

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**“Estudio de la expresión antigénica y de la respuesta inmune inducida por la mucina 1 (MUC1) en el cáncer de mama”**

**Tesis doctoral**

**Bioquímica Marina T. Isla Larrain**

**La Plata, 2006**

Este trabajo de tesis se realizó bajo la Dirección de la Prof. Dra. Amada Segal-Eiras, la Co-dirección de la Prof. Dra. María Virginia Croce y el Asesoramiento Científico del Prof. Dr Alberto Fossati y fue desarrollado en el Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

*A mis padres*

*A mis hijos Federico, Juan Pablo y María Florencia*

Mi agradecimiento:

A la Dra. Amada Segal-Eiras y a la Dra. María Virginia Croce por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en la investigación científica y por su constante estímulo y su apoyo permanente.

Al Dr. Alberto Fossati por su asesoramiento y su desinteresada colaboración.

A mi familia y amigos por su incondicional acompañamiento en toda esta etapa.

A mis compañeros actuales: Andrea, Daniel, Ezequiel, Marina, Martín A. y a los que ya no están por su constante ayuda. Quiero agradecer especialmente a Martín Rabassa por su generosa colaboración en la obtención de las muestras, diseño de gráficos y compaginación de la presente Tesis.

A la Lic. Sandra Demichelis por su invaluable aporte en el análisis estadístico.

A los profesionales y personal del Hospital Interzonal Gral. de Agudos "Gral. San Martín", del Hospital Italiano de La Plata y del Hospital Alemán de Capital Federal que contribuyeron a la concreción de este trabajo.

A la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP y a la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por permitirme el empleo de los lectores de ELISA.

Al Dr. Néstor Carri por su gran predisposición y ayuda en la obtención de las fotografías presentes en esta Tesis.

Al Téc. Juan Carlos Molina por su desinteresada colaboración en la obtención de cortes histológicos.

A la Dra. Rita Fernández del Laboratorio del Servicio de Alergia del HIEAyC "San Juan de Dios" por su contribución en el diseño de ELISA.

Resultados parciales incluidos en este trabajo de Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. Croce MV, Isla-Larrain MT, Price MR, Segal-Eiras A. Detection of circulating mammary mucin (MUC1) and MUC1 immune complexes (MUC1-CIC) in healthy women. *Int J Biol Markers*. 2001 Apr-Jun;16(2):112-20.
2. Croce MV, Isla-Larrain MT, Capafons A, Price MR, Segal-Eiras A. Humoral immune response induced by the protein core of MUC1 mucin in pregnant and healthy women. *Breast Cancer Res Treat*. 2001 Sep;69(1):1-11.
3. Croce MV, Isla-Larrain MT, Rua CE, Rabassa ME, Gendler SJ, Segal-Eiras A. Patterns of MUC1 tissue expression defined by an anti-MUC1 cytoplasmic tail monoclonal antibody in breast cancer. *J Histochem Cytochem*. 2003 Jun;51(6):781-8.
4. Croce MV, Isla-Larrain MT, Demichelis SO, Gori JR, Price MR, Segal-Eiras A. Tissue and serum MUC1 mucin detection in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2003 Oct;81(3):195-207.
5. Croce MV, Isla-Larrain M, Tur R, Rabassa ME, Segal-Eiras A. Antigenic differences between metastatic cells in bone marrow and primary tumours and the anti-MUC1 humoral immune response induced in breast cancer patients. *Clin Exp Metastasis*. 2004;21(2):139-47.

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN .....	11
HISTORIA DEL CÁNCER.....	11
DEFINICIÓN DE NEOPLASIA.....	13
CÁNCER DE MAMA.....	14
Clasificación del cáncer de mama.....	17
A- Carcinomas no invasores.....	17
B- Carcinomas invasores (infiltrantes).....	18
Grados histológicos del cáncer de mama .....	19
Estadíos del cáncer de mama.....	20
Evolución clínica .....	20
Factores que influyen sobre el pronóstico de la enfermedad (en ausencia de metástasis a distancia).....	21
MUCINAS (MUCs).....	25
Conceptos generales .....	25
Clasificación de mucinas.....	27
Estructura y función de MUC1 .....	28
Localización de MUC1 .....	31
MUC1 y cáncer .....	32
Expresión de MUC1 .....	34
Glicosilación de MUC1 .....	37
O-glicosilación en tumores .....	40
Respuesta inmune humoral hacia MUC1 .....	43
Respuesta inmune celular hacia MUC1 .....	44
OBJETIVOS .....	47
MATERIALES Y MÉTODOS .....	48
PACIENTES .....	48
Muestras tumorales .....	49
• Muestras tisulares:.....	49
• Muestras séricas: .....	50
• Muestras de médula ósea (MO): .....	50
Muestras de mujeres sin patología neoplásica maligna .....	50
• Muestras tisulares:.....	50

• Muestras séricas: .....	50
ANTICUERPOS MONOCLONALES (AcMo) .....	51
ANTICUERPOS CONJUGADOS.....	51
SUSTRATOS CROMOGÉNICOS.....	53
MÉTODOS.....	54
Inmunohistoquímica (IHQ).....	54
Inmunocitoquímica (ICQ).....	55
Preparación de fracciones subcelulares .....	55
SDS-PAGE y Western blot .....	56
Procesamiento de la MO .....	57
Detección de MUC1 sérica por CASA (Cancer Associated Serum Antigen) .....	58
Determinación de la reproducibilidad .....	58
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para la determinación de complejos inmunes circulantes que contienen moléculas de MUC1 (MUC1-CIC).....	59
Determinación de la reproducibilidad del ELISA .....	60
ELISA para la detección de anticuerpos reactivos con el centro proteico de MUC1.....	62
Especificidad del ELISA para la determinación de anticuerpos anti-MUC1 .....	63
ELISA sobre líneas celulares establecidas para investigar la especificidad de anticuerpos.....	63
Análisis estadístico .....	63
RESULTADOS .....	65
Expresión de MUC1 en muestras tisulares.....	65
C595 .....	70
Determinaciones en muestras séricas (Tabla 7).....	70
Niveles séricos de MUC1 .....	70
Niveles séricos de MUC1-CIC.....	72
Niveles séricos de anticuerpos libres anti-MUC1 .....	77
Determinaciones en muestras control pre- y post- vacunación.....	80
MUC1 tisular .....	81
MUC1 sérica .....	81
Análisis de pacientes de estadio IV .....	82
Expresión antigénica de MUC1-CT .....	85
Muestras de tejidos tumorales .....	85

Muestras benignas y normales .....	87
Análisis de fracciones subcelulares por SDS-PAGE y Western Blot .....	91
Aislamiento de células tumorales de médula ósea. Expresión antigénica de tumores primarios .....	93
Antígenos asociados a tumor e histogénicos de médula ósea .....	94
MUC1 y antígenos carbohidratos asociados en MO .....	94
Expresión antigénica de células MCF-7 .....	96
Niveles de MUC1 y Ac anti-MUC1 en muestras séricas .....	99
Tipo Histológico .....	100
I .....	100
Estudios de correlación .....	99
Determinación de MUC1 y MUC1-CIC en mujeres sanas .....	101
Análisis de las muestras de mujeres embarazadas .....	106
Determinación de Ac libres en mujeres sanas (Tabla 7) .....	108
Análisis comparativo de MUC1 y Ac libres anti- MUC1 en mujeres sanas .....	111
Estudios de inhibición para determinar la especificidad de IgM- e IgG- MUC1 ....	112
Reactividad de Ac séricos con células .....	115
DISCUSIÓN .....	116
CONCLUSIONES.....	131
BIBLIOGRAFÍA .....	134



## **ABREVIATURAS**

**ABTS:** 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolina, 6-ácido sulfónico)

**aC:** antes de Cristo

**Ac:** anticuerpo

**AcMo:** anticuerpo monoclonal

**CMH:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**CPA:** célula presentadora de antígeno

**CT:** cola citoplasmática (cytoplasmic tail)

**CTL:** linfocitos T citotóxicos

**DAB:** diaminobencidina

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**ELISA:** Enzimoinmunoensayo (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

**FGF:** Factor de crecimiento fibroblástico

**ICQ:** Inmunocitoquímica

**Ig:** inmunoglobulinas

**IHQ:** inmunohistoquímica

**IRMA:** Ensayo inmunorradiométrico

**MO:** médula ósea

**pb:** pares de bases

**PBS:** Buffer fosfato salino

**PBS-BSA:** Buffer fosfato salino- albúmina sérica bovina

**PBST:** Buffer fosfato salino-Tween 20 0.05%

**PDGF:** Factor de crecimiento plaquetario

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

**SFB:** Suero fetal bovino

**sLex:** sialil Lewis x

**TGF $\beta$** : Factor de crecimiento tumoral  $\beta$

**TGF $\alpha$ /EGF**: Factor de crecimiento tumoral  $\alpha$

**VNTR**: número variable de repeticiones en tandem

# **INTRODUCCIÓN**

## **HISTORIA DEL CÁNCER**

El desarrollo del cáncer en los seres humanos involucra una compleja sucesión de eventos que usualmente ocurren durante un tiempo prolongado. Durante este proceso multifacético, el genoma de las células tumorales incipientes adquiere alelos mutantes de proto-oncogenes, genes supresores de tumor y otros genes que controlan, directa o indirectamente, la proliferación celular. En el genoma de muchos tumores malignos de distinta localización, así como en diferentes cánceres del mismo tejido, se encuentran combinaciones variables de alelos mutantes. Un número creciente de estos genes contribuye en la producción secuencial de los distintos pasos de la transformación neoplásica. Durante los últimos 25 años, se han enumerado complejas combinaciones de fenotipos y se han catalogado miles de alteraciones moleculares asociadas con esta enfermedad (Hahn et al, 2002).

La primera descripción del cáncer en los seres humanos fue hallada en un papiro egipcio escrito entre 3000 y 1500 años aC. que se refería a tumores de mama. Asimismo, no sólo en manuscritos sino también en restos óseos del Antiguo Egipto se encontraron evidencias de cáncer. Un vestigio muy antiguo de cáncer humano perteneciente a momias fue encontrado en un hueso que presumiblemente presentaba osteosarcoma, tumor de elevada malignidad de los osteoblastos. El más antiguo vestigio de un cáncer humano encontrado fue en un cráneo femenino que data de la Edad de Bronce (1900-1600 aC). Por otra parte, también en restos provenientes del continente americano tal como en una momia pre-incaica de alrededor del 2400 aC, se hallaron lesiones sugestivas de melanoma. Estos hallazgos demostraron que no se trataba de una enfermedad de la Edad Moderna industrializada, como antes se creía.

Otros hallazgos realizados por el antropólogo Louis Leaky en 1932 determinaron que el tumor maligno más antiguo fue hallado en antecesores del hombre actual y pertenecían a un *Homo erectus* o a un *Australopithecus*, y se sugirió que se trataba de un linfoma de Burkitt.

A Hipócrates se le adjudica ser el primero en reconocer la diferencia entre tumores benignos y malignos. Sus escritos describen esta enfermedad en muchos sitios del cuerpo. Los vasos sanguíneos alrededor de los tumores le recordaban las patas del cangrejo, por lo que denominó a esta enfermedad *Karkinos*, que en griego significa cangrejo y que hoy se conoce como cáncer.

En el siglo II, el médico griego Galeno, que ejercía su profesión en Roma, fue considerado el primer oncólogo; en la mayoría de los casos, luego de un diagnóstico de cáncer, consideraba al paciente como incurable.

Durante el siglo XVII, el cirujano holandés Helvetius realizó cirugías de mama. Por su parte, el cirujano escocés John Hunter (1728-1793) sugirió que algunos cánceres podrían ser removidos si el tumor primitivo no había invadido aún el tejido adyacente.

En 1761, Giovanni Morgagni, de Papua, fue el primero en realizar autopsias y de esa manera comenzó a diagnosticar el cáncer post-mortem.

En el mismo año, John Hill describió que el hábito de fumar era una causa ambiental del cáncer, mientras que Sir Percivall Pott, en 1775, descubrió el cáncer de escroto, enfermedad ocupacional de deshollinadores. A partir de esa época, comenzaron a reconocerse ciertas causas ambientales como partícipes de la inducción de algunos tipos de cáncer.

En el siglo XIX nació la Oncología científica con el descubrimiento del microscopio; Rudolf Virchow, conocido como el fundador de la Patología Celular, fue quien sentó las bases científicas para la Patología Moderna. A partir de ese momento comenzó la detección del daño causado por el cáncer y, a la vez, el desarrollo progresivo de la

cirugía de tumores. Simultáneamente, un cirujano inglés, Stephen Paget teorizó que las células metastásicas del tumor eran como “semillas” que se distribuían a través del torrente sanguíneo a distintas partes del cuerpo, pero sólo crecían en órganos (como si fuese “tierra”) que les sería compatible; esta teoría estableció las bases para comprender el proceso de metástasis.

En la década de 1880-1890, William Stewart Halsted desarrolló una extensa operación de remoción de la mama, músculos subyacentes y nódulos linfáticos axilares en una paciente con cáncer conocida como mastectomía radical. En 1896, el físico alemán Profesor Wilhelm Conrad Roentgen descubrió los rayos X que después se utilizaron para diagnóstico y fue desde esa época que comenzaron a utilizarse las radiaciones para el tratamiento del cáncer.

En el caso del cáncer de mama, luego de la realización de la mastectomía y remoción de ganglios axilares, la tasa de supervivencia hasta 10 años ascendió de 10% en 1920 al 50% en 1950.

Posteriormente en 1975, un grupo de investigadores de la Universidad de California descubrió que ciertos genes de células normales se hallaban alterados en las células tumorales.

El Dr. Steven Narod y su equipo de la Universidad de Mc Gill de Montreal hallaron un gen marcador de cáncer de mama denominado BRCA 1. Un 5 a 10% de las mujeres con cáncer de mama portan este marcador y tienen un 85% de riesgo de contraer cáncer de mama comparado con el 11% de la mujer que no posee este gen.

## **DEFINICIÓN DE NEOPLASIA**

Según el oncólogo británico Rupert Willis, la neoplasia es una masa anormal de tejido, cuyo crecimiento excede al del tejido normal y no hay coordinación entre los mismos, y que persiste en forma continua tras finalizar el estímulo que inició la patología. Existen

dos tipos de neoplasias o tumores: benignos y malignos. Sus componentes básicos son el parénquima, constituido por las células neoplásicas en proliferación y el estroma de sostén, formado por tejido conectivo y vasos sanguíneos.

Carcinoma es el término con el que se conoce a los tumores malignos originados en los epitelios de revestimiento, adenocarcinomas cuando se localizan en el epitelio glandular, y sarcomas a las neoplasias malignas de estirpe mesenquimatosa. Cáncer es la enfermedad que padece un paciente portador de una neoplasia maligna.

## **CÁNCER DE MAMA**

El cáncer de mama en la Argentina causa alrededor del 20% de las muertes por cáncer en la mujer (Figura 1). Existen diversas características importantes respecto a esta enfermedad; por ejemplo, se han detectado diferencias geográficas: en nuestro país presenta una alta incidencia (Figura 2). Según datos del año 2002, la tasa de mortalidad era del 21% (Figura 3).

El cáncer de mama es infrecuente antes de los 25 años; hay un aumento sostenido hasta la menopausia, seguido de un ascenso más lento durante la menopausia. Se ha establecido que el riesgo de contraer esta enfermedad maligna aumenta con la menarca temprana, así como con la menopausia tardía. Se observa más frecuentemente en nulíparas que en multíparas y se ha determinado que el riesgo es mayor en mujeres con más de 30 años al momento de nacer el primer hijo. Las mujeres obesas tienen más riesgo de contraer la enfermedad y esto se atribuye a la síntesis de estrógenos en los depósitos grasos. El riesgo aumenta moderadamente con la administración de estrógenos exógenos en dosis elevadas en mujeres menopáusicas. También aumenta el riesgo cuando preexisten en la mama alteraciones fibroquísticas con hiperplasia epitelial atípica y en casos de carcinoma contralateral o de endometrio.

**Figura 1:** Porcentaje de mortalidad por cáncer en mujeres en la Argentina.



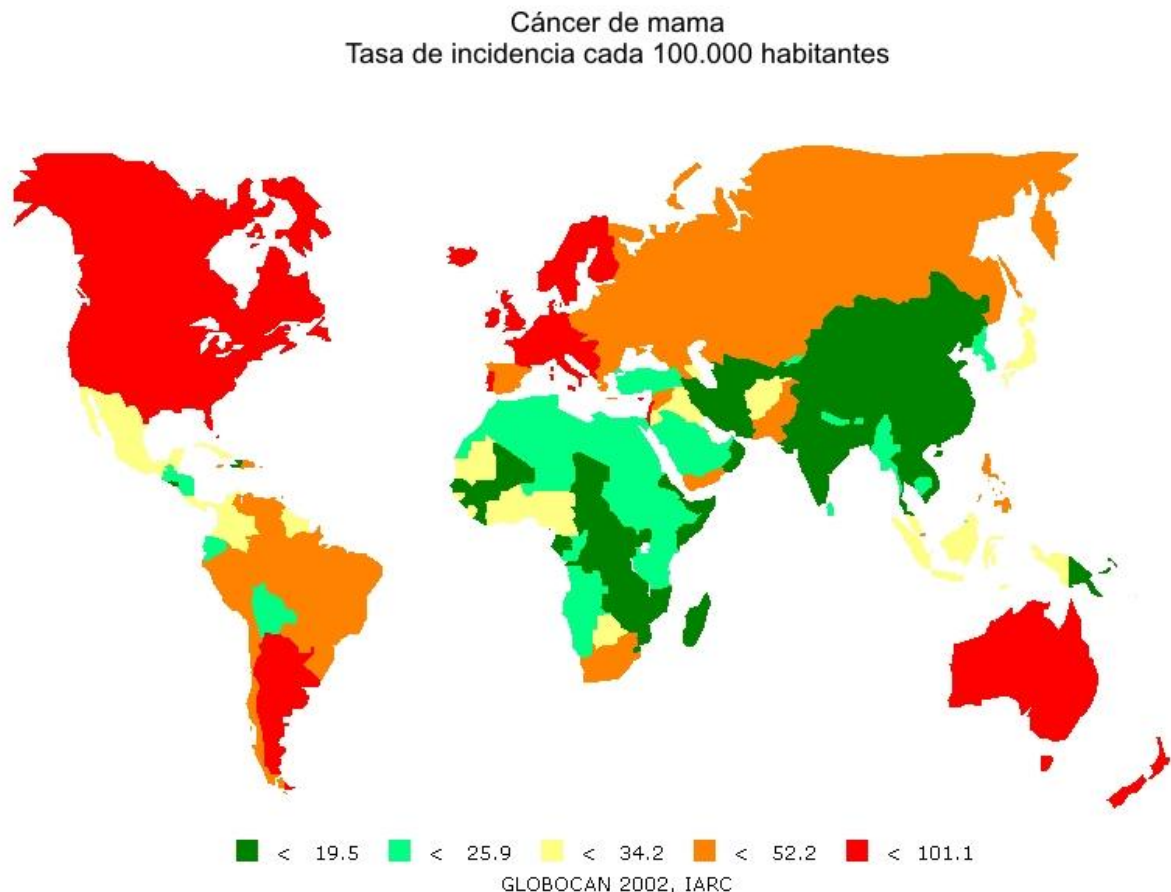
GLOBOCAN 2002, IARC

La predisposición genética es bien definida, está asociada a la presencia de los genes BRCA1 y BRCA2 en pacientes con cáncer de mama familiar. Existen casos raros asociados al síndrome de Li-Fraumeni causados por mutaciones en la línea germinal del gen supresor de tumor p53. Los pacientes heredan la mutación en un alelo del gen con posterior pérdida del alelo wild-type restante. Con frecuencia estos pacientes desarrollan tumores que afectan corteza adrenal, cerebro, mama, sarcomas y leucemias (Darton SJ, 1998).

El desequilibrio hormonal manifestado por un exceso de estrógenos endógenos afecta a aquellas pacientes con cáncer de mama que presentan receptores de estrógenos. Estas hormonas inducen la secreción de factores de crecimiento (Factor de crecimiento tumoral  $\alpha$ /Factor de crecimiento epidérmico, TGF $\alpha$ /EGF; Factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF; Factor de crecimiento fibroblástico, FGF; Factor de

crecimiento tumoral  $\beta$ , TGF $\beta$ ) por parte de las células tumorales que participarían en un mecanismo autócrino de progresión tumoral.

**Figura 2:** Tasa de incidencia de cáncer de mama cada 100.000 habitantes.



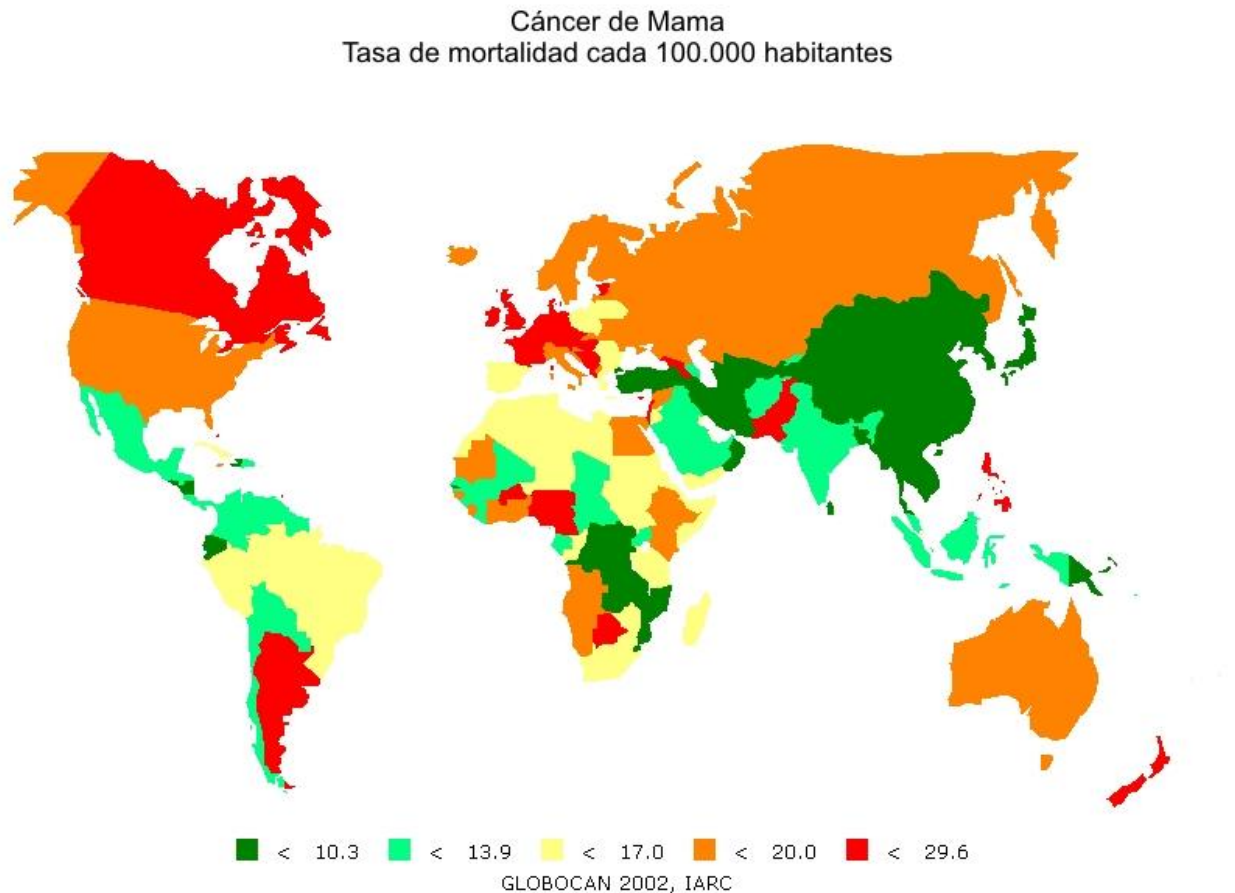
Existen factores ambientales que afectan el desarrollo de la enfermedad, principalmente diversos componentes dietéticos. En el ratón, el virus MMTV (murine mammary tumor virus) causa cáncer de mama, pero no existen pruebas fehacientes de la existencia de un virus análogo en humanos.

La contribución de oncogenes y genes supresores de tumor está dada por una amplificación del gen *erbB2/neu* y la expresión de su producto proteico (p185), también la amplificación de *int-2*, *c-ras* y *c-myc* y mutaciones somáticas en *p53* y *pRb*.

Los sitios de metástasis a distancia en el cáncer de mama son los pulmones, los huesos, el hígado, las glándulas suprarrenales, el cerebro y las meninges.



**Figura 3:** Tasa de mortalidad por cáncer de mama cada 100.000 habitantes.



### **Clasificación del cáncer de mama**

El cáncer de mama es más frecuente en la mama izquierda que en la mama derecha y raramente es bilateral o secuencial en la misma mama. El 50% surge en el cuadrante superoexterno, el 10% en cada uno de los restantes cuadrantes y el 20% en la región central o subareolar.

Según la Organización Mundial de la Salud, la clasificación de los tipos histológicos tumorales es la siguiente:

#### **A- Carcinomas no invasores**

- Carcinoma intraductal *in situ* (CDIS)
- Carcinoma intraductal con enfermedad de Paget

- Carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS)

El CDIS representa el 20-30% de los cánceres de mama. Se define como una población maligna de células que carecen de la capacidad de invadir a través de la membrana basal, por lo que son incapaces de desarrollar metástasis a distancia. Sin embargo, se pueden diseminar por todo el sistema ductal y afectar a todo un sector o a toda la mama. Si llega a la piel del pezón produce el aspecto clínico de la enfermedad de Paget del pezón. Se dividen en 5 subtipos: comedocarcinoma, sólido, cribiforme, papilar y micropapilar.

El CLIS se manifiesta como una proliferación en uno o más conductos terminales, conductillos (acinos) o ambos a la vez, de células laxamente unidas, a veces algo mayores de lo normal, con raras mitosis, con núcleos ovalados o redondos con nucleolos pequeños. Es una lesión marcadora de carcinoma invasor.

