E, and La Vecchia C," Monitoring the decrease in breast cancer mortality in Europe". *Eur. J. Cancer Prevention* 2005, 14(6): 497-502
11. Brandam M. and Villaseñor Y. " Detección del cancer de mama: estado de la mamografía en México" *Cancerología* 1 (2006) 147-162.

12. Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J." Breast cancer in Mexico: a pressing priority". Rep. Health Matt 2008; 16(32):113-123.
13. Peto R. "Breast cancer deaths down 25% in year2000 at ages 20-69 years". Lancet.2000. 355: 1822.
14. Herrera-Gomez A. Manual de Oncologia y Procedimientos Medicoquirurgicos. Mc GrawHill Interamericana Editores S.A. de C.V., México 2000.
15. López-Camarillo, C. "¿Qué es el cáncer de mama?" Genómicas hoy. Nov.2008: 12-16.
16. Perou,CM., Eisen, MB. "Molecular portraits of human breast tumors". Nature 2000;406:747-752.
17. Foekens, JA., Atkins, D. et al. "Multicenter validation of a gene expression- based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cáncer". J Clin Oncol 2006; 24:1665-1671.
18. Arrechea, M. García, V. "Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics". An. Sist. Sanit. Navar. 2011; 34 (2): 219-233.
19. Imigo, F., Mansilla, E. "**Molecular Classification of breast cáncer**". **Cuad. Cir. 2011; 25: 67-74.**
20. Carrasco, M. Gomez, H."Factores pronósticos en cáncer de mama, estadio clínico temprano (I-IIa) sometidos a cirugía como tratamiento de inicio".Carcinos Volumen 3, Número 2, Diciembre 2013.
21. Estadios del cáncer de mama. Instituto Nacional del Cancer de los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU. www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/seno/Patient/page2.
22. American Cáncer Society."Breast cancer facts & figures 2007-2008". Atlanta: American Cancer Society, Inc., 2008.
23. Meropol NJ, Schulman KA. Perspectives on cancer care. J Clin Oncol 2007; 25(2):169.

24. Felicia Marie Knaul, Héctor Arreola-Ornelas, Enrique Velázquez, Javier Dorantes, Óscar Méndez, Leticia Ávila-Burgos.” El costo de la atención médica del cáncer mamario: el caso del Instituto Mexicano del Seguro Social”. *Salud Pública Méx.* 2009; vol. 51, supl 2. S286-S295.
25. Alejandro Mohar, Enrique Bargalló, Ma. Teresa Ramírez, Fernando Lara, Arturo Beltrán-Ortega MC.” Recursos disponibles para el tratamiento del cáncer de mama en México”. *Salud Pública Méx.* 2009; vol. 51, supl 2. S263-S269.
26. Duffy Michael J. Serum Tumor markers in Breast Cancer: Are they of Clinical Value? *Clinical chemistry* 2006.52:3; 345-351.
27. Chang-Kyu H, Young Y. “Tumor-associated autoantibodies as diagnostic and prognostic biomarker” *BMB Reports*, 2012 November; 677-685.
28. Tan EM, Zhang J.” Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system”. *Immunol Rev.* 2008; 222:328–40.
29. Tan EM, Shi FD. “Relative paradigms between autoantibodies in lupus and autoantibodies in cancer”. *Clin Exp Immunol.* 2003; 134:169–177.
30. Liu W, Wang P, Li Z. “Evaluation of Tumour-Associated Antigen (TAA) miniarray in Immunodiagnosis of colon Cancer”. *Clinical Immunology* 2008. 69; 57-63.
31. Fernandez Madri F.” Autoantibodies in breast cáncer será: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesi”s. *Cancer Letters* 2005;230. 187-198.
32. Disis ML, Pupa SM, Gralow JR, et al.” High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer”. *J Clin Oncol* 1997;15:3363–7.
33. Nakamura H, Hinoda Y, Nakagawa N, et al. “Detection of circulating anti-MUC1 mucin core protein antibodies in patients with colorectal cancer”. *J Gastroenterol* 1998;33:354–361.