## **B- Carcinomas invasores (infiltrantes)**

- Carcinoma ductal NOS (del inglés *not other specified*: sin otra especificación)

- Carcinoma ductal infiltrante con enfermedad de Paget

- Carcinoma lobulillar infiltrante

- Carcinoma medular

- Carcinoma coloide (mucinoso)

- Carcinoma tubular

- Carcinoma adenoide quístico

-Carcinoma apócrino

-Carcinoma papilar infiltrante

El carcinoma ductal NOS es el tipo más frecuente (65-80%) de los cánceres de mama.

Suele presentar un aumento del estroma de tejido fibroso que otorga alta consistencia al tumor, por ello se denomina carcinoma escirro; está constituido por células malignas

de revestimiento de los conductos dispuestos en cordones, nidos sólidos de células, túbulos, glándulas y masas celulares anastomosadas y formas mixtas que incluyen a todos ellos; las células invaden claramente el estroma del tejido conectivo. Se clasifican, según su grado de diferenciación, en bien diferenciados, moderada y pobremente diferenciados.

Por su parte, los lobulillares probablemente surgen de los conductillos terminales del lobulillo mamario; el tumor tiene consistencia gomosa. Las células se ubican en hebras laxamente dispuestas en grupos o cordones a través del tejido fibroso. Se presentan también patrones mixtos ductales y lobulillares.

El carcinoma medular representa entre el 1 y el 5% de los carcinomas mamarios. El tumor tiene consistencia blanda y las células forman como sincicios que ocupan el 75%, con núcleos vesiculares, nucleolos llamativos y mitosis frecuentes. Es común la presencia de un infiltrado linfocitario entre moderado e intenso.

La variedad mucinosa tiene aspecto gelatinoso y puede presentarse en forma pura o mixta.; presenta acumulaciones de mucinas en las que se visualizan células malignas flotantes.

### **Grados histológicos del cáncer de mama**

Los grados histológicos del cáncer de mama pueden clasificarse de la siguiente forma:

- No metastatizantes: carcinoma intraductal o lobulillar *in situ*.
- Infrecuentemente metastatizantes: carcinoma mucinoso puro o coloide, carcinoma medular, adenocarcinoma tubular y el carcinoma adenoide quístico.
- Moderada o altamente metastatizantes: carcinoma intraductal con enfermedad de Paget, carcinoma ductal NOS, carcinoma ductal infiltrante con enfermedad de Paget, carcinoma lobulillar infiltrante, carcinoma apócrino y el carcinoma papilar infiltrante.

## **Estadíos del cáncer de mama**

Esta clasificación fue establecida por el Comité Conjunto Norteamericano de Estadificación del Cáncer.

- 0- CDIS o CLIS (tasa de supervivencia a los 5 años del 92%).
- I- Tumor menor o igual a 2 cm (incluido el carcinoma *in situ* con microinfiltración, sin afectación ganglionar y metástasis (tasa de supervivencia a los 5 años del 87%).
- II- Tumor menor o igual a 5 cm. con ganglios axilares afectados móviles sin metástasis a distancia o mayores de 5 cm sin ganglios axilares afectados móviles y sin metástasis a distancia (tasa de supervivencia a los 5 años del 75%).
- III- Tumores de cualquier tamaño con afectación cutánea, fijación al pectoral y pared torácica, con ganglios axilares y de la cadena mamaria interna afectados, y sin metástasis a distancia (tasa de supervivencia a los 5 años del 46%).
- IV- Tumores con metástasis a distancia (incluidos los ganglios linfáticos supraclaviculares ipsolaterales) (tasa de supervivencia a los 5 años del 13%).

## **Evolución clínica**

Inicialmente el cáncer de mama suele ser descubierto por la propia paciente o por su médico, en forma de una masa solitaria e indolora en la mama, o bien mediante la detección de alteraciones mamográficas en pruebas de detección selectiva. Cuanto mayor es la paciente que presenta una lesión única de mama, mayor es la probabilidad de que esta masa sea un cáncer. En promedio, los carcinomas infiltrantes palpables tienen un diámetro de 2 a 3 cm cuando se detectan por primera vez, y

aproximadamente la tercera parte de los mismos ya presenta en este momento diseminación a los ganglios linfáticos axilares o de otras localizaciones. Por el contrario, los carcinomas infiltrantes detectados mediante mamografía tienen un diámetro promedio de 1 cm, y menos de la quinta parte de los mismos presenta metástasis axilares cuando se detecta. El CDIS se detecta con mayor frecuencia en forma de calcificaciones mamográficas y sólo rara vez como una masa palpable o radiológica, o bien como un exudado a través del pezón. La detección del CDIS es importante ya que es una lesión limitada a la mama que en la mayor parte de los casos se puede curar mediante tratamiento local.

Una vez que han aparecido metástasis a distancia la curación es improbable, aunque se pueden conseguir remisiones y efectos paliativos a largo plazo, especialmente en las mujeres con tumores que responden a hormonas.

#### **Factores que influyen sobre el pronóstico de la enfermedad (en ausencia de metástasis a distancia)**

- **Metástasis en ganglios linfáticos:** El estado de los ganglios linfáticos axilares constituye el factor pronóstico más importante. Cuando no están afectados, la tasa de supervivencia libre de enfermedad a los 10 años es del 70 al 80%; este porcentaje disminuye hasta el 35 a 40% cuando existen metástasis en uno a tres ganglios. El tamaño de las metástasis (macrometástasis frente a micrometástasis menores de 0.2 cm) y la presencia de infiltración en la cápsula del ganglio son también indicadores de mal pronóstico.
- **Enfermedad localmente avanzada:** Los tumores que infiltran la piel o el músculo esquelético se asocian con frecuencia a la afectación de órganos a distancia o por contigüidad.

- **Tamaño del tumor:** Más del 98% de las mujeres con tumores menores de 1 cm y más del 96% de las mujeres con tumores menores de 2 cm (sin metástasis ganglionares) sobreviven durante 5 años. Sin embargo, los tumores muy pequeños pueden ser capaces, aunque raras veces, de producir metástasis a distancia.
- **Subtipo histológico:** La supervivencia a los 30 años de mujeres con tipos especiales de carcinomas infiltrantes (tubular, coloide, medular, lobulillar y papilar) es superior al 60 % en comparación con la tasa menor del 20 % en las mujeres con carcinomas convencionales (ductales). Los carcinomas tubular y coloide presentan un pronóstico excepcionalmente bueno, pero si el tipo histológico no es puro, el tamaño tumoral es grande, el grado nuclear es alto, o están afectados los ganglios linfáticos, se incrementa la posibilidad de un mal pronóstico.
- **Grado tumoral:** El sistema modificado de Bloom y Richardson combina el grado nuclear, la formación de túbulos y el índice mitótico. Más del 80% de las mujeres con tumores de grado I y menos del 60% de las mujeres con grado II y III sobreviven durante 16 años.
- **Receptores para estrógenos y progesterona (ER y EP):** Entre el 50 y el 85 % de los carcinomas de mama presenta receptores estrogénicos, y estos tumores se observan con mayor frecuencia en mujeres postmenopáusicas. El 70% de los tumores con ER+ sufre regresiones tras el tratamiento hormonal, mientras que sólo el 5 % de los tumores ER- presenta esta respuesta. Las tasas más elevadas de respuesta se observan en tumores ER+ y EP+. Los carcinomas con niveles elevados de receptores hormonales muestran un pronóstico ligeramente mejor que aquellos que carecen de receptores.
- **Infiltración de luces linfáticas y capilares:** En ocasiones, las células malignas se pueden observar en el interior de vasos linfáticos o capilares alrededor del tumor. Esta observación se relaciona estrechamente con la presencia de metástasis

ganglionares y constituye un factor de mal pronóstico en las mujeres que carecen de metástasis en ganglios linfáticos ya que indican progresión de la enfermedad. La presencia de células tumorales en los vasos linfáticos de la dermis se asocia fuertemente con el aspecto clínico de carcinoma inflamatorio y conlleva un pronóstico muy malo, con una supervivencia a los 3 años del 3 al 10%.

- **Tasa de proliferación:** La proliferación se puede cuantificar mediante citometría de flujo (como la fracción de fase S), mediante el índice de marcado con timidina tritiada, a través del recuento de mitosis o mediante la detección inmunohistoquímica de proteínas celulares producidas durante el ciclo celular. Los tumores con una tasa de proliferación elevada presentan un pronóstico peor, aunque todavía no se ha establecido cuál es el método más confiable para valorar esta tasa de proliferación.
- **Contenido de ADN:** La cantidad de ADN en las células tumorales se puede determinar mediante citometría de flujo o mediante citometría de imagen en cortes tisulares. Los tumores con un índice de ADN igual a 1 presentan la misma cantidad de ADN que las células diploides normales, aunque pueden existir alteraciones importantes del cariotipo. Los tumores aneuploides son aquellos que presentan índices de ADN anómalos y tienen un pronóstico ligeramente peor.
- **Expresión de oncogenes o pérdida de la expresión de genes de supresión tumoral:** Las modificaciones en la expresión de c-erb-B2 (Her2/neu), c-myc, ras p21 e INT2, p53 y NM23 se asocian a un mal pronóstico y se observan con frecuencia en los carcinomas que ya presentan otros factores de mal pronóstico.
- **Angiogénesis:** En la mayor parte de los estudios se ha demostrado una correlación entre la densidad de luces vasculares y la aparición subsiguiente de metástasis.

- **Proteasas:** Las proteasas del estroma pueden estar implicadas en la infiltración tumoral al degradar la matriz extracelular; en algunos estudios se ha demostrado que la estimación del contenido de proteasas en el tumor se correlaciona con un mal pronóstico.

Aunque el estado de los ganglios linfáticos axilares representa el factor pronóstico más importante, entre el 20 y el 30% de las pacientes con ganglios linfáticos histológicamente negativos sufren recidivas y fallecen debido a su enfermedad en el transcurso de 10 años. A pesar de los factores pronósticos mencionados, es imposible predecir la evolución de cada caso individual. Por esta razón, continúa la investigación para obtener marcadores biológicos mejores y modalidades terapéuticas más eficaces. Los enfoques terapéuticos actuales son el control local y regional mediante combinaciones de cirugía (mastectomía o cirugía de conservación de la mama) y radiación postquirúrgica; por otra parte, se puede inducir el control sistémico mediante tratamiento hormonal, quimioterapia o ambos. La axila, luego de la resección de los ganglios linfáticos también se puede tratar adecuadamente mediante radioterapia. Entre las nuevas estrategias terapéuticas se incluyen la inhibición (mediante agentes farmacológicos o anticuerpos específicos) de los receptores de factores de crecimiento de membrana (por ej. Her2/neu), de las proteasas del estroma y de la angiogénesis.



## **MUCINAS (MUCs)**

### **Conceptos generales**

El término “mucina” fue introducido por De Saussure (1835) refiriéndose inicialmente a los componentes glicoproteicos principales de la capa de mucus que recubre las superficies de los epitelios glandulares como un gel viscoelástico (Strous et al, 1992). Hacia 1970, las mucinas de las glándulas submaxilares ovina y bovina fueron consideradas modelos estructurales para esta subclase de glicoproteínas, dado que poseían los rasgos característicos de una mucina con elevado contenido de hidratos de carbono (más del 50% de su peso), con elevada densidad de O-glicosilación y sialilación y un centro peptídico con Ser y Thr a los que se unen oligosacáridos simples y principalmente ácidos. Este modelo consiste en una densa capa de O-glicanos hidrofílica, cargada negativamente, y concuerda con la función de la mucina de formar un gel viscoelástico que otorga una adecuada protección fisicoquímica a las superficies epiteliales. Hacia la década de 1980 se halló por medio de metodología más avanzada y de instrumental sofisticado que la glicosilación era mucho más compleja que lo esperado (Lamblin et al, 1984; Mutsaers et al, 1986). A su vez, se identificaron epitopes asociados a tumor en mucinas de células malignas y en sus secreciones. Todas las mucinas descritas hasta ese momento tenían la característica común de poseer repeticiones de péptidos en serie (tandem) (Tabla 1). A partir de 1990, a través de clonación de cADN, se estableció la secuencia de la primera de las mucinas, la MUC1 (Gendler et al, 1990). La localización cromosómica de los genes MUC fue definida: 1q21 (MUC1), 7q22 (MUC3, MUC11, MUC12, MUC17), 3q29 (MUC4, MUC20), 11p15.5 (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6), 4q13-21 (MUC7), 12q24.3 (MUC8), 1p13 (MUC9), 3q13.3 (MUC13), 11p14.3 (MUC15), 19p13.2 (MUC16), 7q22 (MUC17), 3q29 (MUC20) (Balducci et al, 2004).

**Tabla 1:** Series de mucinas humanas (MUCs) (Extraído de Baldus et al, 2004).

MUC	M/S	DD	Loc. Crom.	Repeticiones en tandem (VNTR)	
				Nº	Secuencia (número de aa)
<b>MUC1</b>	M,S	-	1q21	pm	AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP(20)
<b>MUC2</b>	S	+	11p15.5	16	PTTTPITTTTTTTPPTPTGTQT(23) PPTTTPSPPTTTTTTP(16)
<b>MUC3</b>	M,S	-	7q22	pm	HSTPSFTSSITTTETTS (17)
<b>MUC4</b>	M,S	-	3q29	pm	TSSASTGHATPLPVT(16)
<b>MUC5AC</b>	S	+	11p15.5	pm	TTSAPTTS (8)
<b>MUC5B</b>	S	+	11p15.5	11	Repeticiones irregulares de 29 aa
<b>MUC6</b>	S	+	11p15.5	pm	Repeticiones de 169 aa
<b>MUC7</b>	S	-	4q13-21	6	TTAAPPTPSATTPAPPSSSAPPE(23)
<b>MUC8</b>	S	?	12q24.3	?	TSCRPLQEGTRV (13) y TSCRPLQEGTPGSRAHALS RRGHRVHELPTSSPGGDTGF(41)
<b>MUC9</b>	?	?	1p13	pm	GEKTLTPVGHQSVTP(15)
<b>MUC11</b>	M	?	7q22	?	SGLSEESTTSHSSPGSTHTTLSPASTTT(28)
<b>MUC12</b>	M	?	7q22	?	SGLSQESTTFHSSPGSTETTLSPASTTT(28)
<b>MUC13</b>	M	?	3q13.3	10	Repeticiones de 151 aa
<b>MUC15</b>	M	?	11p14.3	?	Repeticiones de 330 o 307 aa
<b>MUC16</b>	M	?	19p13.2	9	Repeticiones de 156 aa
<b>MUC17</b>	M	?	7q22	?	Repeticiones de 59 aa
<b>MUC20</b>	M	?	3q29	?	Repeticiones de 19 aa

M: transmembrana; S: secretoria

pm: polimorfismo genético con respecto al número de repeticiones en tandem

DD: dominio D

La definición de mucina está aún abierta a debate debido a que existen isoformas provenientes de corte y empalme (splicing) alternativo, como MUC1/Y que no contiene un “dominio repetitivo” (Zrihan-Licht et al, 1994) y se parece a otras glicoproteínas

unidas a membrana del tipo de las mucinas. Algunas de éstas como las moléculas de adhesión celular descritas recientemente GlyCAM1 y MadCAM1, fueron designadas como mucinas a pesar de carecer del dominio repetitivo (Baldus et al, 2004). Finalmente, coexisten dos definiciones de mucinas, referentes ambas a parámetros estructurales:

- 1) las MUCs que presentan dominios repetitivos como una característica común sumado a una densa O-glicosilación,
- 2) las mucinas en un sentido más amplio, caracterizadas meramente por el rasgo general de que expresan agrupaciones de O-glicanos en Ser y Thr (Baldus et al, 2004).

### **Clasificación de mucinas**

Según Baldus et al (2004), se clasifican en dos grupos basándose en aspectos estructurales y rutas biosintéticas:

1-Mucinas unidas a membrana (MUC1, MUC3, MUC4, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 y MUC20): exhiben secuencias hidrofóbicas o “dominios transmembrana” responsables de su anclaje en la bicapa lipídica. El péptido C terminal es intracitoplasmático.

2-Mucinas secretorias (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7 y MUC8): excepto la MUC7, poseen uno o varios dominios D tipo Factor de Von Willebrand, péptidos ricos en Cys, que cumplen la función de oligomerización de monómeros de mucina y su empaquetamiento en vesículas secretorias (Pérez-Vilar et al, 1999). Se ha visto que, al menos para MUC1, la mucina existe también como una isoforma secretoria y que la MUC1 unida a membrana puede ser liberada al espacio extracelular.

La MUC1 también es conocida bajo otras denominaciones como antígeno HMFG, antígeno DF3, antígeno H23, PAS-0, DUPAN-2, CA1, NPOP, antígeno NCRC-11, antígeno de membrana epitelial (EMA), MAM-6, mucina epitelial polimórfica (PEM),

mucina urinaria reactiva con la lectina peanut (PUM), SGA, epitectina, episialina, CD227 (Hanisch et al, 2000; Baldus et al, 2004).

### **Estructura y función de MUC1**

La MUC1 es la mucina más estudiada en relación a la malignidad de ciertos tumores. Es una glicoproteína de transmembrana de alto peso molecular (PM) expresada en la superficie celular apical de una variedad de células epiteliales glandulares y ductales normales y también en algunas células hematopoyéticas (Hanisch et al, 2000) desde la gestación hasta la adultez. Está altamente expresada por la mayoría de los adenocarcinomas humanos y se asocia con mal pronóstico (Mc Guckin et al, 1995).

Durante el embarazo y la lactancia, existe una sobreexpresión de MUC1 en el tejido mamario (Finn et al, 1995; Burchell et al, 1987) y se ha demostrado un aumento de MUC1 sérica en mujeres embarazadas (Devine et al, 1994; Von Mensdorff- Pouilly et al, 2000; Croce et al, 2001).

Se ha sugerido que esta mucina cumple importantes roles en la morfogénesis epitelial y en la progresión de tumores (Kenemans et al, 1989). La regulación hormonal de la MUC1 en el endometrio sugiere que participaría en la implantación del embrión (Hey et al, 1994; Surveyor et al, 1995), debido a que presenta propiedades adhesivas y antiadhesivas, que, por otra parte, son necesarias para facilitar la invasión de las células tumorales (Ligtenberg et al, 1992; Wesseling et al, 1995).

Esta glicoproteína presenta tres dominios (Figura 4):

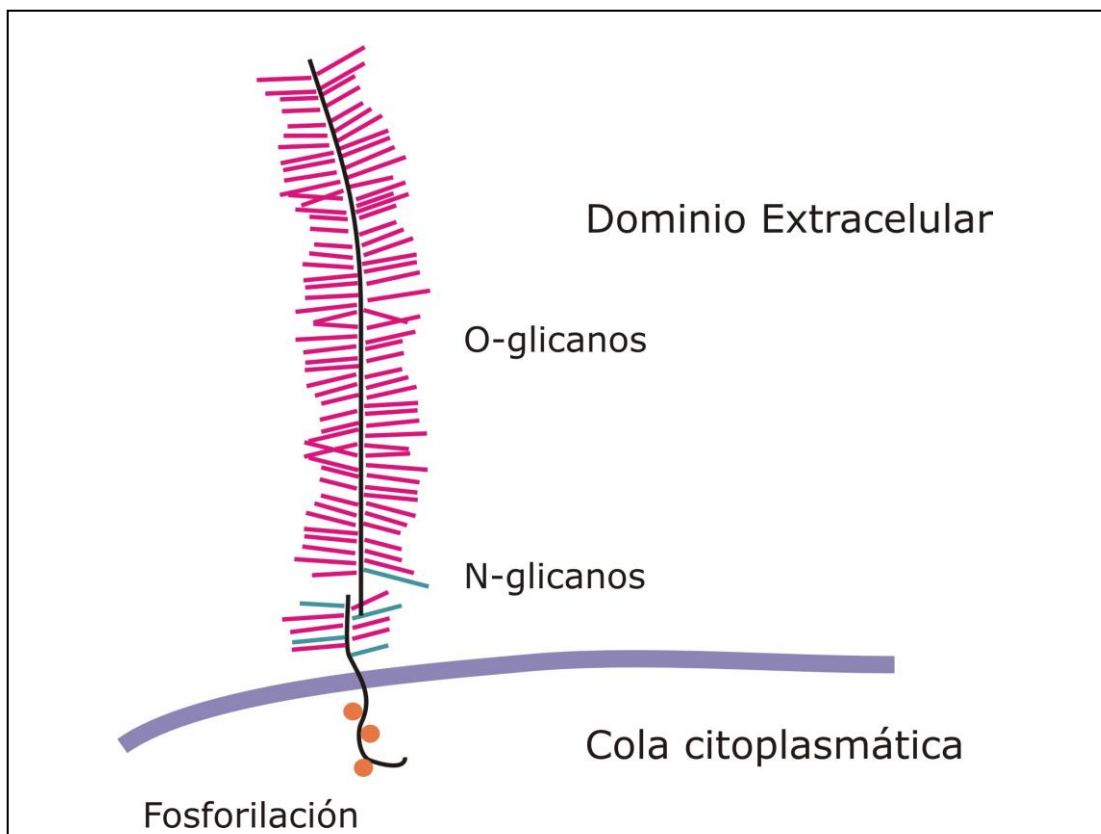
- a- Extracelular: posee un centro proteico polimórfico que consiste en un número variable de repeticiones en tandem (VNTR), rico en Ser, Thr y Pro (regiones ricas en STP) (Gendler et al, 1995) de 20 aminoácidos (aa) con la secuencia AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP. (Gendler et al, 1990) En cada repetición en tandem (TR) existen 5 residuos de O-glicosilación potencial en Ser y Thr.

Contiene también módulos SEA (del inglés *Sea-urchin-sperm-protein*, *Enterokinase*, *Agrin*, otras moléculas que poseen la misma secuencia) en el dominio extracelular.

b- Transmembrana: es el dominio hidrofóbico de 31 aa que incorpora la glicoproteína a la membrana celular.

c- Intracitoplasmático: posee una estructura conservada, la cola citoplasmática (CT, del inglés *cytoplasmic tail*) que representa el dominio C terminal de la glicoproteína. Contiene 69 aa y 7 residuos de Tyr (Gendler et al, 2001).

**Figura 4:** Esquema de la glicoproteína MUC1.



Originalmente en epitelios normales se le asignó un rol exclusivamente protector por su dominio extracelular que forma una estructura rígida y elongada que se extiende sobre otras moléculas del glicocálix. Por medio de estudios de transfección se ha demostrado

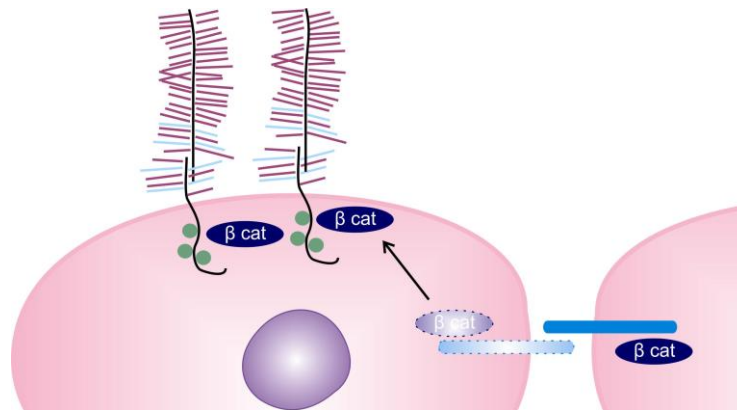
que la alta expresión de MUC1 puede interferir con la adhesión célula-célula y célula-sustrato (Wesseling et al, 1995; Wesseling et al, 1996; Yamamoto et al, 1997). Su función consiste además en la lubricación de las superficies epiteliales, ya que sirve para retener partículas y desechos celulares.

También interactúa con filamentos de actina del citoesqueleto y se le adjudica una función en los eventos de transducción de señales a través de la cola citoplasmática integrada a la membrana celular (Zrihan-Licht et al, 1984; Pandey et al, 1995; Yamamoto et al, 1997; Li et al, 1998; Baruch et al, 1999).

Se han identificado ligandos potenciales de MUC1: CD54 (ICAM1) que se une por la región VNTR (Kam et al, 1998); selectinas endoteliales que se unen a sialil Lewis x (sLex) (Zhang et al, 1996); CD169 (sialoadhesina) que es una lectina de macrófagos que reconoce ácido siálico presente en la MUC1 (Nath et al, 1999); Grb2, que, por sus dominios SH2 se asocia a residuos de Tyr fosforilados (Pandey et al, 1995);  $\beta$ -catenina, que interacciona con una secuencia de CT, impidiendo así la interacción entre  $\beta$ -catenina y E-cadherina que se da normalmente entre células adyacentes (Yamamoto et al, 1995; Gendler et al, 2001) (Figura 5) y es controlada por la GSK-3 $\beta$  (Glucógeno sintetasa quinasa 3 $\beta$ ) que fosforila las Ser adyacentes a Pro en una secuencia determinada (Li et al, 1998). Además, se determinó que la MUC1 activa la vía de las quinasas receptoras de señal extracelular (ERK1/2) por medio de fosforilación de Tyr en CT (Kim et al, 2004).

La mayoría de los AcMo que reconocen esta mucina están dirigidos hacia el centro proteico (Price et al, 1998), en cambio, se han desarrollado sólo dos anticuerpos efectivos para la detección de la CT (Croce et al, 2003; Croce et al, en prensa, 2006).

**Figura 5:** Impedimento de la interacción entre E-cadherina y  $\beta$ -catenina por MUC1.



### Localización de MUC1

La expresión de MUC1 en epitelios normales está restringida a la membrana apical de casi todas las células glandulares y ductales (Hanisch et al, 2000), en las secreciones y en vesículas o vacuolas. Esta mucina se encontró en los acinos y conductos de las glándulas mamarias, en los conductos de las glándulas salivales, en el epitelio escamoso del esófago, en las células parietales y lumbinales del estómago, en los acinos y conductos del páncreas, en los conductos biliares del hígado, en el epitelio respiratorio, en los túbulos distales del riñón y tubos colectores, en el urotelio de la vejiga, constituyendo éste uno de los principales sitios de donde se aisló MUC1, en el epitelio de la glándula prostática, en la rete testis, en el endometrio, en las células columnares y caliciformes del intestino delgado y en el epitelio del colónico (Zotter et al, 1987; Winterford et al, 1999).

Se la detectó tanto en linfocitos T CD4+ como en CD8+ activados in vitro (Agrawal et al, 1998); en células dendríticas HLA-DR+Lin- derivadas de monocitos activados in vitro y de la sangre; con baja o moderada expresión en todos los monocitos circulantes. También se describió su presencia en algunas células B circulantes. En la médula ósea entre el 2-10% de las células mononucleares expresan MUC1 (Brugger et al, 1999).

También se halló en granulocitos (Dent et al, 1999); en células plasmáticas (Zotter et al, 1987); en células de linaje eritroide (Brugger et al, 1999); en células de mieloma (Takahashi et al, 1994) y en linfomas (Chittal et al, 1997). Basados en observaciones en células epiteliales, los roles posibles de MUC1 en células hematopoyéticas incluyen la protección de la superficie celular, la modulación de la adhesión y la señalización en respuesta a ligandos específicos (Mc Guckin et al, 2000).

Por medio de inmunohistoquímica (IHQ) se halló en células dendríticas foliculares (Kamoshida et al, 1998).

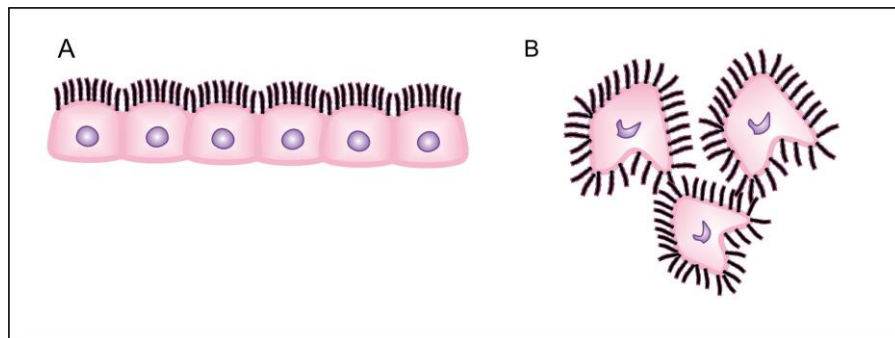
### **MUC1 y cáncer**

En el año 1991, Brockhausen et al describieron que la glicosilación de MUC1 en células malignas está frecuentemente alterada respecto de la del tejido normal. En las células malignas, MUC1 pierde su polaridad y se expresa en forma aberrante en el citoplasma y en toda la membrana (Finn et al, 1995) (Figura 6). Entre otros factores, esta característica de la MUC1 tumoral se propuso como paso inicial en la cascada metastásica de células tumorales, debido a los efectos antiadhesivos que exhiben las moléculas de MUC1, dado que se extienden una longitud entre 200-500 nm y defienden la superficie celular tanto estérica como electrostáticamente. En este sentido se presume que previene la formación de contactos célula-célula mediados por E-cadherinas o célula-matriz mediados por integrinas. Se ha considerado que esta molécula podría ser la responsable del escape de las células tumorales metastatizantes de la vigilancia inmunológica del huésped (Hanisch et al, 2000). Se demostró in vitro la interacción de MUC1 con ICAM1 (Regimbald et al, 1996) y con E-selectina, por lo que participaría en la colonización de células tumorales metastatizantes (Hanisch et al, 2000).



Asimismo, en las metástasis hematógicas se ha implicado a los antígenos sialil Lewis x (sLex) y sialil Lewis a (sLea) que son ligandos de selectinas del endotelio vascular, lo que permitiría que las células tumorales interactúen con el endotelio, lo atraviesen y se dirijan a diferentes sitios produciéndose así la invasión y metástasis (Takada et al, 1993; Kannagi et al, 1998).

**Figura 6:** Expresión de MUC1 en células normales (A) y en células neoplásicas (B).



Se ha descrito cierta resistencia por parte de las células tumorales hacia las células NK y a los linfocitos T citotóxicos (Hanisch et al, 2000). En concordancia con estos resultados se encontró que MUC1 induce una anergia local de las células T e inhibición de la proliferación celular que es reversible por interleuquina 2 (IL-2) (Agrawal et al, 1998).

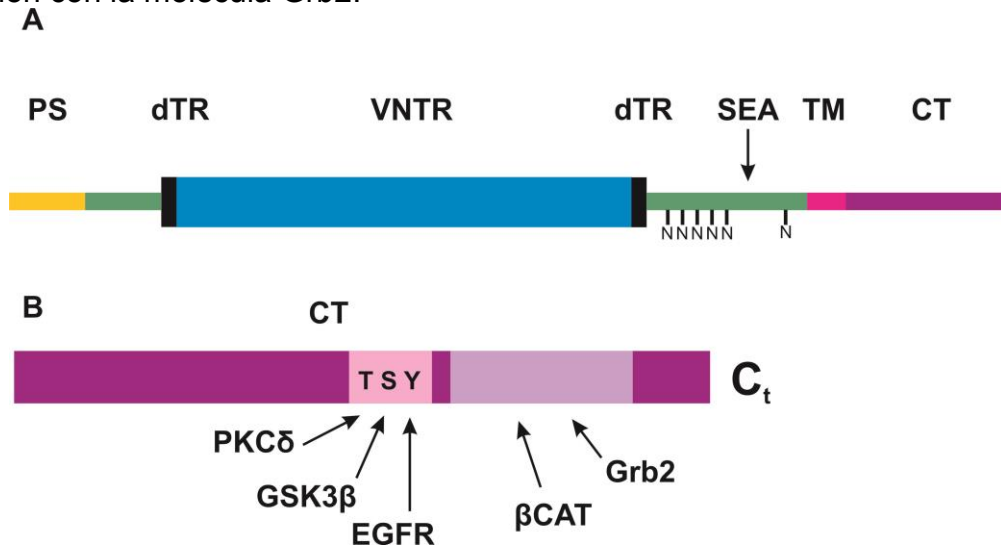
Finalmente, la MUC1 parece ser la responsable principal en la estrategia de defensa del tumor debido a su sobreexpresión en las células tumorales; parte de la MUC1 es secretada o liberada de la superficie de la célula tumoral y se la ha detectado en el suero de pacientes con cáncer de mama. Por otra parte, esta mucina podría tener un rol en enfermedades inflamatorias benignas (Parmley et al, 1998). También se ha detectado en forma circulante en embarazadas (Mc Guckin et al, 1995; Croce et al, 2001).

## **Expresión de MUC1**

Mediante la clonación y secuenciación de cADN derivado de varias líneas celulares, se obtuvo la estructura primaria y aspectos conformacionales de la región proteica de MUC1. En el gen de MUC1 existe un polimorfismo génico codificado por un número variable de repeticiones en tandem (Lancaster et al, 1990). Contiene un alto contenido (82%) de pares de bases G/C; también se ha descrito cierto polimorfismo en regiones no repetitivas (Pratt et al, 1996). Este gen contiene siete exones y produce variantes de splicing alternativo (Gendler et al, 1990; Ligtenberg et al, 1990; Wreschner et al, 1990; Lan et al, 1990). La forma mayormente expresada de MUC1 utiliza los 7 exones y constituye una proteína de transmembrana de tipo 1. En el segundo de los exones se encuentra toda la región de secuencias repetitivas de 60 pb que codifica para las repeticiones de icosapéptidos (VNTR) y abarca entre el 50-80% de la parte proteica de la molécula de MUC1 (Figura 7).

El polimorfismo que presenta esta molécula consiste en la existencia de 20-120 unidades repetitivas, siendo entre 40-80 el número de VNTR más frecuente en la población del norte de Europa. La región VNTR de MUC1 está flanqueada por repeticiones cortas de péptidos anómalos. El extremo N terminal contiene el péptido señal, y el resto de la proteína posee 480 aminoácidos. La MUC1 se sintetiza como una larga cadena polipeptídica que se cliva en 2 subunidades en el aparato de Golgi que se reasocia para formar un heterodímero unido por uniones no covalentes pero sensibles al SDS (Ligtenberg et al, 1992). La mayor de las subunidades comprende el dominio extracelular, con un PM 300-700kD; la menor tiene un PM de 25kD y está constituida por el dominio transmembrana de 31 aa y la CT, que contiene el C terminal, compuesta por 69 aa. Por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), frecuentemente se evidencia una doble banda correspondiente a productos de distinto PM de los diferentes alelos.

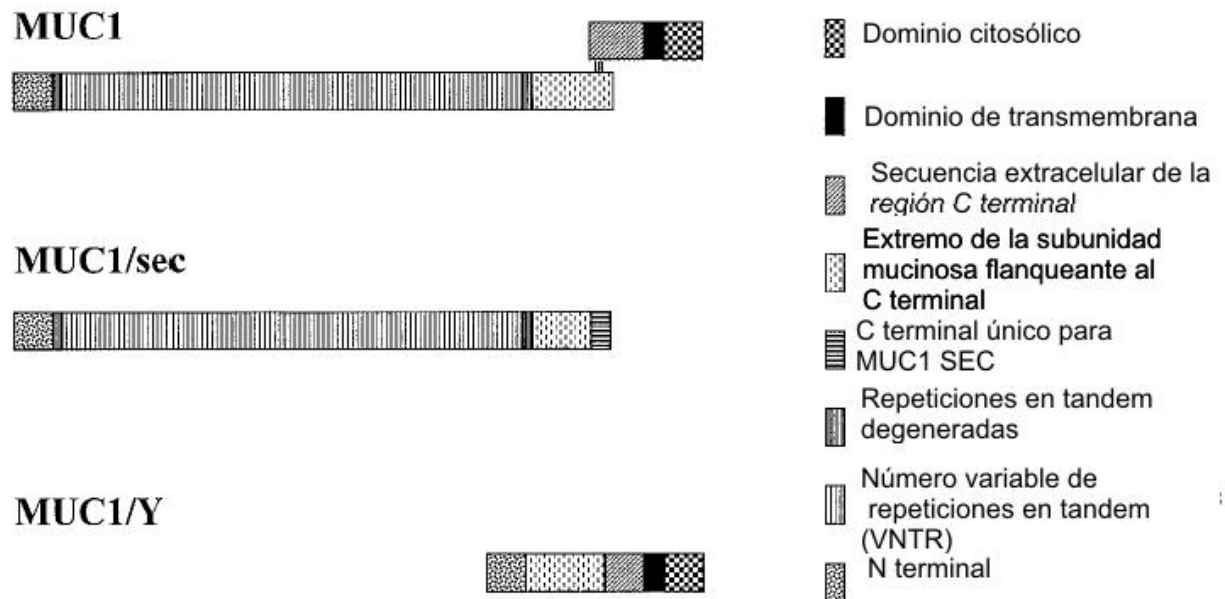
**Figura 7:** A-Estructura del gen de MUC1. PS: secuencia correspondiente al péptido señal, dTR: secuencia correspondiente a las repeticiones en tandem anómalas, VNTR: secuencia correspondiente al número variable de repeticiones en tandem, SEA: secuencia correspondiente a *Sea-urchin-sperm-protein, Enterokinase, Agrin*, TM: secuencia correspondiente al dominio transmembrana, CT: secuencia correspondiente a la cola citoplasmática, N: secuencia correspondiente a los sitios de N-glicosilación. B-Región del gen de MUC1 correspondiente a la cola citoplasmática, C<sub>t</sub>: secuencia correspondiente al carboxilo terminal, T: secuencia correspondiente a Thr, S: secuencia correspondiente a Ser, Y: secuencia correspondiente a Tyr, PKC delta: sitio de interacción con Proteína quinasa C delta, GSK-3β: sitio de interacción con Glucógeno sintetasa quinasa 3β, EGFR: sitio de interacción con el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, β-cat: sitio de interacción con β-catenina, Grb2: sitio de interacción con la molécula Grb2.



Se ha sugerido que la formación del heterodímero estaría relacionada a la rápida liberación de gran parte del dominio extracelular ante un medio extracelular alterado y esto enviaría una señal intracelular. La MUC1 participa en la segunda línea de defensa debajo del mucus que puede ser liberada rápidamente por secreción o clivaje proteolítico, en el que estaría involucrada la unión peptídica Gly-Ser (Lillehoj et al, 2003). La MUC1 soluble puede ser producto de corte y empalme (splicing) alternativo (MUC1/SEC) o de clivaje proteolítico. Se ha encontrado en el suero de pacientes con cáncer altas concentraciones de MUC1 circulante (Gendler et al, 2001) (Figura 8).

Un segmento del dominio extracelular de la subunidad menor muestra una similitud de secuencia con el dominio de unión a ligandos de miembros de la superfamilia de receptores de citoquinas (Zrihan-Licht et al, 1994).

**Figura 8:** Productos de splicing alternativo de la MUC1.



La CT presenta alta homología de secuencia con la CT de ratón (>85%). Se propuso que este dominio contiene una secuencia señal endocítica mediada por clatrina (Hanisch et al, 2000).

Se considera que la elevada expresión de MUC1 puede ser a nivel de la transcripción o dosaje génico. Sin embargo, en algunos linfomas de células B este aumento de la expresión es producido por una translocación que ubica el gen cerca de un enhancer de la cadena pesada de Ig, lo que sugiere la asignación de un rol para MUC1 en tumorigénesis. También la sobreexpresión puede producirse por factores STAT (proteínas transmisoras de señal y activadoras de la transcripción) que pueden ser activados por citoquinas como IL-6, interferones, prolactina, hormonas esteroideas, butirato de sodio y PMA (Gendler et al, 2001; Hey et al, 1994).

El promotor del gen de MUC1 contiene numerosos sitios potenciales de unión de factores de regulación transcripcional, entre ellos Sp1 (CD66f), AP1-4, NF-1, NF-κB, una caja E, caja GC, y sitios de receptores de estrógenos y de progesterona (Gendler et al, 2001). Por otra parte, se han hallado elementos específicos de células T junto a

elementos cis específicos de células epiteliales, lo que correlaciona bien con los datos que evidencian que la MUC1 es expresada en muchas células de origen hematopoyético (Gendler et al, 2001).

El término polimorfismo también se refiere a una modificación post-transcripcional que origina varias isoformas de la mucina por eventos de corte y empalme alternativo o bien a un procesamiento a nivel proteico. Existen dos variantes generadas de esta forma: MUC1/Y que carece de VNTR (Zrihan-Licht et al, 1994) y se une a otra isoforma: MUC1/SEC mencionada previamente, que consiste en una proteína polimórfica tipo mucina secretada que contiene la región VNTR, una región C terminal con una secuencia correspondiente a las codificadas en partes de segundo intrón y no presenta dominio transmembrana (Baruch et al, 1999). Se detectó en secreciones de células tumorales, en el suero de pacientes con cáncer de mama y en flujo uterino (Carson et al, 2004) (Figura 8).

Existe una forma adicional de splicing alternativo que carece del dominio TR denominada MUC1/X (Baruch et al, 1997) o MUC1/Z (Oosterkamp et al, 1997). También se han descrito las variantes MUC1/REP, MUC1/A, MUC1/B, MUC1/C y MUC1/D (Obermair et al, 2002).

### **Glicosilación de MUC1**

Se han descrito modificaciones post-traduccionales luego de la síntesis del centro proteico de MUC1, que consisten en una N-glicosilación y una extensa O-glicosilación dentro y fuera de los péptidos TR. El segmento entre VNTR y el dominio transmembrana posee 5 sitios de N-glicosilación (Ligtenberg et al 1990). En cada región tandem existen 2 Ser y 3 Thr que representan 5 sitios potenciales de O-glicosilación. También existen otros sitios distribuidos irregularmente en el resto del dominio extracelular. La N-glicosilación por transferencia cotraduccional de glicanos

con alto contenido en manosa ocurre en el retículo endoplásmico en sus pasos iniciales (Hilkens et al, 1988). Luego del clivaje proteolítico del centro proteico, el procesamiento de N-glicosilación a glicanos más complejos y la iniciación y la elongación de O-glicanos ocurren desde el cis al trans-Golgi. Este último proceso aumenta el PM aparente de MUC1 y dura aproximadamente 30 min (Litvinov et al, 1993).

Sin embargo, la adición final de ácido siálico, que ocurre en el trans-Golgi no se completa del todo y se expone en la membrana una forma inmadura. La forma completamente madura, detectada luego de un tiempo en la superficie celular, es generada por la reinternalización constitutiva de moléculas expuestas en la membrana y su reciclado a través del Golgi. Varios ciclos son necesarios para sialilar completamente la mucina, consecuentemente la MUC1 se presenta como una variedad de isoformas que se reciclan constitutivamente para adquirir el alto grado de sialilación de la forma madura. La MUC1 que se secreta corresponde principalmente a la forma madura.

Los rasgos de O-glicosilación de MUC1 son comunes a toda glicoproteína tipo mucina pero varía según el órgano y el grado de diferenciación. En general, la O-glicosilación comienza con la adición de N-acetil-D-galactosamina a los aminoácidos Ser y Thr en las regiones VNTR ricas en Ser-Thr-Pro (STP), y da origen a distintas glicofomas dependiendo de la expresión de diferentes isoformas de las N-acetilgalactosaminiltransferasas según el tejido epitelial de que se trate. Las estructuras complejas de O-glicanos se dividen en 3 regiones (Baldus et al, 2004):

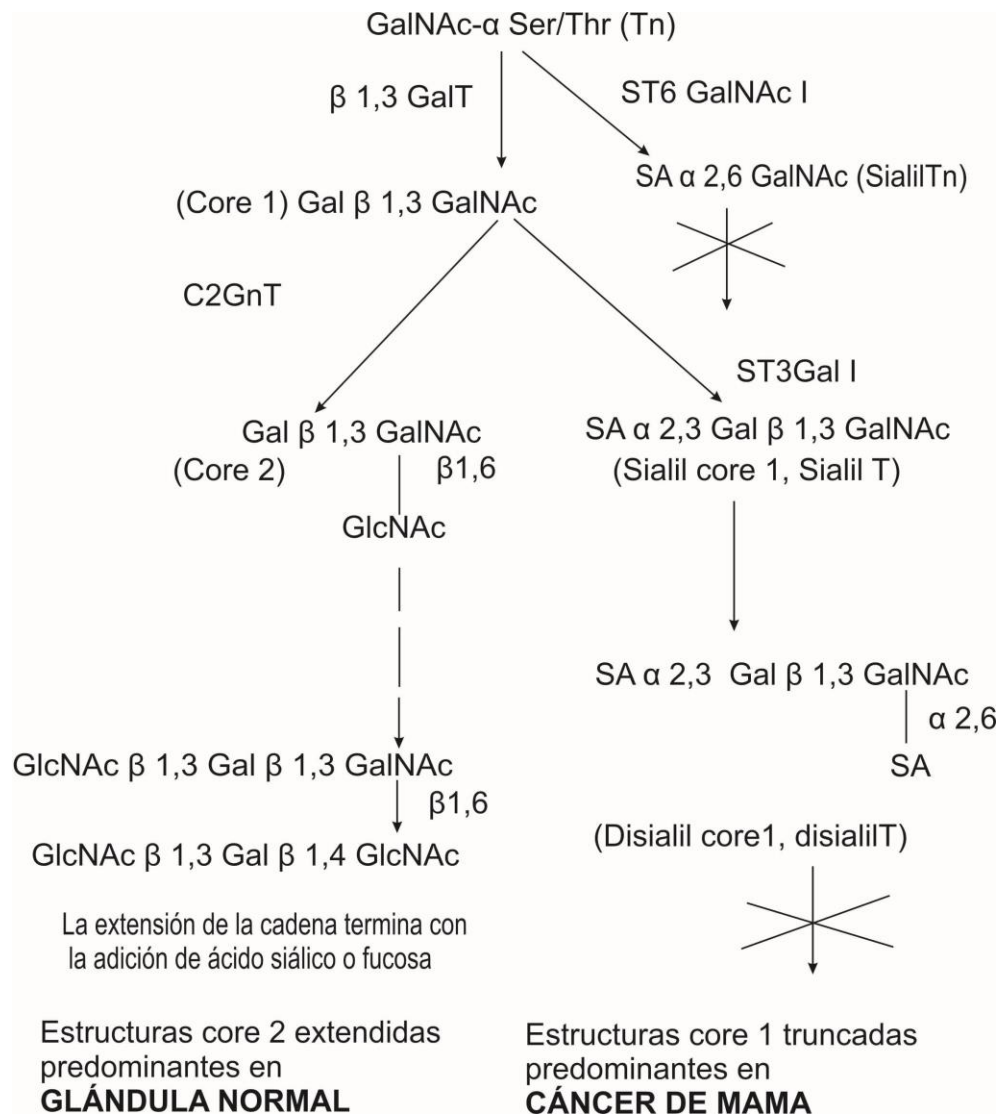
- 1) antígenos core, de los que se han descrito al menos 8 tipos de estructura (core1, core2, core3, core4, core5, core6, antígeno Tn y antígeno sialil-Tn
- 2) cadenas de oligosacáridos que se elongan desde la región central
- 3) antígenos periféricos

La MUC1 del epitelio de mama lactante está constituida por cadenas de polilactosamina elongadas a partir del C6 del core 2 (Hanisch et al, 1990) (Figura 9).

GalNAc está unido a Ser/Thr y se ramifica en C3 y C6 en el caso del core 2 que es la variante más frecuente de las descritas para mucina. Una minoría de los glicanos de MUC1 es derivado del disacárido core 1 (Hanisch et al, 2000). La glicofoma secretoria de leche humana posee predominantemente glicanos neutros con esqueletos lineales o ramificados que están compuestos por más de 16 unidades de monosacáridos. Las unidades repetitivas de N-acetilactosamina de las cadenas lineales se hallan unidas vía C3 o C6 de la galactosa (Hanisch et al, 1989). La fucosa se adiciona a GlcNAc subterminales e internos en uniones  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$  y así se generan secuencias tipo Lewis repetitivas y periféricas.

Existen pocos estudios sobre glicanos derivados de MUC1 en otros órganos. Por ejemplo, en orina se aisló y purificó MUC1 proveniente de vejiga (epitectina, PUM) y se estudiaron las estructuras y tamaños de los glicanos (Hanisch et al, 2000). El tamaño de los glicanos neutros principales no excede de un tetrasacárido; también se identificaron sus derivados sialilados.

**Figura 9:** Vías de glicosilación de Ser y Thr.



### O-glicosilación en tumores

En células de tumores epiteliales malignos se han detectado alteraciones en la glicosilación. Las cadenas sustituyentes son cortas y predominan los derivados sialilados cargados negativamente (Lloyd et al,1996; Hanisch et al, 1996). Por medio de estudios enzimáticos se sabe que algunas líneas celulares de cáncer de mama y tumores de mama no expresan  $\beta$ -glucosaminiltransferasas funcionales (Brockhausen et al, 1995), lo que concuerda con las estructuras de glicanos encontradas en la MUC1 asociada a tumores.



La baja expresión o carencia de la  $\beta$ 6-glucosaminiltransferasa que genera el core 2 en células de cáncer de mama (Brockhausen et al, 1995) conduce a la acumulación del disacárido core 1 que es sustrato de la  $\alpha$ 3-sialiltransferasa específica de Gal y de la  $\alpha$ 6-sialiltransferasa específica de GalNAc. La  $\alpha$ 3-sialiltransferasa y la enzima core 2 competirían por el mismo sustrato (Withehouse et al, 1997). Sin embargo, Müller y Hanisch (2002) han descrito en otro trabajo, el predominio de estructuras de tipo core 2 en las mucinas de cuatro líneas de cáncer de mama.

En la línea celular de cáncer de mama T47D predominan los trisacáridos sialilados mientras no se detectan estructuras Lewis (Hanisch et al, 1996). Otras líneas celulares presentan diferentes características; MCF-7 expresa una glicosilación compleja con oligosacáridos fucosilados de tipo Lewis (Lloyd et al, 1996; Hanisch et al, 2000). Una alteración restringida a la MUC1 asociada a tumor es la expresión del antígeno Hanganutsiu Deicher (HD), idéntico a una variante de ácido N-glicolil siálico, también demostrada en gangliósidos de origen oncofetal.

La transferencia inicial de Gal-NAc a Ser/Thr es realizada por la enzima polipeptidil N-acetilgalactosaminiltransferasa (ppGalNAc-Ts).

Para estudiar como ocurre la O-glicosilación, se llevaron a cabo distintos experimentos, entre ellos, se utilizó la glicosilación in vitro de péptidos sintéticos como sustratos de polipeptidil N-acetilgalactosaminiltransferasas recombinantes (rGalNAc-Ts). Se han clonado más de 7 rGalNAc-Ts (Clausen et al, 1996) y entre ellas, la T1 y T3 tienen parcialmente solapadas sus especificidades de sitio; rGalNAc T1 y T2 son más ubicuas y T3 y T6, de expresión más restringida (Clausen et al, 1996). rGalNAc-T1 preferentemente cataliza la transferencia de GalNAc a la Thr de la secuencia VTSA, uno de los 5 sitios potenciales de O-glicosilación de la región tandem, pero es capaz de llevar a cabo la glicosilación de Ser y Thr de GSTA (Hanisch et al, 1999). rGalNAc-T2 transfiere más rápidamente el monosacárido a la Thr de GSTA. La Ser de VTSA y Thr

de PDTR no pueden ser glicosiladas por estas enzimas, pero sí puede hacerlo la rGalNAc-T4 que necesita glicosilación previa. Mediante la acción concertada de estas enzimas y posiblemente otras Ts recombinantes, se logra glicosilar completamente a los VNTR.

Se presume la existencia de una regulación por competición de la O-glicosilación inicial con la síntesis de las estructuras core en el cis-Golgi, lo que determina la densidad de O-glicosilación (Hanisch et al, 2000).

Los datos obtenidos *in vitro* concuerdan con los patrones de glicosilación *in vivo* de MUC1 de epitelio de mama lactante o de células de cáncer de mama. En promedio sólo el 50% de los 5 sitios de la región tandem están glicosilados, preferentemente Thr en VTSA y Ser/Thr en GSTA. No se ha demostrado un patrón regular de sustituciones de GalNAc por lo que se encuentran múltiples glicoformas (Müller et al, 1997). La densidad intermedia de O-glicosilación de MUC1 asociada a mama lactante se podría explicar por la rápida elongación de las enzimas GalNAc core en sitios inicialmente sustituidos, y la inhibición concomitante de más eventos de iniciación en sitios proximales (Hanisch et al, 2000).