34. Traina A, Agostara B, Marasa L, et al. "HER2/neu expression in relation to clinicopathologic features of breast cancer patient"s. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1089:159–167.
35. Introduction to Antibodies, Chemicon International, Inc., www.chemicon.com USA.
36. Peña Martínez, J., Inmunología on-line, Universidad de Córdoba y Sweden Diagnostics, España <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia>
37. Zola, H., Thomson, P.R., 2001, Monoclonal Antibodies: Diagnostic Uses, *Encyclopedia of life sciences*, Macáncer de mamaillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net
38. Liddell, J.E., 2002, Enzyme-linked Immunsorbent Assay (ELISA) to Measure Pure Protein, *Encyclopedia of life sciences*, Macáncer de mamaillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net
39. Price, C.P., 2001, Immunoassay, *Encyclopedia of life sciences*, Macáncer de mamaillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net
40. Sahin, U., Tureci, O., et al. "Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11810-11813.
41. Ehrlich, J.R., Qin, S. and liu, B. C. "The 'reverse capture' autoantibody microarray: a native antigen-based platform for autoantibody profiling" *Nat. Protoc.* 2006. 1: 452-460.
42. Elmore, J. G., Armstrong, K., Lehman, C. D. and S. W. Fletcher, "Screening for breast cancer," *Journal of the American Medical Association*, vol. 293, no. 10, pp. 1245–1256, 2005.
43. Smith-Bindman, R., Chu, P., Miglioretti D. L. et al., "Physician predictors of mammographic accuracy," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 97, no. 5, pp. 358–367, 2005.

44. Mavroforou, A., Mavrophoros, D. and Michalodimitrakis, E. "Screening mammography, public perceptions, and medical liability," *European Journal of Radiology*, vol. 57, no. 3, pp. 428–435, 2006.
45. Iáñez P. E. "Curso de inmunología general 1. Introducción al sistema inmune" Departamento de Microbiología Universidad de Granada, 1999.
46. Piura Ettie and Piura Benjamin. "Autoantibodies to tumor-associated antigens in breast carcinoma". *Journal of Oncology*. Vol. 2010.
47. Miriam Reuschenbach, Magnus von Knebel Doeberitz, and Nicolas Wentzensen." A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens". *Cancer Immunol Immunother*. 2009; 58(10): 1535–1544.
48. Cocucci E., Racchetti G., Meldolesi J. "Shedding microvesicles: artefacts no more". *Trends Cell Biol.*(2009);19:43–51.
49. Murphy M. A., O'Leary J. J., Cahill D. J. "Assessment of the humoral immune response to cáncer". *J. Proteomics*. (2012); 75:4573–4579
50. Kurtenkov O, Klaamas K, Rittenhouse-Olson K, et al. "IgG immune response to tumor-associated carbohydrate antigens (TF, Tn, alphaGal) in patients with breast cancer: impact of neoadjuvant chemotherapy and relation to the survival". *Exp Oncol* 2005;27:136–40.
51. Kurtenkov O, Klaamas K, Mensdorff-Pouilly S, et al." Humoral immune response to MUC1 and to the Thomsen-Friedenreich (TF) glycotope in patients with gastric cancer: relation to survival". *Acta Oncol* 2007; 46:316–323.
52. Hamanaka Y, Suehiro Y, Fukui M, et al. "Circulating anti-MUC1 IgG antibodies as a favorable prognostic factor for pancreatic cancer". *Int J Cancer* 2003; 103:97–100.
53. Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten AA, Kenemans P, et al." Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin". *J Clin Oncol* 2000; 18:574–83.