Las glicoformas de MUC1 como la del epitelio de la mama normal o de la mama lactante se caracterizan por largas cadenas de tipo polilactosamina, que presumiblemente, por impedimento estérico impiden el acceso de anticuerpos específicos hacia la región peptídica. Las glicoformas asociadas a cáncer de mama exhiben fuerte actividad de unión con estos anticuerpos debido a su glicosilación con glicanos más cortos. Sin embargo, la mayor antigenicidad se debería a la disminuida o ausente glicosilación de la secuencia inmunodominante DTR de los péptidos VNTR (Burchell et al, 1993). Hubo otras evidencias en una línea celular de cáncer de mama de un alto grado de glicosilación de esta secuencia (Müller et al, 1999). Algunos laboratorios habían determinado previamente que la glicosilación de las células de

cáncer de mama es menor respecto de la normal en dos sentidos: por la reducción de la longitud de las cadenas y por reducción de la densidad de glicosilación (Lloyd et al, 1996).

### **Respuesta inmune humoral hacia MUC1**

En pacientes con tumores malignos de mama, colon y páncreas se han encontrado anticuerpos libres dirigidos contra MUC1 de tipo IgM (Kotera et al, 1994) y en pacientes con tumores benignos y malignos de ovario y mujeres normales (Richards et al, 1998). Se han detectado anticuerpos que provinieron de ganglios linfáticos drenantes de pacientes con cáncer de ovario (Rughetti et al, 1993; Petrarca et al, 1996). En pacientes con tumores benignos de mama y con cáncer de mama y de ovario se encontraron anticuerpos anti-MUC1 bajo la forma de complejos inmunes circulantes (Gourevitch et al, 1996). Además, se hallaron MUC1-CIC de tipo IgG en sueros de pacientes con cáncer de mama avanzado (Croce et al, 1995). Asimismo, se detectaron anticuerpos libres de tipo IgM e IgG en mujeres normales, en pacientes con tumores benignos y malignos de mama (Devine et al, 1993; von Mensdorff-Pouilly et al, 1996). Los Ac anti-MUC1 exhiben un efecto limitado contra el tumor primario, pueden ser efectivos en la erradicación de células tumorales simples circulantes o émbolos de células tumorales. Está establecido su rol en ADCC y lisis mediada por complemento, pero también podría ejercer sus efectos al desenmascarar receptores de superficie de la célula y restablecer, de esta manera, la adhesión celular o permitir el reconocimiento de las células tumorales por parte del sistema inmune.

En un estudio en pacientes con cáncer de mama se determinó que la existencia de Ac naturales anti-MUC1 en el suero influenciaría favorablemente la supervivencia de pacientes en estadíos I y II (von Mensdorff-Pouilly et al, 1996; von Mensdorff-Pouilly et al, 2000).

En el caso de MUC1, el centro proteico, aunque está muy glicosilado, parece desencadenar una fuerte respuesta inmune en ratón, dado que muchos anticuerpos de hibridomas generados hacia esta mucina reconocen epitopes peptídicos de la región VNTR. El principal blanco de los Ac específicos dirigidos hacia el péptido de la mucina tumoral está localizado en DTR (Price et al, 1997). En humanos, la respuesta natural de células B también se dirige hacia una segunda secuencia inmunogénica (Petrarca et al, 1996). Los epitopes más frecuentemente reconocidos por IgM e IgG naturales en mujeres sanas y en pacientes con cáncer de mama fueron RPAPGS seguido de PPAHGVT y PDTRP (von Mensdorff-Pouilly et al, 2000). Se ha sugerido que la glicosilación con glicanos tipo core en DTR aumenta su antigenicidad (Karsten et al, 1998). La glicosilación en DTR puede estabilizar una particular conformación del péptido que favorecería la interacción con el sitio de unión de los anticuerpos. En un modelo por cristalografía de rayos X, se estudió la interacción entre DTR glicosilado y el Ac Mn SM3, que estaría favorecida por la exposición de un epitope peptídico en la región opuesta a la glicosilada, donde no existiría impedimento estérico (Dokurno et al, 1998).

### **Respuesta inmune celular hacia MUC1**

Se ha demostrado una respuesta inmune celular en pacientes con cáncer (Jerome et al, 1991; Barnd et al, 1989). A MUC1 se le ha asignado un papel inmunorregulatorio dado que la MUC1 soluble induce anergia de las células T reversible por IL-2; además las células T expresan y secretan MUC1 luego de su activación (Agrawal et al, 1998) . Por otra parte, se ha postulado que esta mucina otorga protección duradera contra el cáncer de mama por estimulación del sistema inmune durante el embarazo y la lactancia. (Agrawal et al, 1995; Finn et al, 1995,)

Las respuestas B y T dependen del procesamiento proteolítico y la presentación por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de los fragmentos proteicos (Hanisch et al, 2000).

En un estudio se emplearon péptidos VNTR de MUC1 sustituidos con glicanos tipo core 1 y se demostró que fueron capaces de inducir una fuerte respuesta de células T CD4+ de tipo policlonal tanto en mujeres sanas como en pacientes con cáncer de mama la respuesta de tipo Th1 fue independiente de una presentación de glicopéptidos de MUC1 por células dendríticas, pero se demostró una estricta dependencia del sitio de sustitución de glicanos en el péptido TR (Burchell et al, 1999).

La primera evidencia de que MUC1 puede servir como antígeno blanco para linfocitos T citotóxicos (CTL) provino de estudios en pacientes con cáncer de mama. El epitope reconocido por estas células T se localizó en la región VNTR de MUC1 y se identificó la secuencia PDTRP reconocida por el Ac Mo SM3 (Jerome et al, 1991). El modo de activación de CTL fue inusual, pues fue independiente del procesamiento y presentación de la MUC1.

La inducción de repuestas de células T CD4+ depende del estado de glicosilación de MUC1. Un péptido sintético de 5 TR no glicosilados indujo una respuesta de células T CD4+ en mujeres sanas, utilizando células dendríticas como célula presentadora de antígenos (CPA). El epitope clase II procesado naturalmente es un dodecapéptido restringido a una presentación por HLA-DR3. Otros epitopes peptídicos de la región VNTR estaban restringidos a HLA-A2 (Apostolopoulos et al, 1997) y HLA-A11 (Domenech et al, 1995), pero las respuestas fueron de baja eficacia e independientes de las células T helper.

En líquido ascítico de tumores, la MUC1 completamente glicosilada presumiblemente no es procesada por las CPA, debido a una resistencia proteolítica del centro proteico, causada por la alta densidad de glicosilación de los péptidos TR (Hanisch et al, 2000).

También se ha sugerido que formas glicosiladas de MUC1 pueden ser procesadas por células dendríticas. Sin embargo, el clivaje proteolítico y la presentación están restringidas a CMH clase I y la eficiencia del procesamiento fue inversamente proporcional al grado de glicosilación (Hiltbold et al, 1999).

El patrón de glicosilación es fundamental en el diseño de vacunas a base de MUC1, para procesar por CMH clase II y lograr respuesta T helper para la inducción de IgG, ADCC y/o CTL (Hanisch et al, 2000).

Debido a sus múltiples características y a la detección de respuesta inmune humoral y celular, MUC1 es considerada como una de las moléculas cruciales para el desarrollo de nuevos tratamientos de inmunológicos para el cáncer de mama.

## OBJETIVOS

Los objetivos de la presente Tesis fueron los siguientes:

- Estudio de la expresión tisular de MUC1 en muestras de cáncer de mama para determinar en qué medida la expresión de MUC1 en el tejido tumoral se correlaciona con los niveles séricos de la misma.
- Comparación de los anticuerpos anti-MUC1 dirigidos contra la fracción extracelular de MUC1 y los dirigidos contra la cola citoplasmática (MUC1-CT) para evaluar la eficacia de estos últimos en la detección de MUC1 en el tejido tumoral.
- Evaluación de los niveles séricos de MUC1 en mujeres sanas y con cáncer de mama para estudiar la posible utilidad de esta glicoproteína como marcador tumoral.
- Comparación de la expresión de MUC1 en los tumores malignos primarios y en las células neoplásicas aisladas de la médula ósea de pacientes con cáncer de mama con el fin de determinar diferencias antigénicas entre ellas.
- Estudio de la respuesta inmune humoral inducida por MUC1 a través de la determinación de anticuerpos anti-MUC1 tanto libres como unidos a MUC1 por medio de complejos inmunes circulantes (MUC1-CIC) en muestras de mujeres sanas. El propósito fue la evaluación de factores como el embarazo y la lactancia en la inducción de respuesta inmune humoral anti-MUC1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

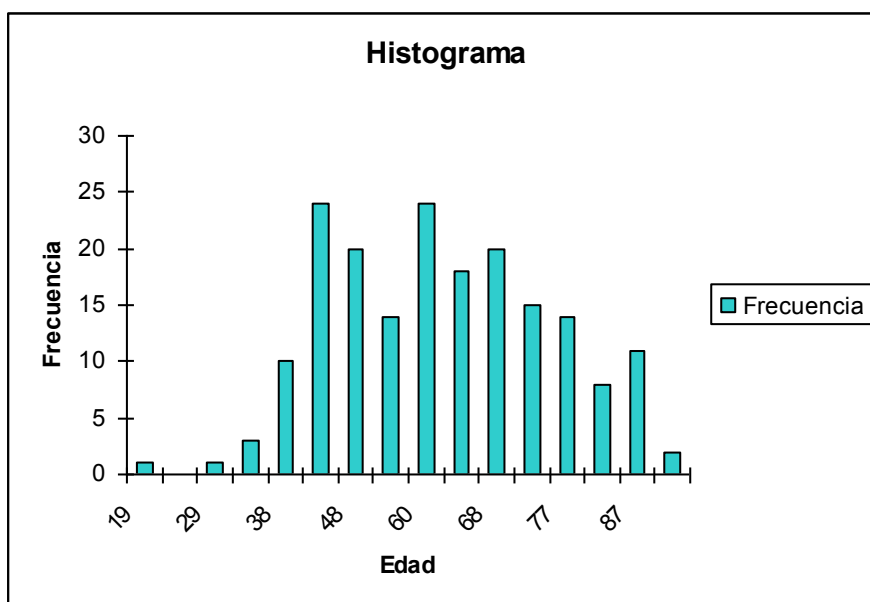
### PACIENTES

Se estudiaron 160 pacientes femeninas con cáncer de mama en diferentes estadios de la enfermedad provenientes del Hospital Interzonal General de Agudos “Gral. San Martín” de La Plata; del Hospital Alemán de Bs. As. y del Hospital Italiano de La Plata.

Los datos clínicos de las pacientes se obtuvieron de sus historias clínicas.

La media de la edad de las pacientes fue de 58 años con un rango de 25-86 años (Figura 10).

**Figura 10:** Histograma de edad de las pacientes con cáncer de mama.



Todos los tumores correspondieron a adenocarcinoma invasor; los diferentes tipos histológicos estudiados se detallan en la Tabla 2 .

Los estadios de la enfermedad correspondientes a las pacientes incluídas en esta Tesis se resumen en la Tabla 3. La estadificación se realizó según International Union Against Cancer p TNM-system (1997).



**Tabla 2:** Tipos histológicos de las pacientes (porcentajes).

<b>Tipo histológico de tumor</b>	<b>%</b>
Adenocarcinoma NOS ductal	71%
Adenocarcinoma lobulillar	27%
Adenocarcinoma medular	2%

**Tabla 3:** Estadíos tumorales de las pacientes (porcentajes).

<b>Estadío tumoral</b>	<b>%</b>
Estadío 1	24 %
Estadío 2	43 %
Estadío 3	30 %
Estadío 4	3 %

De cada una de las pacientes se obtuvo una muestra tumoral, una muestra de sangre periférica pre-tratamiento y, en un grupo, también se obtuvo una muestra de médula ósea.

### **Muestras tumorales**

- **Muestras tisulares:**

Se separaron fracciones del tumor para someterlas a inmunohistoquímica y para la obtención de fracciones subcelulares.

- **Muestras séricas:**

Se extrajeron 10 ml de sangre periférica de las pacientes antes de todo tratamiento de las que se obtuvo suero por centrifugación durante 10 minutos a 1000 rpm. Las muestras de suero fueron fraccionadas y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta ser analizadas.

- **Muestras de médula ósea (MO):**

De 17 pacientes con cáncer de mama se pudo también obtener una muestra de MO por punción esternal o ilíaca durante el acto quirúrgico. Los especímenes fueron heparinizados e inmediatamente trasladados al CINIBA para su procesamiento.

### **Muestras de mujeres sin patología neoplásica maligna**

- **Muestras tisulares:**

Se emplearon como controles tisulares: 17 muestras de tejido mamario normal obtenidas durante mastoplastia y 28 muestras de tejidos de pacientes con enfermedad benigna de mama (displasia y tumores benignos).

- **Muestras séricas:**

Se obtuvieron 149 muestras de mujeres sanas, se fraccionaron y almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta ser analizadas. Las muestras de mujeres sanas se clasificaron según se detalla en la Tabla 4.

La media de la edad fue de 29 años con un rango de 20-45 años. Toda la población estaba compuesta por no fumadoras, ya que el tabaquismo puede alterar las mediciones de MUC1 (Mc Guckin et al, 1995).

Los experimentos fueron realizados respetando la Ética de acuerdo con los postulados de la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes y mujeres sanas incluidas en los estudios.

**Tabla 4:** Clasificación de mujeres sanas (porcentajes).

<b>Mujeres sanas</b>	<b>%</b>
Nulíparas	9%
Mujeres embarazadas primíparas	21%
Mujeres embarazadas con lactancia previa	23%
Mujeres embarazadas sin lactancia previa	5%
Mujeres multíparas no embarazadas durante período de lactancia	18%
Mujeres multíparas no embarazadas con historia previa de lactancia	19%
Mujeres multíparas no embarazadas sin historia previa de lactancia	5%

#### **ANTICUERPOS MONOCLONALES (AcMo)**

Los AcMo empleados se detallan en la Tabla 5.

#### **ANTICUERPOS CONJUGADOS**

IgM de conejo anti humana conjugada con peroxidasa (Dakopatts, Dako corporation, Copenhagen, Denmark).

IgG de conejo anti humana conjugada con peroxidasa (Dakopatts, Dako corporation, Copenhagen, Denmark).

IgM de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa (SIGMA Chemical Co, USA).

IgG de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa (SIGMA Chemical Co, Mo, USA).

IgG (H+L) de cabra anti-hamster armenio conjugado con biotina (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA).

Estreptavidina conjugada con peroxidasa (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA).

**Tabla 5:** Anticuerpos monoclonales.

AcMo	Epitope	Clase	Referencia
C595	Arg-Pro-Ala Pro (RPAP)	IgG3	Cedidos gentilmente por M.R. Price
SM3	Pro-Asp-Thr-Arg-Pro (PDTRP)	IgG1	Cedidos gentilmente por J. Burchell
HMFG2	Asp-Thr-Arg (DTR)	IgG	Cedidos gentilmente por J. Taylor-Papadimitriou
CK/HRP	anti- citoqueratinas humanas 5, 6, 8, 17 y 19	IgG	Dako A/S código No. 7022
KM93	sialil Lewis x	IgM	Cedidos gentilmente por Hanai
KM380	Lewis x	IgM	Cedidos gentilmente por Hanai
Anti-Tn	Antígeno Tn	IgM	Dako, Dinamarca
C14	Lewis y	IgM	Cedidos gentilmente por M.R. Price
Anti-erb-B2	Oncogen erb-B2	IgG	*
Anti-erb-B3	Oncogen erb-B3	IgG	*
Anti- CD34	CD34	IgG	*
Anti-CD45	CD45	IgG	*
CT2	17 aa (SSLSYNTPAVAATSANL) de la cola citoplásmica de MUC1	IgG	Cedido gentilmente por S. Gendler

\*Cedidos gentilmente por el Servicio de Patología de Hospital de Niños “Sor María Ludovica”.

## **SUSTRATOS CROMOGÉNICOS**

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolina, 6-ácido sulfónico)

Sigma Chemical Co, Mo, USA.

DAB: 3',3' diaminobenzidina, Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri.

## MÉTODOS

### Inmunohistoquímica (IHQ)

La técnica fue llevada a cabo según el procedimiento estándar. Las muestras de tejido fueron fijadas con Methacarn (Metanol: Cloroformo: Ácido acético 6:3:1) durante 2 horas y transferidos a etanol 70%. Posteriormente, se incluyeron en parafina y luego se realizaron cortes con micrótopo. Las muestras embebidas en parafina se sometieron a hidratación mediante una serie de alcoholes: xileno, etanol 100%, etanol 95%, etanol 70% y etanol 50%. Luego se enjuagaron con PBS, se incubaron con metanol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, para bloquear la peroxidasa endógena: se lavaron repetidamente con buffer fosfato salino (PBS) a pH 7.2 y se incubaron con suero equino para evitar reacciones inespecíficas. Se realizó una recuperación antigénica con buffer citrato de sodio 0.01M, pH 6.0 a 100°C durante 5 minutos. Seguidamente se incubaron con AcMo durante 1 hora, luego se enfrentó al conjugado correspondiente y se utilizó como sustrato de la peroxidasa la DAB (3',3' diaminobenzidina, Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 1µg/ml; los núcleos fueron coloreados con hematoxilina. Los controles negativos se incubaron con PBS. Posteriormente, las muestras se sometieron a la serie de alcoholes a los efectos de deshidratarlas y se montaron con bálsamo. Se evaluó la tinción de la membrana plasmática, el citoplasma y los núcleos. Cuando al menos uno de estos componentes se coloreó, las muestras se consideraron positivas, de manera semicuantitativa, como negativo (-), leve (+), moderado (++) o fuerte (+++) (Feickert et al, 1990). El número de campos positivos de bajo aumento se expresaron como un porcentaje del número total de campos que posee el tejido. Los patrones de tinción se clasificaron, según Renkonen et al (1997) en membranoso, citoplásmico o mixto y la reacción positiva del contenido de la luz glandular se identificó como debris celular o secreción.

Las diluciones de los AcMo utilizadas fueron las siguientes: para C595, 1:1000; para HMFG2 y SM3, 1:10; para KM93 y KM380, 1:5000, para Anti-Tn, 1:100; para C14, 1:1000 y para CT2, 1:500. Todas las diluciones fueron realizadas en buffer PBS-albúmina sérica bovina (BSA)1%.

Las diluciones empleadas para los anticuerpos conjugados fueron de 1:400, excepto en el caso de las IHQ llevadas a cabo con el AcMo CT2, que se enfrentó con IgG (H+L) de cabra anti-hamster armenio conjugado con biotina (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA) 1:1000 durante 1 hora y luego se incubó con estreptavidina conjugada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA) 1:5000 durante 30 minutos.

### **Inmunocitoquímica (ICQ)**

Los extendidos obtenidos a partir de médula ósea (MO) se incubaron 10 minutos en PBS; luego, 15 minutos con suero equino; se lavaron con PBS y se incubaron con los AcMo durante 1 hora. Se lavaron nuevamente incluyendo un lavado con formol al 1% y luego se incubaron con el anticuerpo conjugado con peroxidasa durante 1 hora. Se procedió al revelado con DAB y previo al montaje, se deshidrataron mediante pasajes por alcoholes 95%, 100% y finalmente xilol.

### **Preparación de fracciones subcelulares**

Se prepararon fracciones subcelulares a partir de las muestras tumorales malignas y benignas y tejidos normales según Price et al (1985). De cada una de las muestras tumorales lavadas con buffer Tris 10 mM pH 7.2 se descartaron las áreas necróticas para cortarlas en piezas de 1 mm; de igual manera se procedió con los tejidos normales. Seguidamente, se homogeneizaron con el mismo buffer adicionado con polimetilsulfonilfluoruro 0.01 M (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) en baño de hielo. Luego se filtraron a través de una red metálica y se centrifugaron a 600g durante 30 min a

4°C. Los precipitados fueron resuspendidos en PBS 1.4M y se los denominó fracción nuclear (n). Los sobrenadantes fueron centrifugados nuevamente a 45000 rpm durante 60 minutos a 4°C. De cada uno de ellos se obtuvo un precipitado, correspondiente a la fracción de membrana (m) y un sobrenadante, correspondientes a la fracción citoplasmática (c). Las fracciones n, m y c fueron dializadas contra PBS 1.4 M a 4°C durante 48 horas, liofilizadas y almacenadas a -20°C. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y Western blot.

### **SDS-PAGE y Western blot**

Las fracciones aisladas fueron analizadas bajo condiciones reductoras por medio de SDS-PAGE en un sistema de buffer discontinuo de acuerdo a Laemmli (1980). Las fracciones fueron resuspendidas en buffer adicionando SDS 2% y 2-mercaptoetanol 5% y se calentaron a 90°C durante 5 min. Luego de la electroforesis, los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Towbin et al, 1979) y se empleó buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7.4)-BSA 3% para bloquear los sitios inespecíficos, luego se lavó con solución Tris-salina y se incubó con los AcMo CT2 1:500 o C595 1:800 (diluidos en buffer de bloqueo). Luego de una incubación a 4°C toda la noche, se lavaron las membranas con buffer Tris-salino por 5 min. El Ac conjugado varió según el AcMo utilizado. En el caso del empleo del AcMo CT2, luego de 3 lavados con Tris-salino, se enfrentó con IgG (H+L) de cabra anti-hamster armenio conjugado con biotina (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA) 1:10000 durante 1 hora. Luego se incubó con estreptavidina conjugada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA) durante 30 min. Cuando se utilizó el C595 como AcMo, se enfrentó con IgG de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa y se utilizó, como sustrato de la enzima, la DAB (3',3' diaminobenzidina, Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, USA) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 1µg/ml



## **Procesamiento de la MO**

Mientras la paciente estaba bajo anestesia general antes de ser sometida a la cirugía del tumor primario, se obtuvieron 4 ml de aspirado de MO extraído de la cresta ilíaca o del esternón y almacenados en tubos tratados con heparina. Las suspensiones de MO fueron lavadas con igual volumen de buffer (PBS-BSA 0.1%-citrato de sodio 0.6%) y centrifugadas durante 10 min a 600-800 g, descartando el sobrenadante.

CELLlection™ Epithelial Enrich (Dynal AS, Oslo, Noruega) es un kit comercial para obtener un rápido enriquecimiento inmunomagnético de células epiteliales humanas a partir de tumores primarios, sangre entera, MO y suspensión de células mononucleares. Consiste en esferas de 4.5  $\mu$  de diámetro de poliestireno, uniformes, superparamagnéticas cubiertas de AcMo unido por DNA para proveer un sitio de clivaje para la liberación de las células. El anticuerpo que las recubre es Ber-EP 4, un AcMo murino (IgG1) anti-EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) específicos para dos antígenos de membrana glicopeptídicos de 34 y 39 kDa expresados en muchos tejidos epiteliales humanos normales y neoplásicos. Este producto está especialmente diseñado para el enriquecimiento de células epiteliales tumorales circulantes a partir de MO.

El aislamiento de células tumorales fue realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, los precipitados fueron resuspendidos en buffer. Se lavaron 250  $\mu$ l de esferas CELLlection (CELLlection™ Epithelial Enrich, Dynal AS, Oslo, Noruega) y se agregaron a 5 ml de MO diluída. La MO y las esferas se mezclaron y se incubaron a 2-8°C en agitación por 30 min. Luego se colocaron los tubos en un magneto (Dynal, MPC, Oslo, Noruega) durante 3 min y se aspiró el sobrenadante. Las rosetas de células se lavaron con PBS-BSA 0.1% 4 veces y finalmente se resuspendieron en 200  $\mu$ l en medio RPMI-suero bovino fetal (SBF)1% precalentado a 37°C. La liberación de las células aisladas se realizó por incubación con 200U de buffer

de liberación-DNAse (Dyna) agitando vigorosamente y se colocó la mezcla en un magneto. El sobrenadante fue descartado y las células liberadas se resuspendieron en RPMI- SFB 1%.

Las fracciones enriquecidas en células provenientes de aspirados de MO se emplearon para realizar extendidos. Se dejaron secar al aire durante 30 min, seguido de fijación con acetona fría durante 10 min y luego se dejó nuevamente al aire 5 min. Se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su estudio posterior.

### **Detección de MUC1 sérica por CASA (Cancer Associated Serum Antigen)**

El test de CASA es un método comercial para la determinación de MUC1 sérica que consiste en un ELISA sandwich (Medical Innovations Limited, Artarmon, Australia). El rango de trabajo es de 2-64 U/ml, las muestras que superan 64 U/ml deben ser diluidas en el control negativo 1/5 y reensayadas. El test utiliza AcMo BC2 (IgG) y BC3 (IgM) que detectan el mismo epítopo APDTR de la región VNTR del centro proteico de la MUC1. Las placas recubiertas por BC2 se enfrentaron a sueros diluidos  $\frac{1}{4}$  en el buffer provisto por el equipo y luego de lavados se agregó el AcMo BC3. Luego de un lavado las muestras fueron incubadas con anti-IgM murino conjugado con peroxidasa. El sustrato cromogénico utilizado fue ABTS. La DO fue medida a 405 nm. El valor de corte fue de 4U/ml (DO=0.400).

### **Determinación de la reproducibilidad**

Estos datos fueron provistos por el fabricante:

a) CV% intra-ensayo: fue obtenido por repetición de la misma muestra un número de veces.

CV% para una muestra: 6.3%, para otra: 7.2%

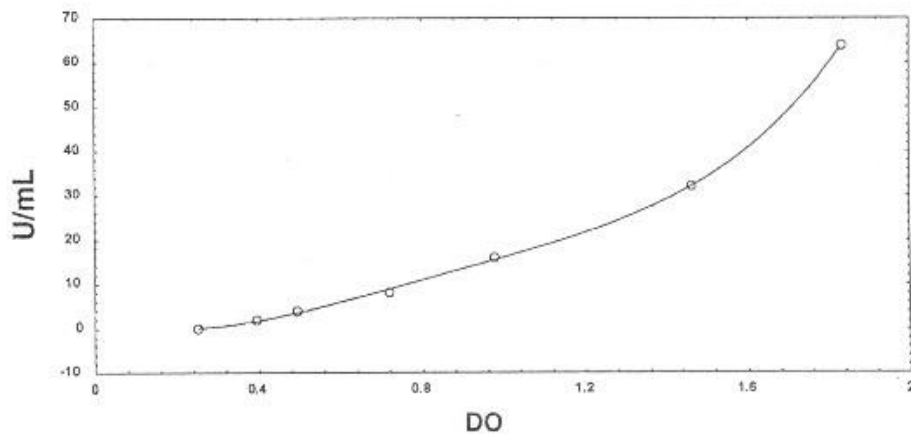
b) CV% inter-ensayo: fue obtenido por repetición de la misma muestra en distintos ensayos.

CV% para una muestra: 12.0%, para otra: 9.6%

Las concentraciones de MUC1 se determinaron por interpolación en una curva de calibración construida con 6 estándares de concentración decreciente, por representación de DO vs. log concentración (U/ml) (Figura 11). El equipo también provee un control positivo y un control negativo.

**Figura 11:** Curva de calibración de MUC1 medida por el test de CASA.

$$y = 3.287 - 33.871 * x + 105.155 * x^2 - 83.666 * x^3 + 25.196 * x^4 + \text{eps}$$
$$R^2 = 0.9995$$



**ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para la determinación de complejos inmunes circulantes que contienen moléculas de MUC1 (MUC1-CIC)**

Se desarrolló un método para la detección de MUC1-CIC basándonos en Gourevitch et al (1995) con amplias modificaciones. Los AcMo (C595, dilución 1:100; SM3, dilución 1:10) fueron adsorbidos en microplacas de ELISA de PVC, de 96 pocillos y fondo plano, flexibles (Falcon 3912. Microtest III, Becton Dickinson Labware, Oxnard); se incubaron toda la noche a 4°C. Después de tres lavados con buffer fosfato salino-Tween 20 0.05% (PBST), las placas fueron incubadas con buffer fosfato salino-albúmina sérica bovina 1%-azida sódica 0.02% (PBS-BSA 1%-Na<sub>3</sub>N 0.02%) durante 3

hs a 37°C para bloquear sitios de unión no específicos. Las placas fueron lavadas tres veces con PBST. Se agregó 100 µl de suero por triplicado previamente diluido 1/20 en PBS. Luego de una incubación a 4°C durante toda la noche, se descartó el suero y se lavó exhaustivamente 5 veces con PBST, 4 veces con PBS-Tritón X-100 1% durante 5-10 min cada vez, y luego 3 veces más con PBST para remover el exceso de detergente. Las placas se incubaron con 100 µl de IgM e IgG de conejo anti humana conjugada con peroxidasa, diluidas previamente en PBST-BSA 0.1% 1/2000 y 1/3000 respectivamente durante 2 hs a 4°C. El contenido de las placas fue descartado y se lavó 7 veces con PBST y una vez con agua destilada. Posteriormente se agregaron 100 µl de 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolina, 6-ácido sulfónico) (ABTS) en buffer de ácido cítrico 0.1 M-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O 0.2 M-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% y fue incubado durante 1 h en la oscuridad. Se realizó la lectura a 405nm en un lector de ELISA (Spectra SLT Labinstruments Ges. M.b H. Austria). Los resultados se obtuvieron como la diferencia de medias de los datos de DO de cada muestra y los datos de los blancos sin suero.

### **Determinación de la reproducibilidad del ELISA**

a) CV % intra-ensayo: fue obtenido por repetición la misma muestra un número de veces.

CV% para MUC1-CIC IgM con C595: 3.8%; con SM3: 3%

CV% para MUC1-CIC IgG con C595: 6%; con SM3: 4.5%

b) CV% inter-ensayo: fue obtenido por repetición de la misma muestra en distintos ensayos

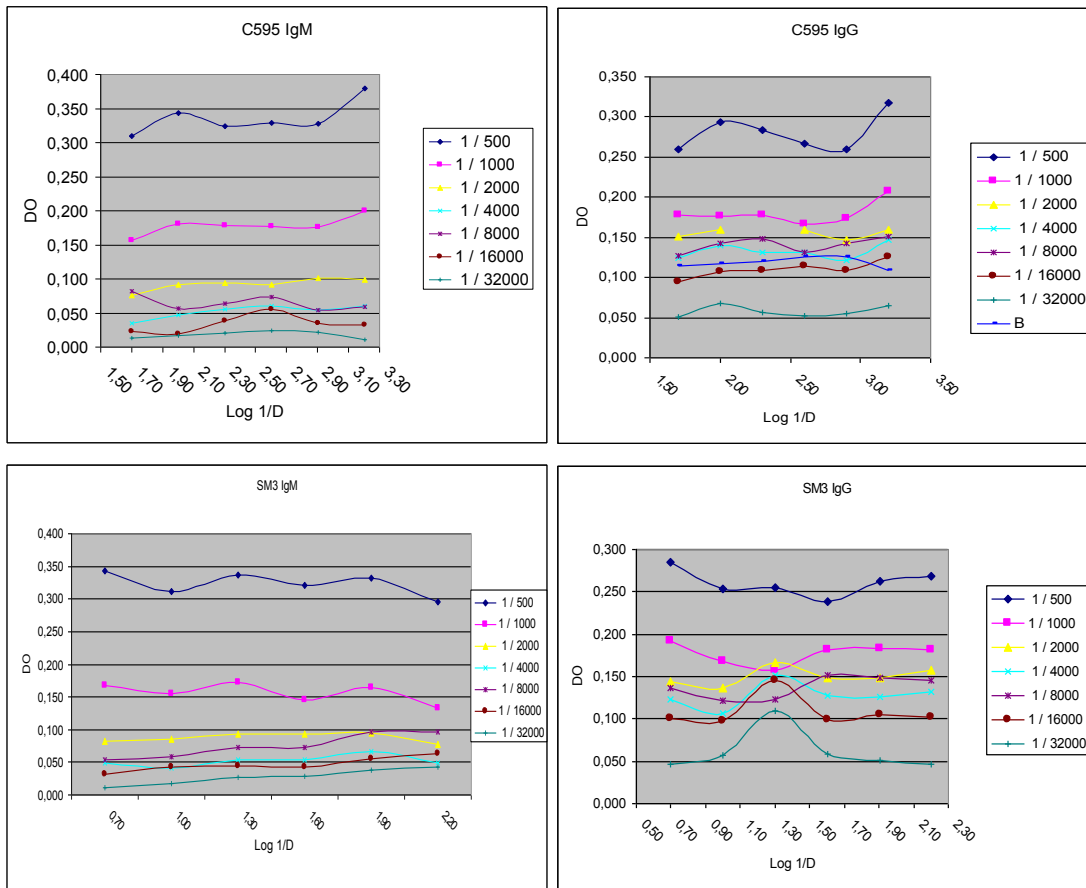
CV% para MUC1-CIC IgM con C595: 13%; con SM3: 9%

CV% para MUC1-CIC IgG con C595: 9.8%; con SM3: 15%

Las concentraciones de anticuerpos utilizadas y los valores de corte fueron elegidos de acuerdo al protocolo propuesto por Gourevitch et al (1995). La elección de las

concentraciones de anticuerpos conjugados con peroxidasa empleadas se realizó en base a los valores de DO a 405 nm obtenidos para la dilución de AcMo utilizada (1:100 para C595 y 1:10 para SM3) (Figura 12). En el ensayo de MUC1-CIC con C595, tanto IgM como IgG, en base a los valores de DO obtenidos en muestras de mujeres nulíparas, se tomó como valor de corte 0.500 unidades de DO, mientras que, cuando se empleó el AcMo SM3, se fijó como valor de corte 0.400 unidades de DO.

**Figura 12:** Curva de calibración de ELISA de MUC1-CIC. Se representa DO a 405 nm versus Log 1/D (D: Dilución de anticuerpo monoclonal) para distintas concentraciones de anticuerpos conjugados con peroxidasa.



## **ELISA para la detección de anticuerpos reactivos con el centro proteico de MUC1**

Este método para la determinación de IgM e IgG anti MUC1 fue adaptado de Price et al (1980) con algunas modificaciones basadas en el método empleado por Von Mensdorff-Pouilly et al (1989) y otras realizadas en el CINIBA. Se llevó a cabo una conjugación de un péptido sintético derivado de MUC1 de 100 mer correspondiente a 5 VNTR a BSA *in situ*. Se adsorbieron 100  $\mu$ l de BSA (1 $\mu$ g/ml) en microplacas de ELISA de PVC, de 96 pozos y, fondo plano, flexibles (Falcon 3912. Microtest III, Becton Dickinson Labware, Oxnard, USA) a 37 °C durante toda la noche. Luego de lavados con PBST, se agregaron 50  $\mu$ l de una solución de péptido (100  $\mu$ g/ml ) por triplicado, seguida por 50  $\mu$ l de una solución (0.6 mg/ml) de 1-ciclo hexil-3-(2 morfolinoetil) carbodiimida -p- toluen sulfonato (Sigma Chemical Co., Mo., USA). Las placas se lavaron nuevamente y se les agregaron 150  $\mu$ l de buffer de bloqueo (PBS-BSA 1%) por pocillo y se bloqueó durante 1h a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas y se agregaron las diluciones de suero (1/80 para IgM y 1/40 para IgG) por triplicado y se incubaron toda la noche a 4°C. Luego de lavar, se incubaron con 50  $\mu$ l de anticuerpos conjugados (1/400 para IgM y 1/600 para IgG en PBST-BSA 0.1%) durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas y se agregaron 100  $\mu$ l de ABTS en buffer de ácido cítrico 0.1 M-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O 0.2 M-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% y fueron incubadas 1 h en la oscuridad. Se realizó la lectura a 405nm en un lector de ELISA (Spectra SLT Labinstruments Ges. M.b H. Austria). Los resultados se obtuvieron como la diferencia de medias de los datos de DO de cada muestra y los datos de los blancos sin suero. Los valores de corte (media +DS) fueron 0.340 para IgM y 0.227 para IgG.

Se incluyeron como controles muestras pre y post-vacunación de sueros de pacientes con cáncer de mama vacunadas según un protocolo desarrollado en Memorial Sloan Kettering Cancer Center de Nueva York.

La vacuna consistió en un péptido de 32 aminoácidos que contenía una secuencia de 1.5 VNTR de la MUC1, una Cys en el extremo N terminal para acoplarse a KLH. Los títulos de anticuerpos determinados por ELISA contra el péptido inmunizante fueron 1:10 y 0 para IgM e IgG, respectivamente en la muestra pre-vacunación y 1:1280 para ambas Ig en la post-vacunación (datos enviados por P. Livingston y G. Ragupathi del Memorial Sloan Kettering Cancer Center de Nueva York).

### **Especificidad del ELISA para la determinación de anticuerpos anti-MUC1**

La especificidad de los anticuerpos fue ensayada por inhibición con el péptido de 100 mer derivado de MUC1 libre. Se realizaron diluciones seriadas del péptido hasta una concentración final de 0.05 mg/ml y se incubaron con un grupo de sueros de muestras positivas. Luego de una agitación, se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Se realizó un test de ELISA. El porcentaje de inhibición fue calculado como la disminución proporcional de DO debido a la previa unión al péptido.

### **ELISA sobre líneas celulares establecidas para investigar la especificidad de anticuerpos**

La reactividad de los anticuerpos anti-MUC1 hacia la superficie celular fue ensayada sobre células malignas que expresan MUC1 pertenecientes a la línea celular establecida A549 y como control negativo se utilizó la línea Hep-G2 que no la expresa. Los resultados se expresaron como DO. Las células fueron incubadas con el AcMo C595 en tres diluciones y luego con anticuerpos anti-ratón conjugados con peroxidasa. El sistema se reveló con ABTS.

### **Análisis estadístico**

La distribución normal de datos para cada grupo fue testeada por el test de Kolmogorov- Smirnov y la homocedasticidad fue verificada empleando el método de

Barlett. Las comparaciones entre grupos fueron realizadas por ANOVA con Tukey HSD para un número desigual de casos,  $p < 0.02$ .

Para estudiar la relación entre variables múltiples se realizó una correlación múltiple clásica ( $p < 0.05$ ).

Para estudiar la covariación de varios parámetros de acuerdo al tipo tumoral de cáncer de mama, los datos fueron estandarizados. y se llevó a cabo un Análisis de Componente Principal (PCA) con correlación de Kendall. Se estudió la relación entre variables métricas y no-métricas; para las últimas se usaron las variables dicotómicas Dummy. El rango de correlación de Spearman ( $p < 0.05$ ) también se realizó incluyendo la detección de MUC1 a través de CT2, C595 y estadio de la enfermedad y tipo histológico. La comparación de porcentajes de positividad entre grupos fue estudiada por el análisis de  $\chi^2$ .



## RESULTADOS

### Expresión de MUC1 en muestras tisulares

Los resultados obtenidos a partir del análisis inmunohistoquímico (IHQ) de 160 muestras de cáncer de mama realizado con tres AcMo dirigidos contra el centro proteico de la MUC1 fueron los siguientes (Tabla 6): con C595, 58% dieron positivas; con HMFG2 se obtuvo reacción positiva en un 61% de los casos mientras que con SM3 resultaron positivas el 43% de las muestras. Las muestras positivas de carcinoma ductal obtenidas mediante el empleo del AcMo C595 fueron 58%. Cuando se utilizó HMFG2, la reacción positiva se halló en un 58% de los casos, siendo 43% las muestras positivas al emplear SM3. El 55% de las muestras de carcinoma lobulillar fueron positivas con C595; con HMFG2 reaccionó el 64% y con SM3, el 39% de los casos dio positivo. En las muestras de carcinoma medular, el 67% dieron reacción positiva; con HMFG2 la reactividad se halló en el 67% de los casos mientras que ninguna muestra reaccionó con SM3.

Las muestras normales presentaron reacción positiva en el 65% con C595, en el 53% con HMFG2 y con SM3, el 35%. Las muestras de enfermedades benignas reaccionaron positivamente en el 56% de los casos con C595, con HMFG2 en el 44% y con SM3 el 11% presentó reacción positiva.

En la Tabla 7 se muestran los porcentajes de las muestras que reaccionaron positivamente con al menos un AcMo dirigido contra el epitope proteico de MUC1 en el total de las pacientes y clasificadas según el estadio al que corresponde la muestra.

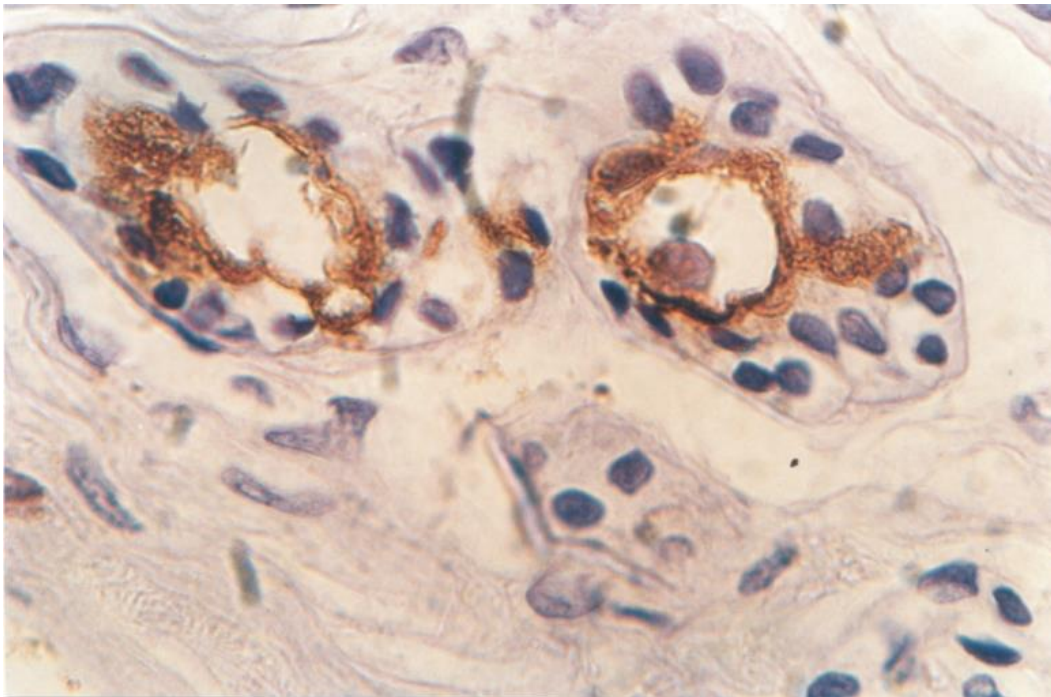
Por IHQ se realizó una observación minuciosa de los patrones de expresión teniendo en cuenta la coloración en toda la muestra o en parte de ella. Asimismo, se consideró el patrón de expresión en la membrana, en el citoplasma, en ambas (mixto) y en el material hallado en las luces glandulares y túbulos. También se tuvo en cuenta la

expresión apical de las células, así como cuando no se hallaba restringida a ese polo de la célula.

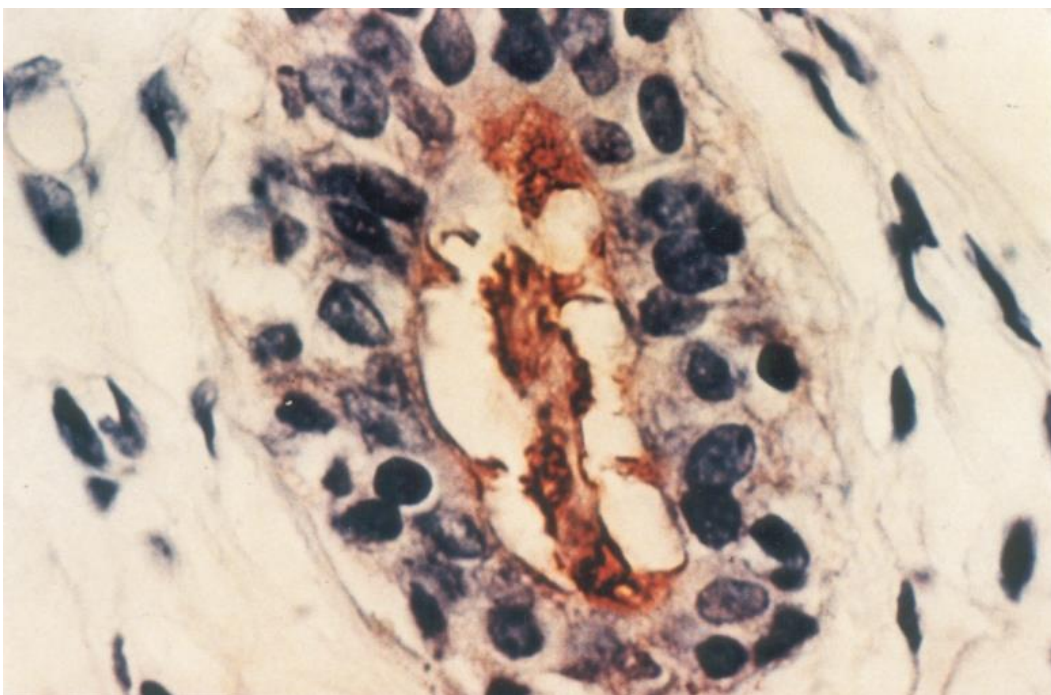
La IHQ de MUC1 presenta un patrón lineal en la membrana apical de células normales y benignas (**Figura 13 A, B**) mientras que una tinción celular difusa con patrones membranosos, citoplásmico o mixto (en membrana y citoplasma) es una característica maligna (**Figura 13 C, D, E, F**). Una reacción frecuente fue la reacción apical en glándulas y túbulos que conservaron su luz en algunas áreas de las muestras de tumores malignos o bien en aquellos más diferenciados.

En las muestras de cáncer de mama fue una observación frecuente la tinción de áreas del mismo, siendo las más diferenciadas las que generalmente dieron reacción positiva mientras que las más indiferenciadas no reaccionaron con igual frecuencia.

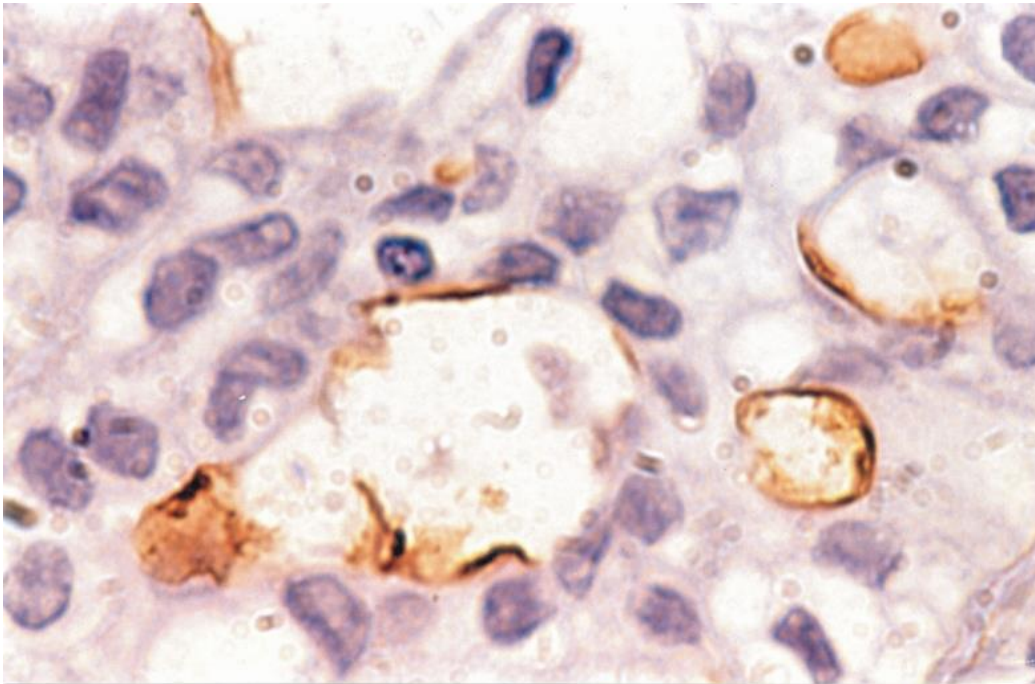
**Figura 13 A:** IHQ de una sección de tejido mamario normal incubado con el AcMo C595. Se observa una reacción positiva principalmente en el borde apical de las células epiteliales con un patrón lineal (400X).



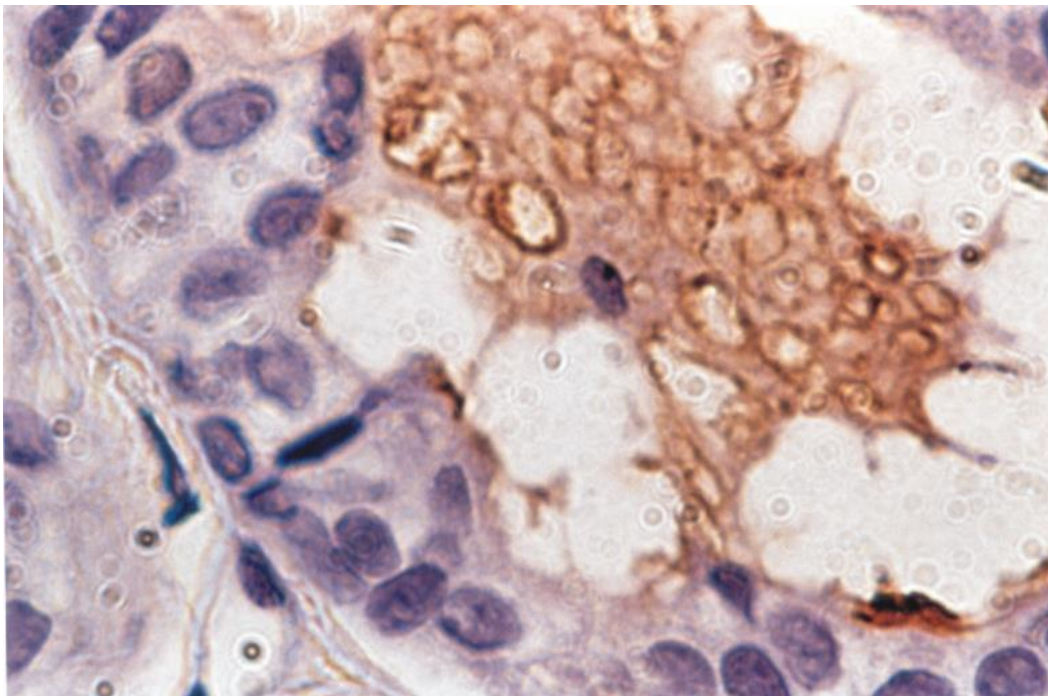
**Figura 13 B:** IHQ de una sección de una displasia de mama incubada con C595. Se encuentra una reacción positiva restringida a las membranas apicales y al contenido de la luz con una intensidad irregular (400X).



**Figura 13 C:** IHQ de una sección de tejido de carcinoma de mama ductal incubado con el AcMo SM3. Se observa una reacción positiva con un patrón discontinuo en las membranas celulares y en los citoplasmas de unas pocas células (400X).