54. Abendstein B, Marth C, Müller-Holzner E, et al. "Clinical significance of serum and ascitic p53 autoantibodies in epithelial ovarian carcinoma". *Cancer* 2000; 88:1432–7.
55. Lai CL, Tsai CM, Tsai TT, et al. "Presence of serum anti-p53 antibodies is associated with pleural effusion and poor prognosis in lung cancer patients". *Clin Cancer Res* 1998; 4:3025–3030.
56. Chapman, C., A. Murray, J. Chakrabarti et al., "Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis", *Annals of Oncology*, vol. 18, no. 5, pp 868-873, 2007.
57. Jian-Ying Zhang, Casiano A Carlos, Xuan-Xian Peng, "Enhancement of Antibody Detection in Cancer Using Panel of recombinant Tumor-associated Antigens". *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2003. Vol. 12, 136-143.
58. Fonseca-Sanchez, M. et al "Breast cancer proteomics reveals a positive correlation between glyoxalase 1 expression and high tumor grade". *Int J Oncol*. 2012 Aug; 41(2):670-80.
59. Pharaoh, P., N. e. Day, and C. Caldas, "Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta- analysis", *British Journal of Cancer*, vol. 80, no.12, pp. 1968-1973, 1999. Duffy MJ. "CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer". *Ann Clin Biochem* 1999; 36:579–86.
60. Geisler, S., Borresen-Dale, L., Johnsen, H., et al., "TP53 gen mutations predict the response to neoadjuvant treatment with 5-fluorouracil and mitomycin in locally advanced breast cancer", *Clinical Cancer Research*, vol9, no. 15, pp. 5582-5588, 2003.
61. Harris, C., and M. Hollstein, "Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene", *The new England Journal of Medicine*, vol. 329, no. 18, pp. 1318-1327, 1993.
62. Vogl, F., Frey, M. Kreinenberg, R. and I. B. Runnebaum, "Autoimmunity against p53 predicts invasive cancer with poor survival in

- patients with an ovarian mass", British journal of Cancer, vol. 83, no.10, pp.1338-1343, 2000.
63. Hall P. A. and lane, D. P. "p53 In tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? Revisited", journal of Pathology, vol. 172, no. 1, pp. 1-4, 1994.
 64. Davidoff, A. M., Iglehart, J.D. "Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers", Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America, vol. 89, no.8, pp. 3439-3442, 1992.
 65. Schlichtholz, B. Legros, Y. "The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot", Cancer Research, vol. 52, no. 22, pp. 6380-6384, 1992.
 66. Soussi, T. "P53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review", Cancer Research, vol. 60, no. 7, pp. 1777-1788, 2000.
 67. R. Lubin, et al. "Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53: distribution of primary structure and exposure on protein surface", Cancer Research, vol. 53, no. 24, pp. 5872-5876, 1993.
 68. Witkin, S.S. "Heat shock protein expression and immunity: relevance to gynecologic oncology", European Journal of Gynaecological Oncology, vol. 22, no. 4, pp. 249-256, 2001.
 69. Piura, B., Ravinovich, A. "Heat shock proteins and malignancies of the female genital tract", Harefuah, vol. 141, no. 11, pp. 969-1009, 2002.
 70. Ciocca, D. R. and Calderwood, S. K. "Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications," Cell stress and Chaperones, vol. 10, no. 2 pp. 86-103, 2005.
 71. Thor, A., Benz, C. " Stress response protein (srp-27) determination in primary human breast carcinomas: clinical, histologic, and prognostic

correlations", Journal of the National Cancer Institute, vol. 83, no. 3, pp. 170-178, 1991.

72. Conroy, S. E. et al "Antibodies to heat-shock protein 27 are associated with improved survival in patients with breast cancer", British journal of Cancer, vol. 77, no. 11, pp. 1875-1879, 1998.
73. Love S. and King R. "A 27kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer", British Journal of Cancer, vol. 69, no.4, pp. 743-748, 1994.
74. Ciocca DR, Clarke GM, "Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. J. Natl cancer Inst. 85: 570-574. 1993.
75. Tamura Y, Peng P., "Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. Science 278:117-20, 1997.
76. Srivastava PK, Hudono H, "Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. Immunogenetics 39:93-8. 1994.
77. Singh-Juola H, Hilf N, "The heat shock protein gp96: a receptor-targeted cross-priming carrier and activator of dendritic cells". Cell Stress Chaperones 5:462-70, 2000.
78. Chang CL, Tsai YC, "Cancer immunotherapy using irradiated tumor cells secreting heat shock protein 70". Cancer Res 67: 10047-57, 2007.
79. Massa C, Guiducci C., "Enhanced efficacy of tumor cell vaccines transfected with secreted hsp70. Cancer res 64:1502-8, 2004.
80. Wang XY, Arnouk H, "Extracellular targeting of endoplasmic reticulum chaperone glucose-regulated protein 170 enhances tumor immunity to poorly immunogenic melanoma" J Immunol 177:1543-51, 2006.
81. Mambula SS, Calderwood SK "Heat shock protein70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes" J Immunol 177:7849-57, 2006.

82. Theriault JR, Adachi H, "Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70". J Immunol 177:8604-11, 2006.
83. Seiwert TY, Tretiakova M, "Heat shock protein (Hsp). Overexpression in lung cancer and potential as a therapeutic target." Pro Am Assoc cancer Res 46:2387, 2005.
84. Menoret A, Li Z, Niswonger ML, "An endoplasmic reticulum protein implicated in chaperoning peptides to major histocompatibility of class I is an aminopeptidase" J Biol Chem 276: 33313-33318, 2001.
85. Cotterman R., Jin V.X. et al., "N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor", Cancer Research, vol 68, no.23, pp. 9654-9662, 2008.
86. Grandori C., Cowley S.M, "The Myc/Max/ Mad network and the transcription control of cell behavior", Annual Review of Cell and Developmental biology, vol. 16, pp. 653-699 2000.
87. Dominguez-Sola D., Ying C.Y., et. Al "Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc", Nature, vol. 448, no. 7152, pp. 445-451, 2007.
88. Suzuki H., Graziano D. F., "T cell-dependent antibody responses against aberrantly expressed cyclin B1 protein in patients with cancer and premalignant disease", Clinical Cancer Research, vol. 11, no. 4, pp. 1521-1526, 2005.
89. Pines J. and Hunter T. "Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B", Nature, vol. 346, no. 6286, pp. 760-763, 1990.
90. Koziol J.A., Zhang J. Y. et al. " Recursive partitioning as an approach to selection of immune markers for tumor diagnosis", Clinical Cancer Research, vol. 9, no. 14, pp. 5120-5126, 2003.
91. Covini G., Chan E.K.L. "Immune Response to cyclin B1 in hepatocellular carcinoma" Hepatology, vol. 25 no.1, pp.75-80, 1997.

92. Hiroyuki Suzuki, Daniel F., et al "T Cell–Dependent Antibody Responses against Aberrantly Expressed Cyclin B1 Protein in Patients with Cancer and Premalignant Disease" *Clinical Cancer Research*; Vol. 11, 1521–1526, February 15, 2005.
93. Barranco M. S., "Caracterización bioquímica y molecular de una peroxirredoxina mitocondrial de *Pisum sativum*". 2006. pp 27.
94. Benchimol S., Fuks A., et. Al. "Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule" *Cell* 1989; 57(2): 327-34.
95. Molina R., Varak B., "Tumor markers in breast cancer European group on tumor markers recommendations" *Tumour Biol* 2005; 26(6):281-93.
96. Hou MF., Chen YL., et al. "Evaluations of serum CA27-29, CA 15-3 and CEA in patients with breast cancer. *Kaohsiung J Med Sci* 1999; 5(9):520-8.
97. Clinton SR., Beanson KL., et al "a comparative study of four serological tumor markers for the detection of breast cancer" *Biomed Sci Instrument* 2003;39:408-14.
98. Huan-xin L., Sang-Gang W., "Serum levels of CEA and CA15-3 in different molecular subtypes and prognostic value in Chinese breast cancer". *Elsevier The Breast* 23 (2014); 88-93.
99. Harris L., Fritsche H., et al. " American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer" *J Clin Oncol* 2007; 25(33):5287-312.
100. E de Azambuja, Cardoso F., "Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *British journal of Cancer* (2007) 96. 1504-13.
101. Horimoto Y., Atsushi A., et al. "Ki-67 expression and the effect of neo-adjuvant chemotherapy on luminal HER2- negative breast cancer" *BMC Cancer* (2014); 14(1).
102. Clements, c.m. MacNally R.S., et al. "DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional