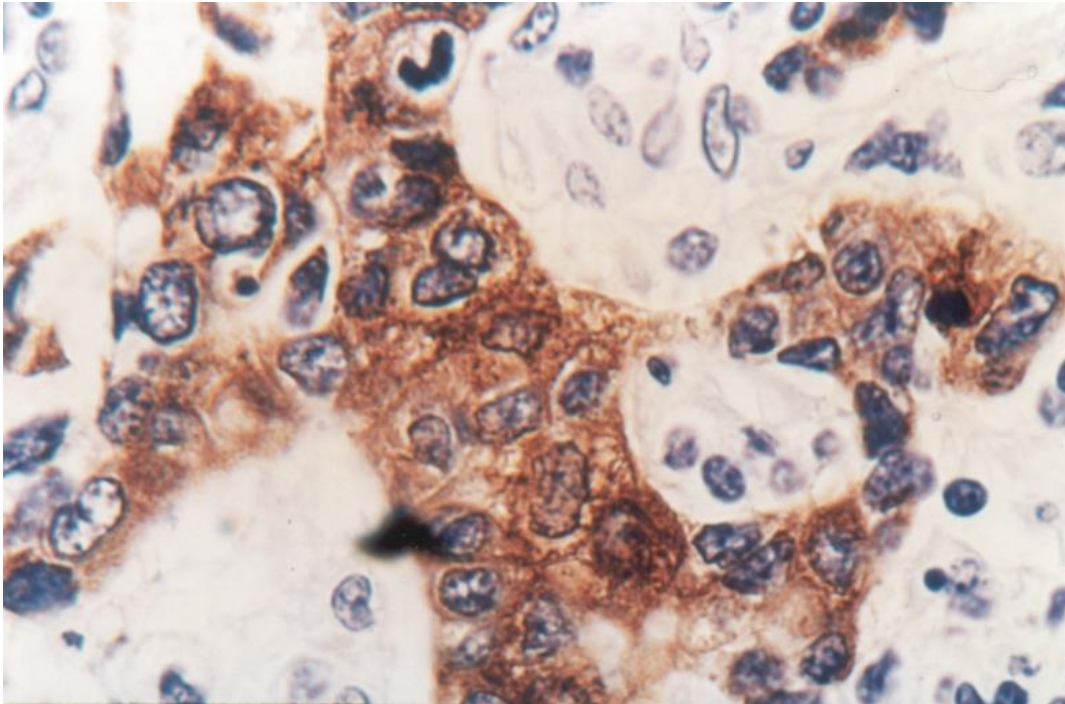


**Figura 13 D:** IHQ de una sección de un carcinoma ductal incubado con HMFG2. Se observa un patrón diferente de reacción que muestra gránulos en la membrana apical y gotas reactivas en la luz (400X).

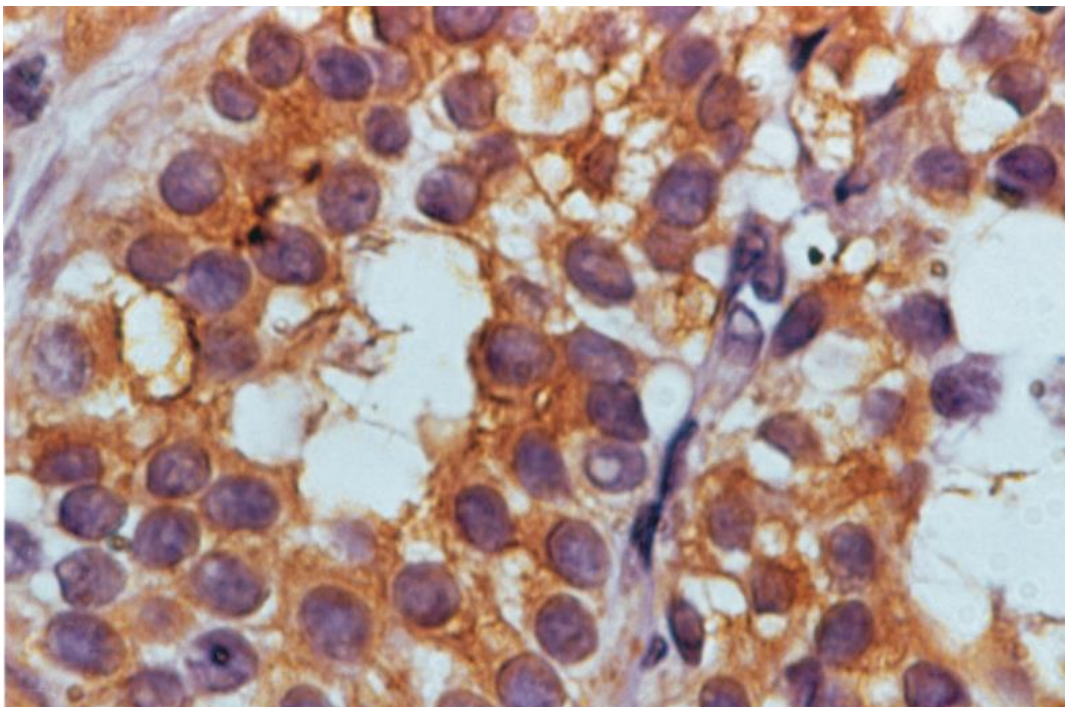




**Figura 13 E:** IHQ de una sección de tejido de un carcinoma de tipo lobulillar incubado con HMFG2. Se evidencia una reacción positiva granular con diferente intensidad en el citoplasma y con una baja tinción a nivel de las membranas celulares (400X).



**Figura 13 F:** IHQ de una sección de un carcinoma ductal infiltrante incubado con C595. Se observa una fuerte reacción a nivel de las membranas celulares y el citoplasma con un patrón granular (400X).



**Tabla 6:** Expresión de MUC1 en muestras tisulares normales y tumorales, tanto benignas como malignas.

AcMo	Clase de Ig	Inmunógeno	Epitope peptídico	Resultados de Inmunohistoquímica Porcentaje de positivos					
				Cáncer de Mama				Enfermedades Benignas	Tejido Normal
				Ductal	Lobulillar	Medular	Total		
<b>C595</b>	IgG3	Urotelio	RPAP	58%	55%	67%	58%	56%	65%
<b>HMFG2</b>	IgG1	HMFG*	DTR	58%	64%	67%	61%	44%	53%
<b>SM3</b>	IgG1	HMFG* Deglicosiladas	PDTR	43%	39%	0%	43%	11%	35%

\* Glóbulos de grasa de la leche materna (HMFG: human mammary fat globule)

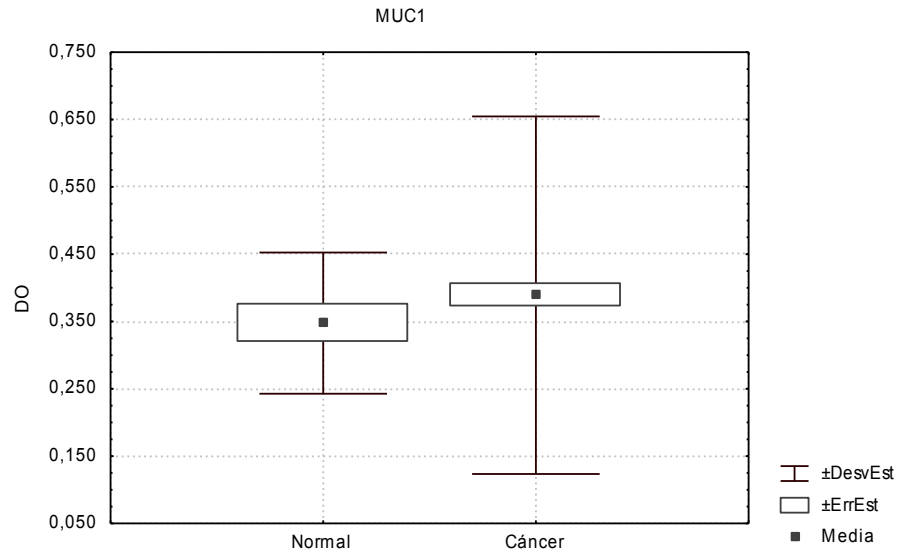
### Determinaciones en muestras séricas (Tabla 7)

#### Niveles séricos de MUC1

Las concentraciones de MUC1 medidas por el método de CASA fueron elevadas en el 25% de las muestras de pacientes con cáncer de mama. En las pacientes en estadio 4, el 57% de las muestras presentaron valores superiores al valor de corte, mientras que un 19% de las muestras de estadio 1, 18% de las muestras de estadio 2 y el 26% de las correspondientes al estadio 3 dieron valores superiores al valor de corte.

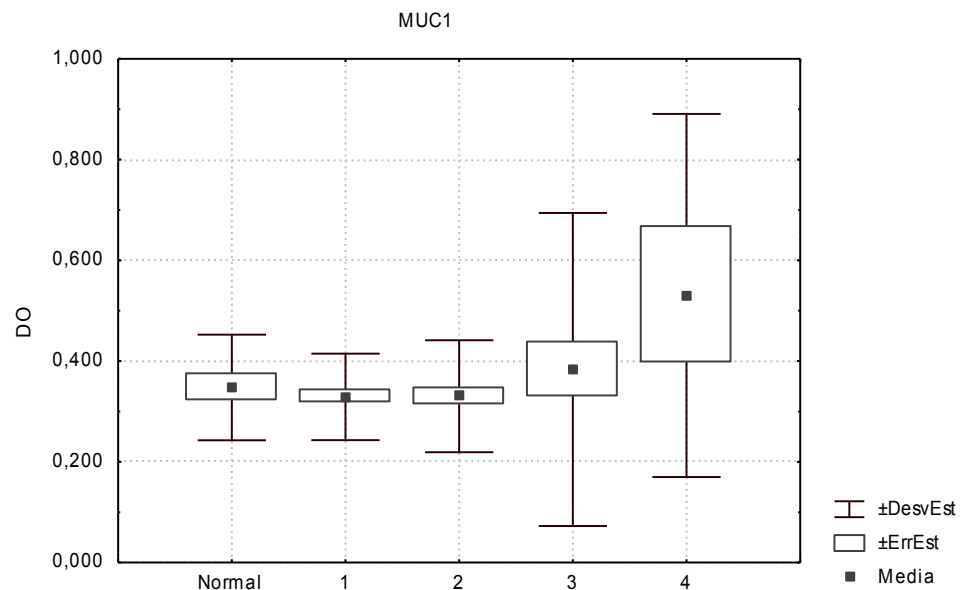
La media obtenida a partir de los valores de CASA de las muestras de cáncer de mama fue de 0.389 unidades de DO a 405nm siendo 0.348 el valor obtenido para 14 muestras de mujeres nulíparas empleadas como controles normales, no hallándose diferencia significativa entre ambas (Figura 14).

**Figura 14:** Niveles de MUC1 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).



La distribución de los valores de CASA según los diferentes estadíos se presenta en la Figura 15. No se hallaron diferencias significativas entre ellos ni con las muestras normales.

**Figura 15:** Niveles de MUC1 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadíos (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).



## **Niveles séricos de MUC1-CIC**

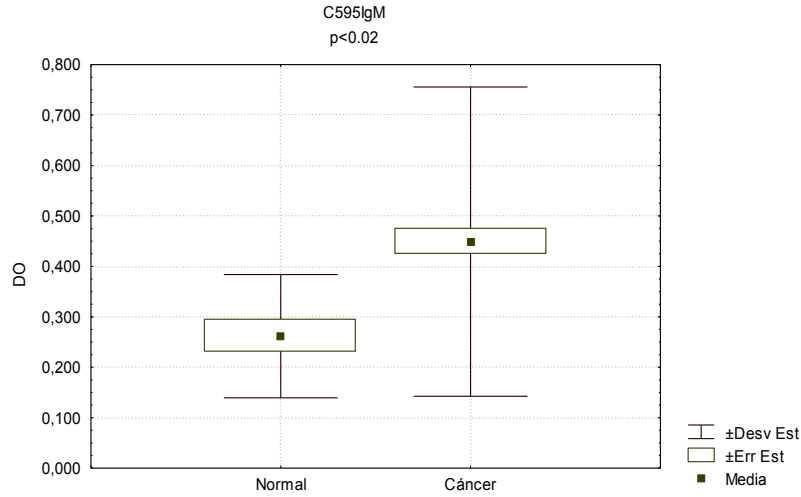
Se utilizaron dos AcMo: C595 y SM3 en los ensayos de ELISA empleados para detectar complejos inmunes circulantes a través de la unión del AcMo con la región peptídica de la MUC1 involucrada en el complejo inmune. Con C595, los MUC1-CIC superaron el valor de corte en el 38% de los casos tanto para IgM como para IgG. Considerando MUC1-CIC-IgM en las pacientes de estadio 1, el 38% de las muestras superó el valor de corte; para el estadio 2, el 46%; el 28 y el 14% para los estadios 2 y 3, respectivamente. Al analizar MUC1-CIC-IgG, el 52% de las muestras del estadio 1 superaron el valor de corte; el 54% de las del estadio 2; el 16% de las correspondientes al estadio 3, y el 29% de las del estadio 4.

Cuando se utilizó el AcMo SM3, los MUC1-CIC-IgM que superaron el valor de corte representaron el 24% y considerando MUC1-CIC-IgG, el 35%. Los CIC de tipo IgM, determinados con SM3 superaron el valor de corte en el 23% de las muestras del estadio 1, el 24% de las del estadio 2, el 8% de las del estadio 3 y el 14% de las correspondientes al estadio 4. Los CIC de tipo IgM superaron el valor de corte en el 62% de los casos correspondientes al estadio 1, en el 48% de los del estadio 2 y el 17% de las del estadio 3. En las muestras del estadio 4 ninguna superó el valor de corte.

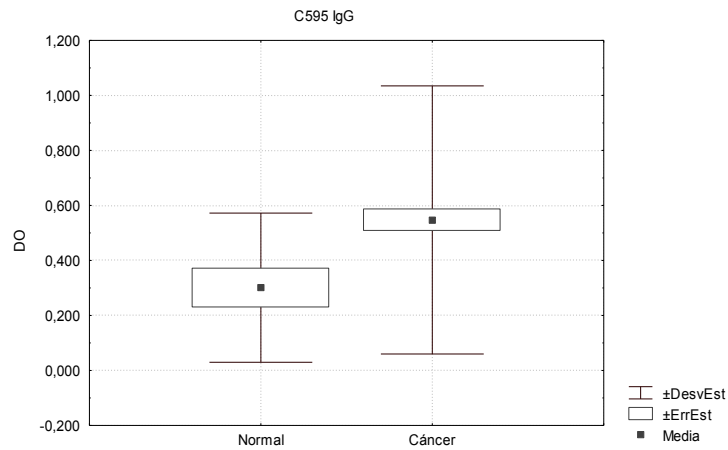
Las medias de las determinaciones de MUC1-CIC-IgM e IgG en los ensayos con C595 fueron de 0.449 y 0.547, respectivamente, siendo las medias correspondientes a los controles normales de 0.262 y 0.301, respectivamente, hallándose una diferencia significativa, en el caso de MUC1-CIC-IgM, entre las muestras de cáncer y las normales ( $p < 0.02$ ) (Figuras 16 y 17). Al discriminar por estadios se observó que existe una diferencia significativa entre los estadios 2 y 3 para los CIC de tipo IgG ( $p < 0.02$ ) (Figuras 18 y 19).



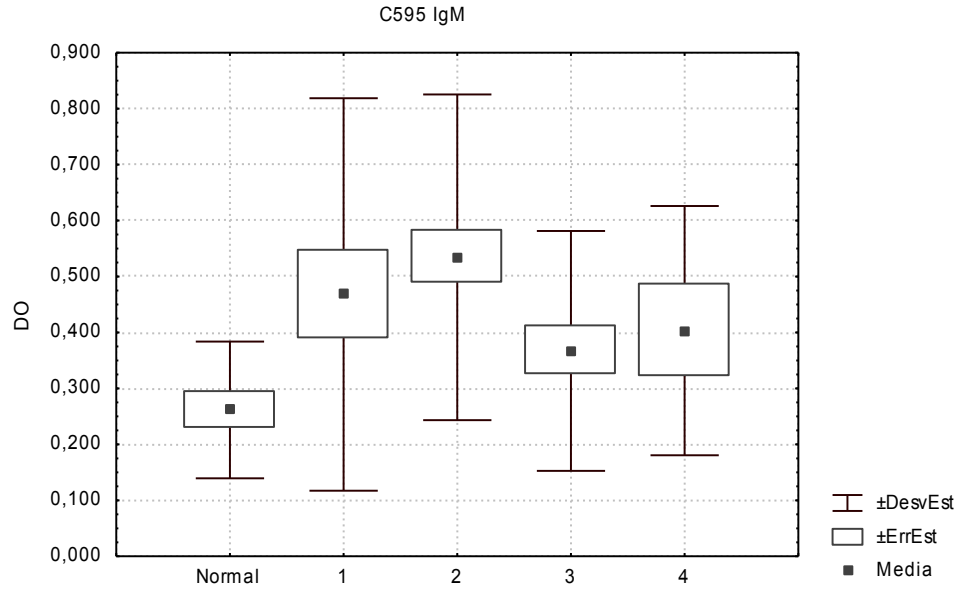
**Figura 16:** Niveles de MUC1-CIC-IgM con el AcMo C595 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).



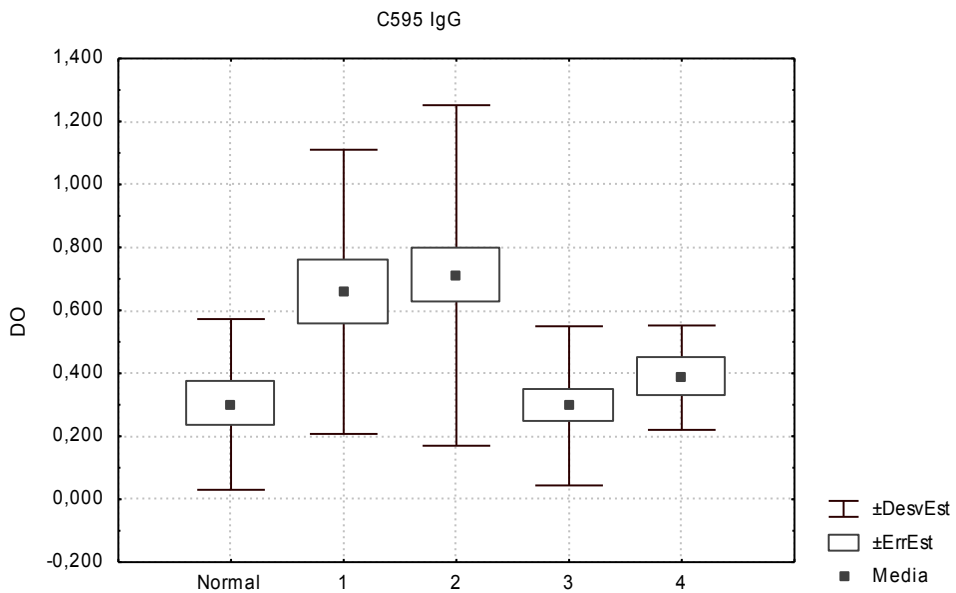
**Figura 17:** Niveles de MUC1-CIC-IgG con el AcMo C595 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).



**Figura 18:** Niveles de MUC1-CIC-IgM con el AcMo C595 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadios (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).

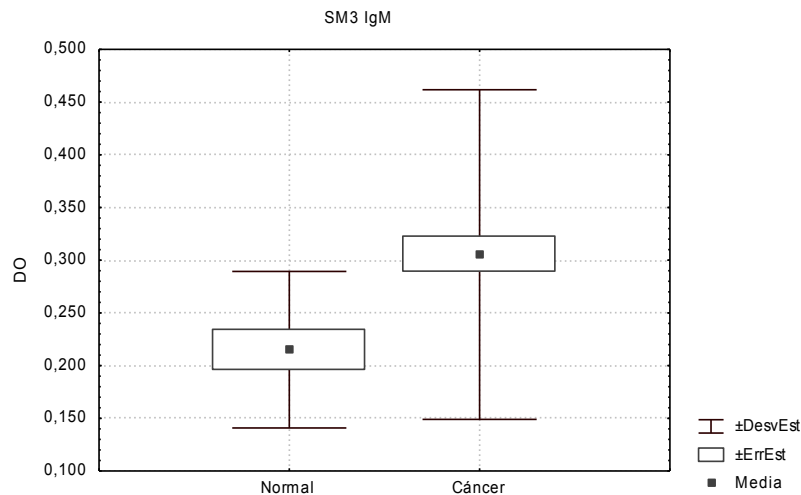


**Figura 19:** Niveles de MUC1-CIC-IgG con el AcMo C595 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadios (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).

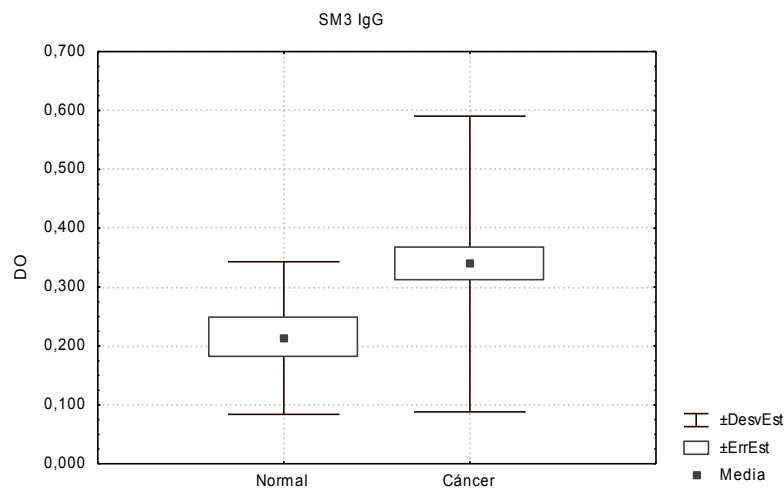


Al utilizar SM3 en el ensayo, las medias obtenidas a partir de las determinaciones de MUC1-CIC IgM e IgG fueron 0.305 y 0.339, respectivamente y, para los controles normales: 0.215 para los CIC de tipo IgM y 0.214 para IgG, hallándose diferencia significativa en los valores de MUC1-CIC-IgM ( $p < 0.05$ ) (Figuras 20 y 21). Analizando por estadío, sólo se halló diferencia significativa entre los valores obtenidos de las muestras del estadio 2 y las de los controles normales para ambos tipos de anticuerpos ( $p < 0.05$ ) (Figura 22 y 23).

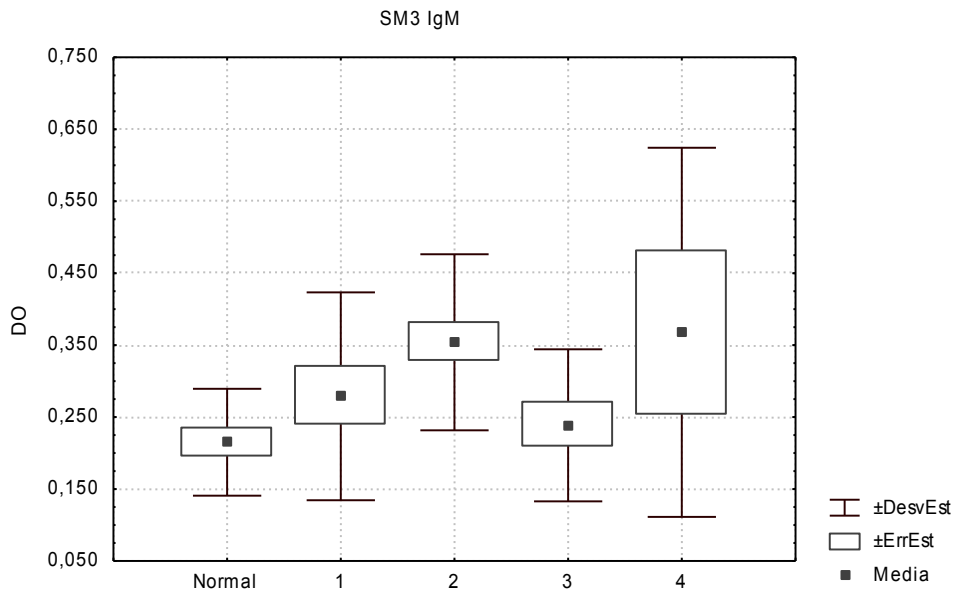
**Figura 20:** Niveles de MUC1-CIC-IgM con el AcMo SM3 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).



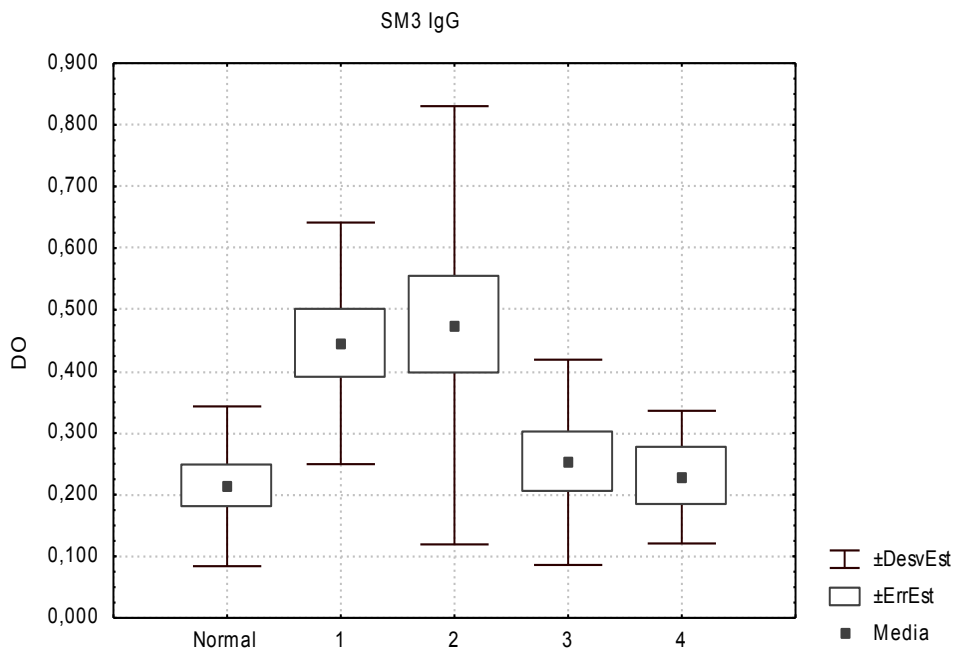
**Figura 21:** Niveles de MUC1-CIC-IgG con el AcMo SM3 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).



**Figura 22:** Niveles de MUC1-CIC-IgM con el AcMo SM3 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadios (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).



**Figura 23:** Niveles de MUC1-CIC-IgG con el AcMo SM3 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadios (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).



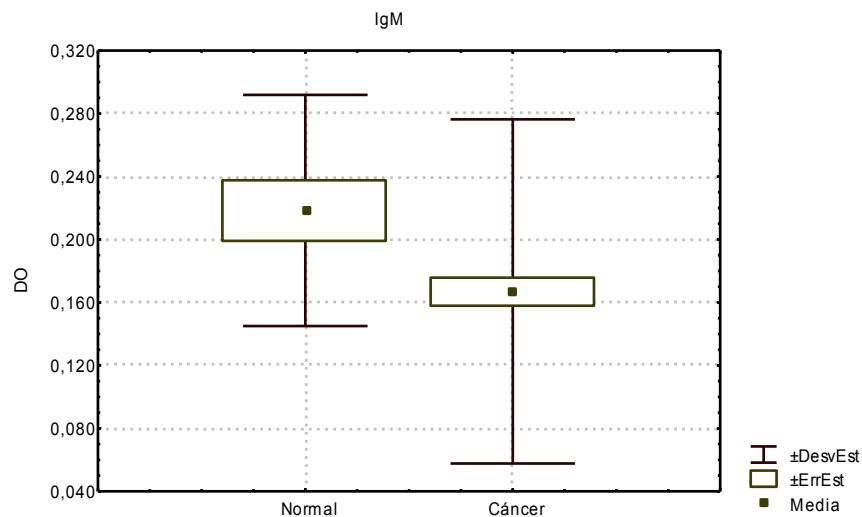
## Niveles séricos de anticuerpos libres anti-MUC1

El 9% y el 22% de las muestras de cáncer de mama superaron el valor de corte en las determinaciones de IgM e IgG, respectivamente. Al determinar IgM, las muestras correspondientes al estadio 1 superaron el valor de corte en el 5% de los casos, en el 8% las del estadio 2 y 3 mientras que en los casos de estadio 4, el 29% lo hizo.

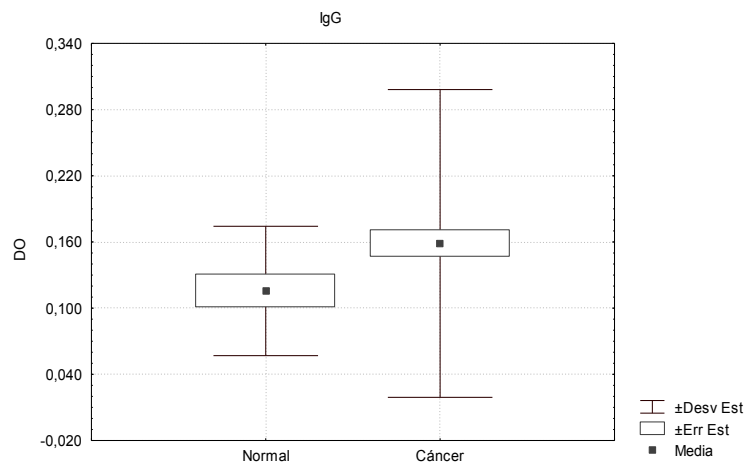
En la detección de IgG, el 29% de las muestras del estadio 1, el 16% de las del estadio 2, el 12% de las del estadio 3 y el 71% de las del estadio 4 superaron el valor de corte.

Las medias obtenidas a partir de las determinaciones de IgM e IgG fueron para las muestras de cáncer de mama: 0.166 y 0.159, respectivamente mientras que para los controles normales fueron: 0.218 y 0.116, respectivamente, sin hallarse diferencias significativas (Figura 24 y 25). Al discriminar por estadios (Figura 26 y 27) no se observaron diferencias significativas entre los grupos considerados.

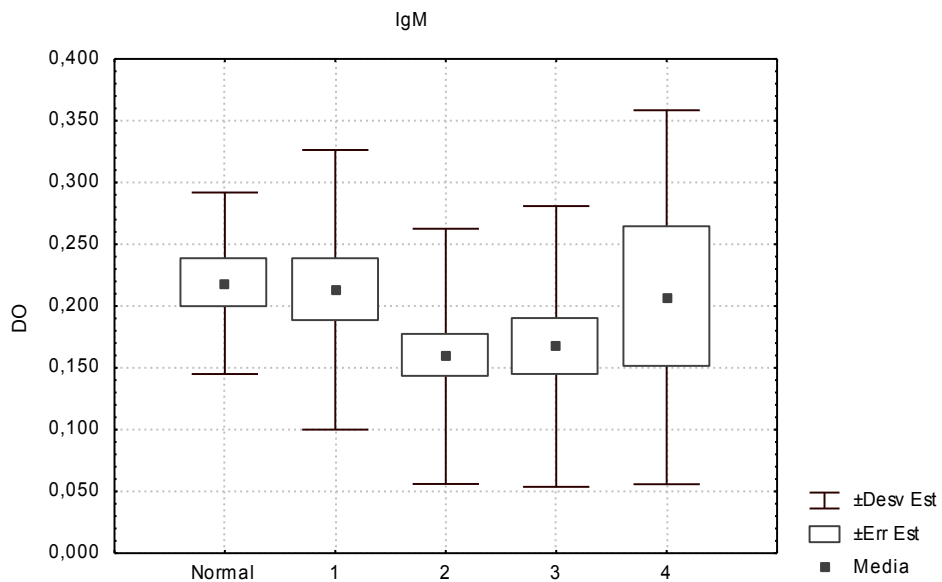
**Figura 24:** Niveles de IgM expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).



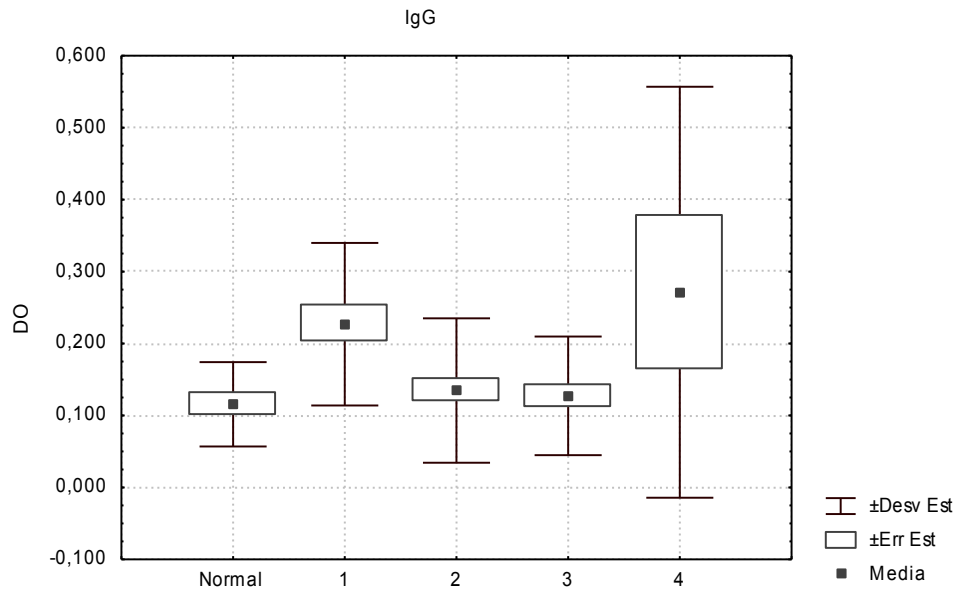
**Figura 25:** Niveles de IgG expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).



**Figura 26:** Niveles de IgM expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadíos (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).



**Figura 27:** Niveles de IgG expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadios (DO: densidad óptica a 405nm, Media: media aritmética, DesvEst: desvío estándar, ErrEst: error estándar).



En todos los ensayos de determinación de anticuerpos libres se incluyeron muestras pre y post-vacunación de sueros de pacientes de cáncer de mama vacunadas según un protocolo desarrollado en Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Nueva York, EEUU.

La vacuna consistió en un péptido de 32 aminoácidos que contenía una secuencia de 1.5 VNTR de la MUC1, una Cys en el extremo N terminal para acoplarse a KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin). Los títulos de anticuerpos determinados por ELISA contra el péptido inmunizante fueron 1:10 y 0 para IgM e IgG, respectivamente en la muestra pre-vacunación y 1:1280 para ambas Ig en la post-vacunación (datos enviados por P. Livingston y G. Ragupathi) .

### **Determinaciones en muestras control pre- y post- vacunación**

En cinco pacientes con cáncer de mama los Ac libres anti-MUC1 mostraron un incremento en las muestras de post-vacunación respecto de las cinco correspondientes a antes de la vacunación; para IgM, la media fue 0.053 para pre-vacunadas y 0.169 para post-vacunadas mientras que IgG presentó los siguientes valores medios: 0.043 para pre-vacunadas y 0.179 para post-vacunadas. MUC1 y MUC1-CIC no mostraron cambios entre pre- y post- vacunadas; para MUC1 la media fue de 0.530 para pre-vacunadas y 0.563 para post- vacunadas. MUC1-CIC IgM medido con C595 presentó un valor medio de 0.357 para pre-vacunadas y de 0.343 para post-vacunadas, mientras que para MUC1-CIC-IgG fue de 0.365 para pre-vacunadas y 0.379 para post-vacunadas. Los valores medios de MUC1-CIC-IgM medidos con SM3 fueron de 0.295 para pre-vacunadas y 0.263 para post-vacunadas, mientras que para MUC1-CIC-IgG medidos con SM3 fueron de 0.398 para pre-vacunadas y 0.407 para post-vacunadas.



**Tabla 7:** Expresión de MUC1 en el suero y muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama de acuerdo al estadio tumoral. Los resultados se expresan como porcentaje de positivos.

		Total	Estadio			
			I	II	III	IV
<b>MUC1 tisular</b>		77%	85%	75	69	80
<b>MUC1 sérica</b>		25%	19%	18%	26%	57%
<b>Ac Anti-MUC1</b>	IgM	9%	5%	8%	8%	29%
	IgG	22%	29%	16%	12%	71%
<b>MUC1-CIC</b>	C595IgM	38%	38%	46%	28%	14%
	C595IgG	38%	52%	54%	16%	29%
	SM3IgM	24%	23%	24%	8%	14%
	SM3IgG	35%	62%	48%	17%	0%

### **Análisis de correlaciones entre muestras tisulares y séricas**

Para el estudio de correlaciones existentes entre la expresión tisular de MUC1, los niveles séricos de MUC1 y de los Ac anti-MUC1, los diferentes estadios de la enfermedad y la edad de las pacientes se seleccionaron un total de 86 muestras de suero y de tumores pre-tratamiento de pacientes con cáncer de mama recién diagnosticado en diferentes estadios de la enfermedad. El 68% de las muestras correspondieron al adenocarcinoma de tipo NOS ductal, el 28% al de tipo lobulillar y el

4% al de tipo medular. Los estadíos de las pacientes fueron los siguientes: el 24% pertenecían al estadio 1, el 42% al estadio 2, el 23% al estadio 3 y el 7% al 4.

Se empleó un análisis estadístico multivariado por Análisis de Componente Principal (PCA) con correlación clásica ( $p < 0.05$ ).

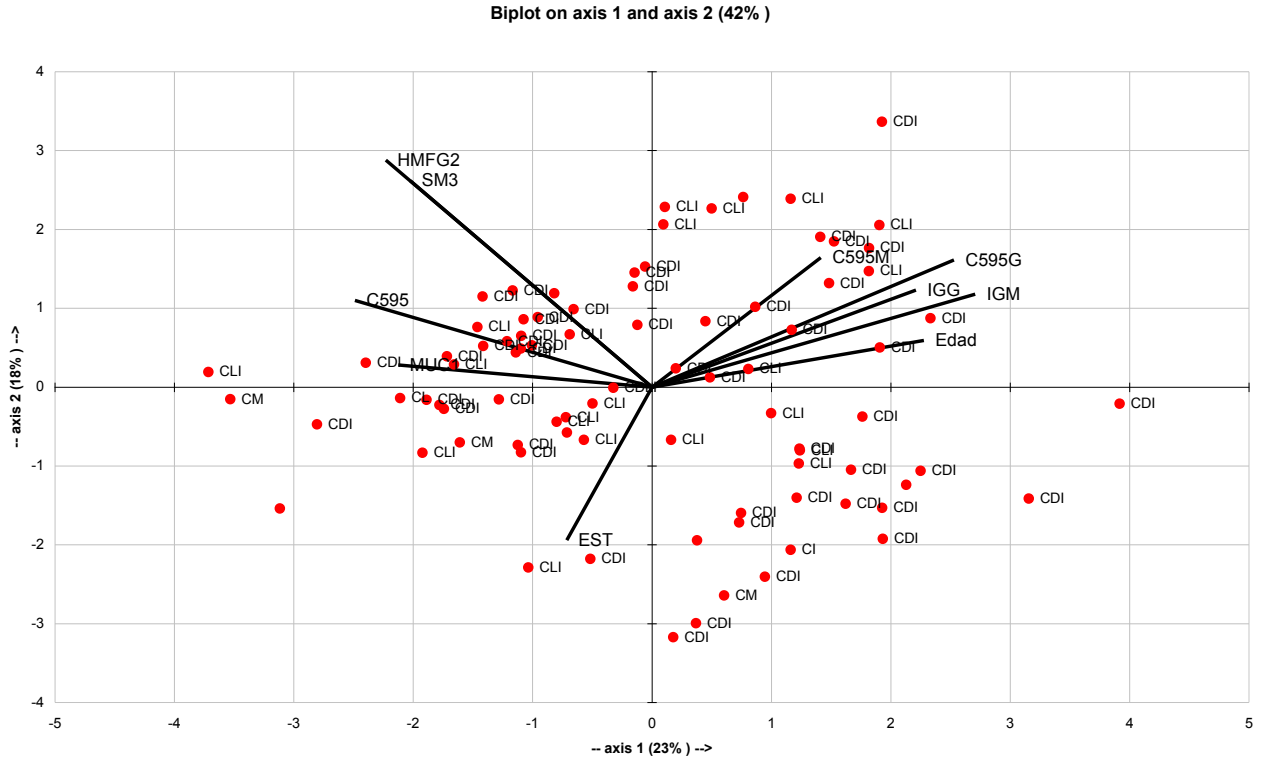
Se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre la expresión tisular con C595 y HMFG2 ( $r = 0.3443$ ), entre HMFG2 y SM3 ( $r = 0.6163$ ) y entre SM3 y C595 ( $r = 0.2455$ ). Asimismo los tres AcMo empleados en IHQ se correlacionaron significativamente con los niveles séricos de MUC1 libre, determinada por el método de CASA (para C595,  $r = 0.1486$ ; para HMFG2,  $r = 0.2319$  y para SM3,  $r = 0.2067$ ). La expresión tisular estudiada con C595 y HMFG2 presentó una correlación negativa estadísticamente significativa con los niveles séricos de Ac libres de tipo IgM ( $r = -0.1756$  y  $r = -0.1299$ ). Los niveles séricos de MUC1 presentaron correlación estadísticamente significativa negativa con los MUC1-CIC-IgG medidos con el AcMo C595 (C595IgG) ( $r = -0.1365$ ) y con los Ac libres de tipo IgM ( $r = -0.1441$ ), como así también con la edad de las pacientes ( $r = -0.2200$ ) y a su vez una correlación positiva estadísticamente significativa con el estadio tumoral ( $r = 0.2850$ ). Los MUC1-CIC-IgM mostraron correlaciones positivas estadísticamente significativas con los MUC1-CIC de tipo IgG ( $r = 0.3097$ ) y con los Ac de tipo IgM ( $r = 0.2441$ ). Los MUC1-CIC de tipo IgG se correlacionaron negativamente con los estadíos tumorales ( $r = -0.2445$ ) y con la expresión con C595 ( $r = -0.2575$ ) y positivamente con IgM ( $r = 0.2863$ ) y con la edad de las pacientes ( $r = 0.3137$ ) de manera significativa. Se obtuvieron, por otra parte, correlaciones estadísticamente significativas positivas entre IgM e IgG ( $r = 0.5817$ ) y entre IgG y la edad de las pacientes ( $r = 0.2390$ ). A su vez, los estadíos tumorales presentaron una correlación negativa estadísticamente significativa con la edad de las pacientes ( $r = -0.1352$ ).

En la Figura 28 puede apreciarse la distribución de las distintas variables analizadas, representadas como vectores y la dispersión de las muestras que se representaron como puntos y se diferenciaron según el tipo histológico al que correspondió el tumor (CDI: carcinoma NOS ductal, CLI: carcinoma lobulillar, CM: carcinoma medular). Mediante el empleo del Análisis de Componentes Principales (PCA) se obtuvieron una serie de factores capaces de resumir y explicar las variaciones entre las muestras. A partir de los dos factores principales se construyó un sistema de coordenadas donde la abscisa representó el Factor 1 y la ordenada representó el Factor 2. El porcentaje incluido con cada factor representó la magnitud de las variaciones observadas que dicho factor fue capaz de explicar. La longitud de cada vector fue directamente proporcional al peso que esa variable tuvo para el modelo: La proximidad del vector a la abscisa o a la ordenada representó a su vez la correlación que las variables presentaron con los factores 1 y 2, así como la proyección de esa variable sobre los ejes demostró el peso de la variable sobre cada factor. Con el empleo de este sistema los factores 1 y 2 lograron explicar las variaciones observadas en el 42% de los datos.

#### **Análisis de pacientes en estadio IV**

En una paciente se detectó un nivel de CASA muy elevado (DO=1.314) con bajos niveles de anticuerpos libres y CIC; otra paciente presentó bajos niveles de todos los parámetros medidos. Un caso presentó todos los parámetros por debajo del valor de corte, pero se encontró expresión tisular. En otro caso se hallaron los siguientes parámetros: MUC1 superior al valor de corte y elevados niveles de Ac libres y de MUC1-CIC. En otra paciente se hallaron niveles elevados de MUC1, IgG libres e inmunocomplejos. Otro caso presentó un excepcional panel de marcadores: MUC1 cercano al valor de corte, no se detectó MUC1 tisular y tampoco MUC1-CIC, pero se detectaron Ac libres en altos niveles.

**Figura 28:** Análisis de Componentes Principales de la contribución relativa de la expresión antigénica detectada con los AcMo C595, HMFG2 y SM3 y de los niveles séricos de MUC1 y de Ac libres y bajo la forma de inmunocomplejos, con el estadio y la edad de las pacientes, representados por el Factor 1 (abscisa) y el Factor 2 (ordenada). Las muestras de las pacientes se identificaron según el tipo histológico del tumor y se representaron por puntos.



## Expresión antigénica de MUC1-CT

### Muestras de tejidos tumorales

Para el estudio de la cola citoplasmática de MUC1 se seleccionaron 98 muestras de tumores pre-tratamiento de pacientes con cáncer de mama recién diagnosticado en diferentes estadios de la enfermedad. Las muestras de cáncer de mama fueron del tipo de carcinoma invasor: 57% de tipo NOS ductal, 31% de tipo lobulillar, 8 % de tipo carcinoma papilar ductal in situ (DCIS) con componente invasor y 4% de tipo medular. También se estableció el estadio: 23% pertenecientes al estadio I, 46% al estadio II, 26% al estadio III y 5% al estadio IV. Las muestras de tejido provenientes de biopsias normales (n=7) fueron obtenidas de mastoplastía e incluídas como controles, así como las de 6 pacientes con enfermedades mamarias benignas.

Por IHQ con el AcMo CT2 se observó un alto porcentaje de reacción positiva (93%). En el 66% de las muestras positivas, la reacción comprendió toda la muestra, mientras que en el 34% restante se restringió a unas pocas áreas de la muestra. En la mayoría de los casos, la reacción fue intensa (+++). La Tabla 8 muestra el porcentaje de resultados positivos, así como el patrón de reacción de acuerdo al tipo tumoral.

Se encontró considerable heterogeneidad de reacción a nivel de la localización celular en el carcinoma ductal NOS. En el 44.2% de las muestras, sólo reaccionaron positivamente las membranas plasmáticas. Varios tumores presentaron una reacción continua, mientras que otros presentaron reacción discontinua. En varias muestras también se coloreó el contenido luminal. Frecuentemente, se observó una reacción citoplasmática junto con una reacción de membrana en un patrón mixto (**Figura 29 A y B**). En el 17.3% de los casos, la reacción fue restringida al citoplasma en un patrón homogéneo o con aspecto granular (**Figura 29 C**).

En el 64% de los casos de carcinoma lobulillar, reaccionaron membranas y citoplasmas con un patrón mixto (**Figura 29 D**). En el 21% de los especímenes, la reacción comprendió sólo el citoplasma, mientras que, en pocas muestras se restringió a la membrana plasmática.

Todos los DCIS papilares con componente invasor presentaron reacción positiva, principalmente en la membrana plasmática. Usualmente la reacción cubrió la papila interna y externamente (**Figura 29 E**). Dos especímenes presentaron un patrón mixto de reacción.

En los de tipo medular, la reacción citoplasmática fue predominante o exclusiva.

No se obtuvo correlación estadísticamente significativa entre estadio tumoral o tipo histopatológico y la expresión de MUC1-CT detectada con CT2.

El análisis inmunohistoquímico también incluyó un anti-MUC1 dirigido contra la región VNTR (C595). La intensidad de reacción fue la siguiente: el 26% de las muestras malignas mostraron intensidad fuerte; 44%, moderada; 29%, baja, y 22% fueron negativas. Los porcentajes de reactividad según la localización subcelular y el tipo tumoral se muestran en la Tabla 8. Se encontraron similares porcentajes de reacción membranosa y citoplasmática, principalmente en un patrón mixto.

El análisis estadístico no mostró ninguna correlación entre la detección de MUC1 y estadio o tipo histopatológico. El análisis multivariado por PCA con correlación de Kendall mostró una correlación significativa entre CT2 y C595 ( $\tau=0.5147$ ).

### **Muestras benignas y normales**

Con el AcMo CT2 dirigido hacia la cola citoplasmática de MUC1 todos los controles dieron positivos. La expresión de MUC1 en muestras benignas y normales fue similar. Algunos especímenes mostraron una reacción restringida a unas pocas áreas pero otras mostraron una tinción más extensa. El patrón de reacción fue principalmente

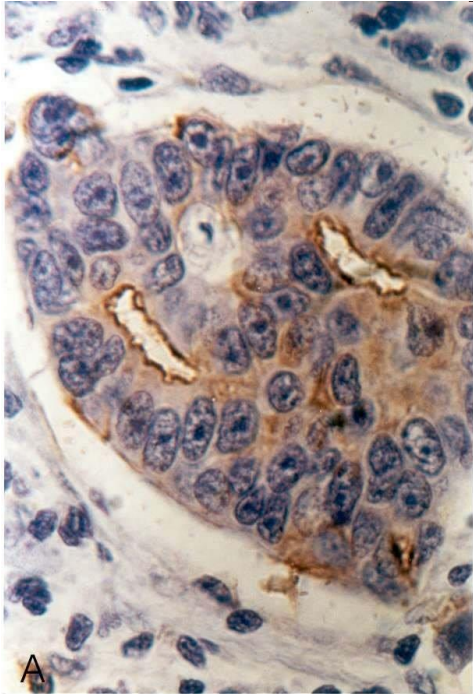
apical (**Figura 29 F**), aunque algunas muestras también mostraron una reacción citoplasmática cercana a la membrana apical.

Con el AcMo C595, las muestras benignas de mama presentaron expresión de MUC1 en el 33% de las muestras, mientras que entre las normales el 43% fueron reactivas. El patrón de reacción fue principalmente restringido a la membrana apical.

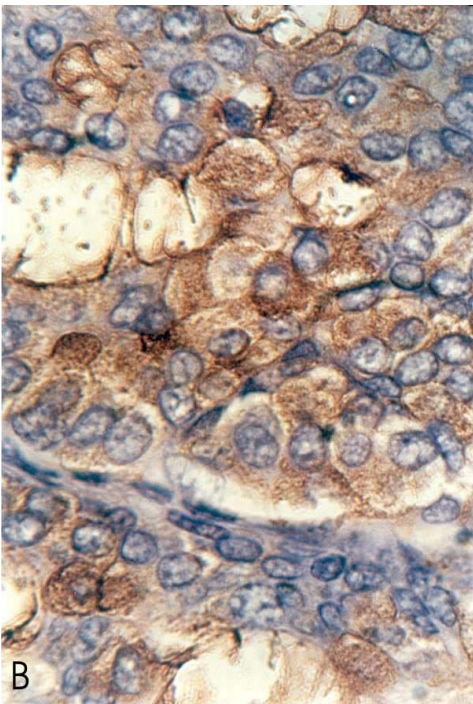
**Tabla 8:** Patrón de expresión estudiado por inmunohistoquímica en muestras de carcinoma de mama (%).

Tipo histológico	Positivos		Membrana		Citoplásmico		Mixto	
	CT2	C595	CT2	C595	CT2	C595	CT2	C595
NOS ductal	93	70	44.2	20.5	17.3	15.5	38.5	64
Papilar	100	87.5	75	29	0	0	25	71
Lobulillar	93	80	14	8.5	21	29	64	62.5
Medular	75	50	0	50	33	50	67	0

**Figura 29 A:** IHQ de una sección de tejido proveniente de un carcinoma de mama de tipo NOS ductal incubada con el AcMo CT2 en la cual se observa una reacción lineal continua en dos estructuras tubulares bien formadas. Algunas células presentan una reacción granular adyacente a la membrana nuclear (630X).

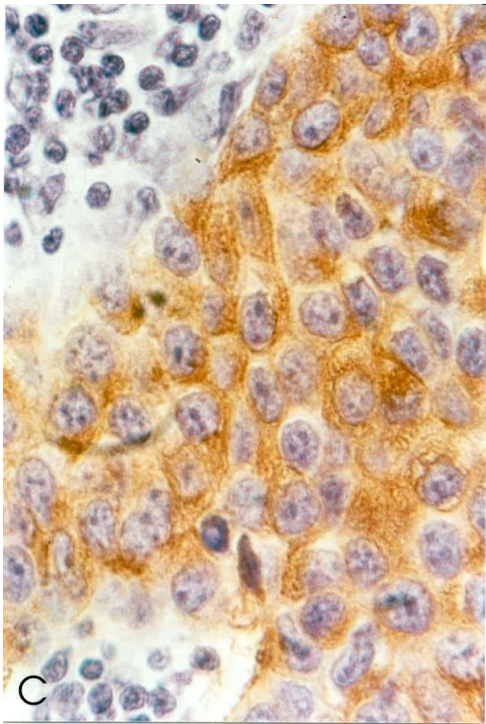


**Figura 29 B:** IHQ de una sección de un carcinoma ductal NOS incubada con el AcMo CT2. Se evidencia un patrón granular en todo el citoplasma y en forma discontinua n la membrana plasmática (630X).