- master regulator Nrf2” *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 10, 2006; 103(41) 15091– 15096.
103. Kawate T., Iwaya K., et al. “DJ-1 protein expression as a predictor of pathological complete remission after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients” *Breast Cancer Res Treat*; 2013. 139(1); 51-9.
 104. Xiao-Lin Z., Zhang-Feng W., et al. “DJ-1: A novel independent prognostic marker for survival in glottis squamous cell carcinoma” *Cancer Science*; 2010. Vol. 101 no. 5 pp. 1320-25.
 105. Niitsu N, Okabe-Kado J, et al. “Plasma levels of the differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein and their clinical implications in acute myelogenous leukemia”. *Blood* 2000; 96:1080–6.
 106. Okabe-Kado J, Kasukabe T, et al “Extracellular NM23 protein promotes the growth and survival of primary cultured human acute myelogenous leukemia cells”. *Cancer Sci* 2009; 100:1885–94.
 107. Steeg PS, Bevilacqua G, et. Al. “Altered expression of NM23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2 Ela inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res* 1988; 48:6550–4.
 108. Niitsu N, Honma Y, Iijima K, et al. “Clinical significance of nm23-H1 proteins expressed on cell surface in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*” 2003; 17:196–202.
 109. Andrew, J.L., Farhan I. M., et. al “Nm23-H1 Indirectly Promotes the Survival of Acute Myeloid Leukemia Blast Cells by Binding to More Mature Components of the Leukemic Clone” *Cancer Research*, pp 1177-1186 December 17, 2010
 110. Henderson A. and Hershen J. “Eucaryotic translation initiation factor (eIF) 5A stimulates protein synthesis in *Sacharomyces cerevisiae*” *PNAS* April 19, 2011 vol. 108 no. 16 6415–6419 .
 111. Memin E., Hoque M. et al. “Blocking eIF5A modification in cervical cancer cells alters the expression of cancer-related genes and suppresses cell proliferation”. *Cancer Res.* June 2014, 15; 74(2):552-62.

112. Inoye Y., Maeta K. and Nomura W. "Glyoxalase system in yeasts: structure, function and physiology". *Semin Cell Dev Biol.* 2011 May; 22(3):278-84.
113. Hu X., Yanq x. et al. "Glyoxalase 1 is up-regulated in hepatocellular carcinoma and is essential for HCC cell proliferation" *Biotechnol Lett.* 2014 Feb; 36(2):257-63.
114. Bair WB 3er, CM. et al. "GLO1 overexpression in human malignant melanoma" *Melanoma Res.* 2010 Apr; 20(2):85-96.
115. Wang Y., Kuramitsu Y. et al. "Glyoxalase I (GLO1) is up-regulated in pancreatic cancerous tissues compared with related non-cancerous tissues". [Anticancer Res.](#) 2012 Aug; 32(8):3219-22.
116. Fanelli, M. A., Cuello D. et al " Serological detection of heat shock protein Hsp27 in normal and breast cancer patients". *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 1998 vol. 7, 791-795.
117. Sahin U., Tureci O., Schmitt H., et al. "Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host". *Proc. Natl. Acad.Sci.U.S.A.* (1995); 92:11810–11813.
118. Li, J., Wang, J., et al "Immunodiagnostic value of combined detection of autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in pancreatic cancer". *Clinical immunology* 2011 342-349.