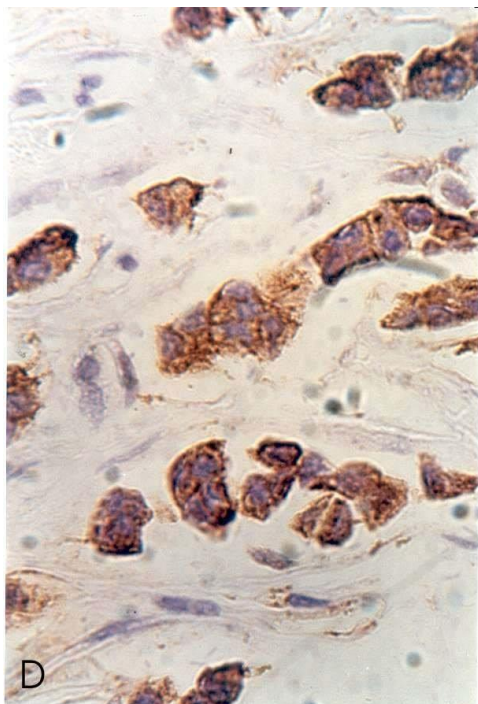




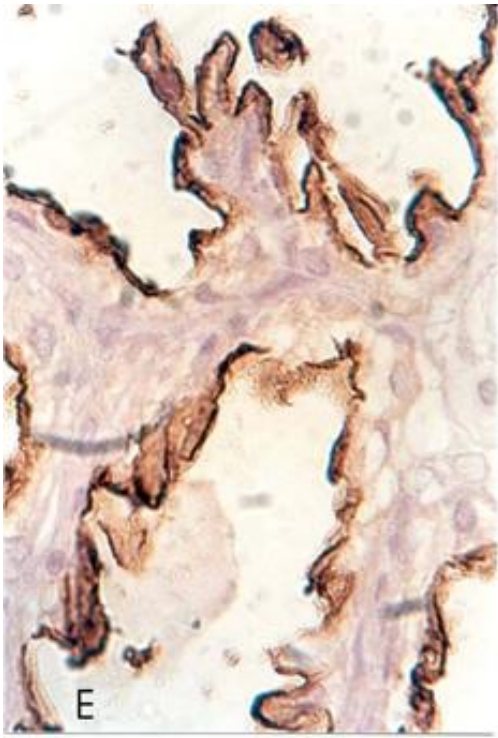
**Figura 29 C:** IHQ de una sección de un carcinoma NOS ductal incubada con el AcMo CT2. Se muestra una reacción positiva con un patrón granular discontinuo restringido al citoplasma. Se observan dos zonas que presentan una reacción inflamatoria. (630X).



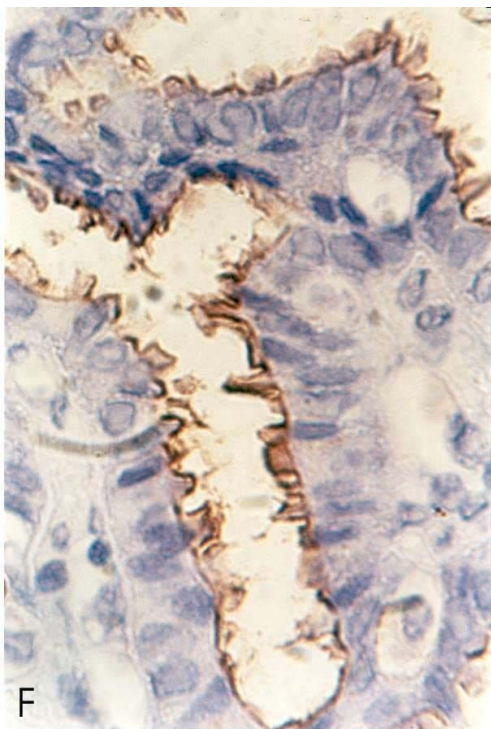
**Figura 29 D:** IHQ de una sección de un carcinoma de tipo lobulillar incubada con CT2 que muestra las células malignas ubicadas formando cordones y presentan una tinción positiva discontinua a nivel de la membrana plasmática y un patrón granular en el citoplasma (630X).



**Figura 29 E:** IHQ de una sección de un carcinoma de tipo papilar incubada con CT2 que muestra una intensa reacción positiva con un patrón lineal restringido a la superficie papilar apical (630X).



**Figura 29 F:** IHQ de una sección de una displasia atípica incubada con CT2 que presenta una reacción positiva en la membrana apical (630X).



## **Análisis de fracciones subcelulares por SDS-PAGE y Western Blot**

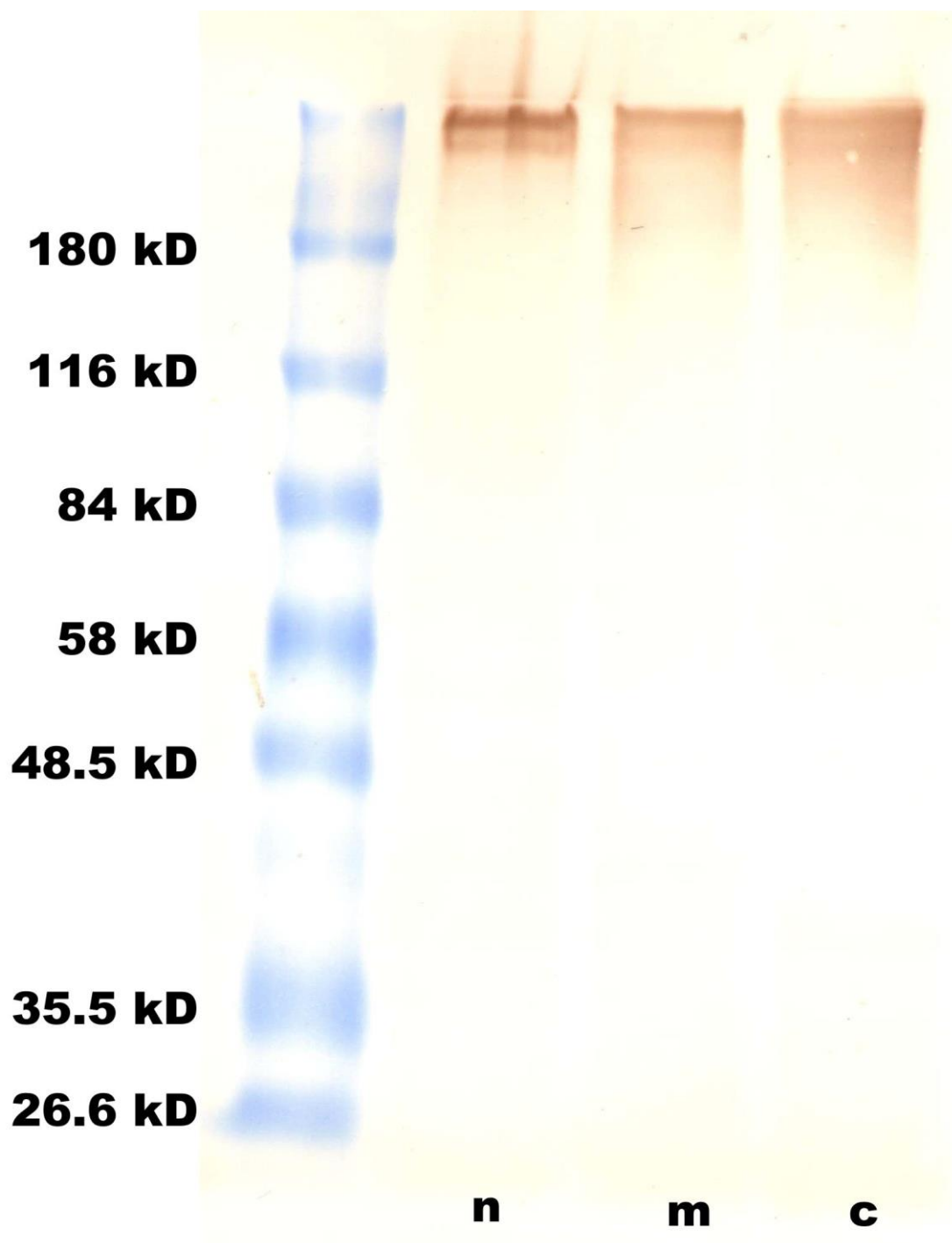
Todas las muestras tisulares fueron sometidas a fraccionamiento subcelular seguido de SDS-PAGE y Western blot de las fracciones obtenidas. En las fracciones de cáncer de mama se detectó la presencia de varias bandas de diferentes pesos moleculares. Con CT2, la fracción de membrana (m) fue la de reacción más intensa. En la **Figura 30 A** una fuerte banda de reacción se observó alrededor de <30kD y otras menores se hallaron aproximadamente a 60 kD. Las fracciones nucleares (n) y citoplasmáticas (c) mostraron la misma reacción con una menor intensidad de tinción. En algunas muestras, la banda de <30kD se encontró subdividida en dos.

La incubación con C595 mostró una doble banda de reacción a aproximadamente 180-200 kD en todas las fracciones derivadas de cáncer de mama (**Figura 30 B**). En un tercio de las muestras, se hallaron bandas de PM de aproximadamente 200kD en las fracciones de núcleo, membrana y citoplasma. En todas las fracciones se observó un chorreado desde >50kD hasta >200kD. En la fracción nuclear, el 32% de las muestras mostraron bandas adicionales a 50, 60 y 70kD. En el 29% de las fracciones de membrana, se encontraron bandas de 25, 40, 50, 60, 70 y 100 KD. Finalmente, en el 50% de las fracciones citoplasmáticas, se observaron bandas de 25, 40, 50, 60, 70 y 80 kD.

Mediante el uso del AcMo CT2, las fracciones de núcleo, membrana y citoplasma de las muestras control presentaron bandas a 30 kD y una aproximadamente a 60 kD. En algunas muestras, se identificó una doble banda a >180kD correspondiente a la fracción de membrana.

Con C595, se observó una doble banda a 180 kD en todas las fracciones. Frecuentemente se halló una reacción de chorreado desde 50-60 kD hasta >200kD en las fracciones de membrana y nuclear. En la fracción nuclear de 3 muestras normales y de 2 benignas, también se hallaron bandas a 70 y 80 kD.

**Figura 30:** Western blot de fracciones subcelulares pertenecientes a muestras de cáncer de mama (n: fracción nuclear; m: fracción de membranas extranucleares; c: fracción citoplasmática). Las bandas obtenidas con el estándar de pesos moleculares se encuentran a la izquierda. **A**-Mediante incubación con el AcMo CT2 se observa un chorreado y bandas intensas a aproximadamente 30 kD. **B**-Se evidencia una doble banda a aproximadamente 200 kD, principalmente en la fracción de membrana luego de la incubación con el AcMo C595.



## **Aislamiento de células tumorales de médula ósea. Expresión antigénica de tumores primarios**

Se incluyeron en este estudio un total de 17 pacientes con carcinoma primario de mama. Las muestras de cáncer de mama fueron del tipo de carcinoma invasor: 82% de tipo NOS ductal, 12% de tipo lobulillar y 6% de tipo carcinoma ductal in situ (DCIS) con componente invasor. También se estableció el estadio: 35% pertenecientes al estadio I, 23.5% al estadio II, 23.5% al estadio III y 18% al estadio IV. De cada paciente se obtuvo una muestra de tumor primario, una muestra de suero y un aspirado de MO.

Como control negativo se utilizó MO de pacientes sin enfermedad maligna o con enfermedades malignas hematológicas no epiteliales.

Como control positivo se utilizaron células de la línea celular MCF-7, que expresa MUC1, diluídas en un aspirado de MO de una paciente con anemia megaloblástica.

La expresión de MUC1 se estudió por medio de tres AcMo dirigidos contra la región VNTR. En todos los tumores se encontró reacción positiva y en el 53% de las muestras los tres AcMo dieron positivos.

El patrón de expresión fue lineal, citoplasmático y mixto principalmente no apical. En la mayoría de los casos, la intensidad de la coloración varió de fuerte a moderado (Tabla 9).

La **Figura 31 A** muestra un ejemplo de reactividad con SM3.

Los antígenos carbohidratos han sido relacionados con el proceso de metástasis de tumores de distintas localizaciones. En consecuencia, en las células neoplásicas halladas en la MO se estudió la expresión de cuatro antígenos carbohidratos involucrados en la invasión y la metástasis. El hapteno Tn se encontró en el 29.5% de los tumores con una reacción leve y restringida a algunas áreas y un patrón mixto (**Figura 31 C**). El antígeno Lewis x fue expresado en el 59% de los especímenes, en

general, se detectó una fuerte reacción no apical, mayormente en el citoplasma, aunque también en algunas membranas. En el 12% de las muestras de cáncer de mama se detectó en ciertas áreas el antígeno sialil-Lewis x con un patrón mixto. El antígeno Lewis y se observó en algunas células de una muestra con una coloración moderada en membrana y citoplasma.

Se estudió la expresión del producto del proto-oncogén erbB2. Este marcador usualmente resulta de la sobreexpresión de la proteína 185<sup>erbB2</sup> debido a una amplificación del gen. Se expresó ErbB2 en el 12% de las muestras de estadio IV, las restantes no presentaron este marcador. También se incluyó en este estudio ErbB3 cuyo producto consiste en una proteína de 160 kD que es miembro de la familia de receptores de factor de crecimiento tipo 1. Todas las muestras dieron negativas con anti- ErbB3.

### **Antígenos asociados a tumor e histogénicos de médula ósea**

En la MO de 7 pacientes se aislaron células tumorales: 2 de estadio I, 1 de estadio II, 1 de estadio III y 3 de estadio IV. Los resultados se muestran en la Tabla 11. La naturaleza epitelial de las células aisladas de MO quedó demostrada por su reactividad con anti EpCAM (provisto por el kit comercial) y con anti-citoqueratinas. La reacción negativa con anti-CD34 y con anti-CD45 demostró que no se trataba de células normales presentes en la médula ósea.

### **MUC1 y antígenos carbohidratos asociados en MO**

Todas las células tumorales aisladas de MO expresaron MUC1 (**Figura 31 B**) y en un alto número de casos también expresaron Tn (**Figura 31 D**), sLe<sup>x</sup> y Le<sup>x</sup>, mientras Le<sup>y</sup> fue encontrado esporádicamente (Tabla 10). En una paciente se aislaron también células neoplásicas de la sangre periférica. Estas células fueron reactivas con los tres AcMo anti-MUC1 y también con los AcMo anti-carbohidratos.

**Tabla 9:** Expresión de MUC1 en muestras de pacientes portadoras de cáncer de mama de acuerdo a su estadio tumoral (+=leve, += moderado, +++=fuerte, -=negativo).

Tipo histológico	Estadio	Anticuerpos Monoclonales						
		C595	HMFG2	SM3	KM93	KM380	C14	Tn
Papilar	I	++	+++	++	-	-	-	-
NOS ductal	I	++	++	+	++	++	-	+
Lobulillar	I	-	++	-	-	+++	-	-
NOS ductal	I	++	+++	+++	++	+++	-	+
NOS ductal	I	++	++	++	-	+++	-	-
NOS ductal	I	++	-	-	-	-	-	-
NOS ductal	II	+++	-	++	-	+	-	-
NOS ductal	II	++	++	+	-	-	-	-
NOS ductal	II	-	-	++	-	+++	-	-
NOS ductal	II	-	++	++	-	-	-	-
NOS ductal	III	++	-	-	-	-	-	-
NOS ductal	III	++	++	++	-	+++	++	-
NOS ductal	III	++	++	-	-	+++	-	+
NOS ductal	III	-	++	+	-	++	-	-
NOS ductal	IV	+++	++	++	-	-	-	+
NOS ductal	IV	++	++	++	-	+++	-	+
NOS ductal	IV	+++	+++	+++	-	-	-	-

**Tabla 10:** Expresión de MUC1 en células aisladas de aspirados de médula ósea.

Estadíos	AcMo						
	C595	HMFG2	SM3	KM93	KM380	C14	Tn
I	+++	+++	+++	-	++	-	+
I	++	++	++	+	+		-
II	-	+++	+++	-	+	-	-
III	++	++	++	+	-	-	+
IV	+++	+++	+++	-	-	-	+
IV	+++	+++	+++	+	++	+	+
IV	+++	+++	+++	-	+	-	+

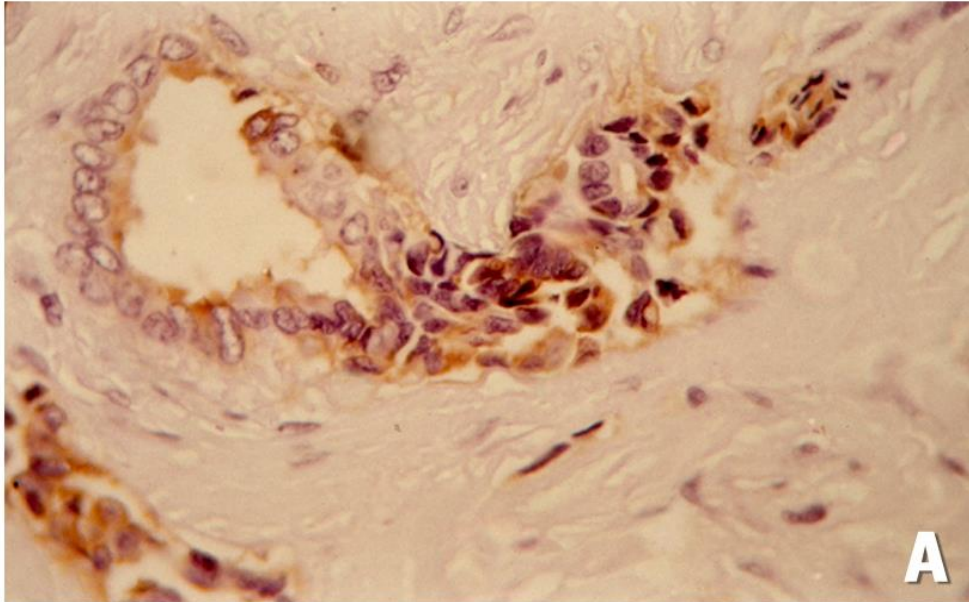
### Expresión antigénica de células MCF-7

Las células de la línea celular MCF-7 fueron diluídas en un aspirado de MO proveniente de un paciente con anemia megaloblástica. Estas células mostraron una fuerte reactividad con HMFG2 y moderada con C595 y SM3, mientras que con KM380 y anti-Tn mostraron una baja reacción restringida a algunas células. En todos los casos el patrón de expresión fue citoplasmático.

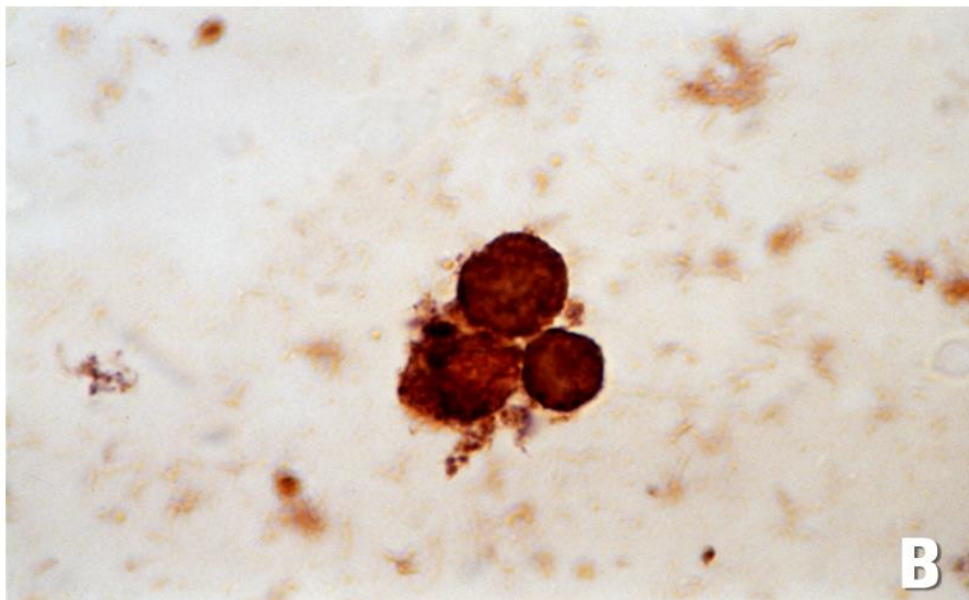
Se emplearon como controles negativos muestras de MO de pacientes sin enfermedad maligna o con enfermedades malignas hematológicas no epiteliales. Estas muestras no reaccionaron con ninguno de los AcMo empleados.



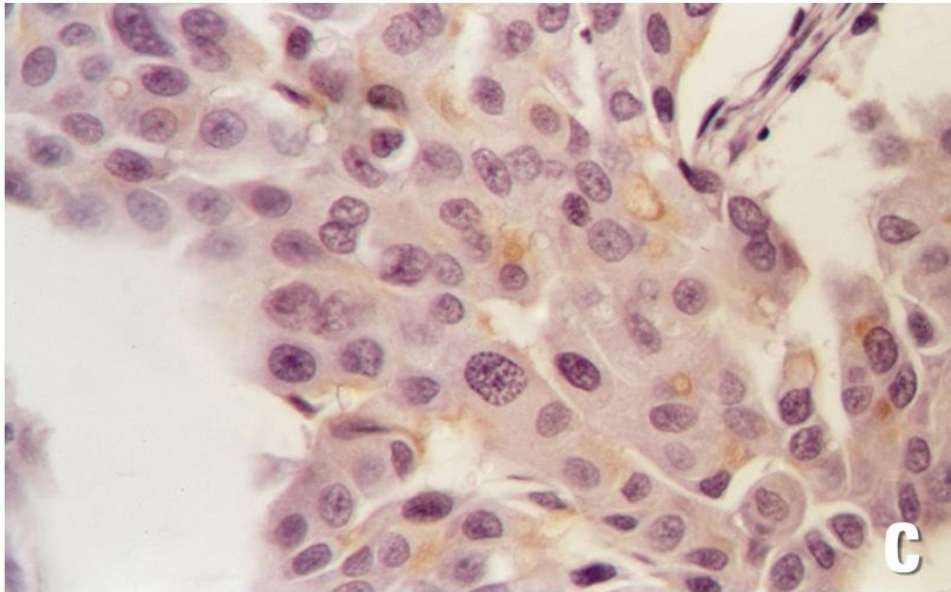
**Figura 31 A:** IHQ de un tumor primario de mama incubada con el AcMo SM3. Se evidencia una reacción positiva heterogénea en todo el citoplasma y la membrana plasmática con un patrón discontinuo en el borde apical de una pseudoglandula neoplásica (100X).



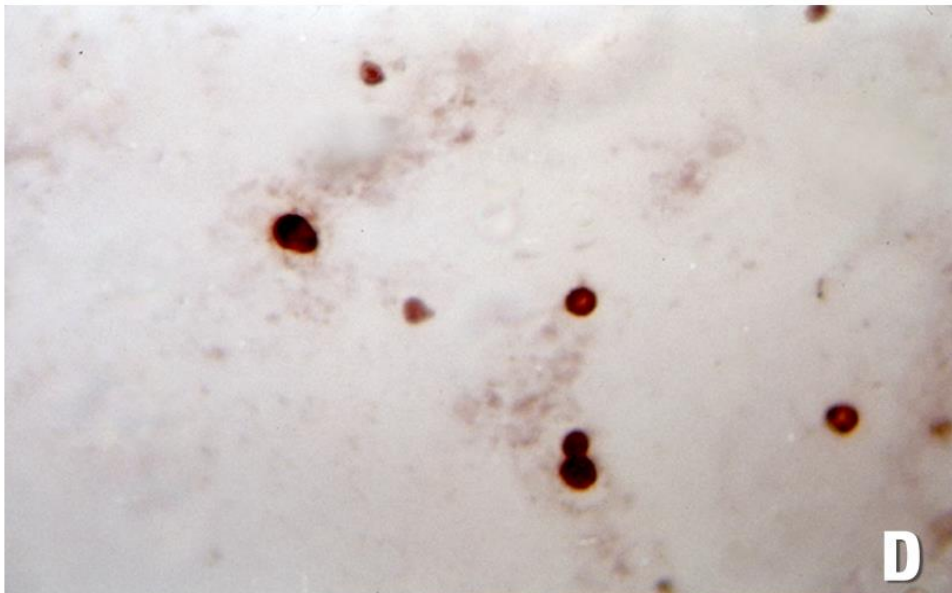
**Figura 31 B:** ICQ de células de cáncer de mama aisladas de un aspirado de MO de la misma paciente cuyo tumor primario se muestra en la Figura 31 A incubada con SM3. Se observa una intensa reacción en el citoplasma y discontinua en la membrana plasmática (100X).



**Figura 31 C:** IHQ de una sección de un cáncer de mama primario incubada con el AcMo anti-Tn. Se evidencia una reacción positiva restringida al citoplasma principalmente en una localización paranuclear (100X).



**Figura 31 D:** ICQ de células de cáncer de mama aisladas de un aspirado de MO de la paciente a la cual corresponde el tumor primario de la Figura 31 C. Se observa una reacción positiva fuerte en el citoplasma y la membrana plasmática luego de la incubación con el AcMo anti-Tn (100X).



### **Niveles de MUC1 y Ac anti-MUC1 en muestras séricas**

Se obtuvieron muestras séricas pre-tratamiento de todas las pacientes. En 2 muestras pertenecientes a pacientes con la enfermedad diseminada (estadío IV) se detectaron valores elevados de CASA (Tabla 11).

Las pacientes de estadíos menores no mostraron altos niveles de CASA.

En una paciente con cáncer de mama (estadío III) se detectaron altos niveles de MUC1-CIC-IgG e IgM, mientras que en ninguna de las pacientes se detectaron Ac libres.

### **Estudios de correlación**

Se halló una correlación estadística positiva entre la presencia de células tumorales en MO y algunos parámetros clinicopatológicos: ( $\tau=0.5341$ ) versus estadío de la enfermedad y ( $\tau=0.2118$ ) versus afectación de ganglios linfáticos.

**Tabla 11:** Niveles séricos de MUC1, MUC1-CIC (IgM e IgG) y anticuerpos anti-MUC1 libres (IgM e IgG) obtenidos por ELISA.

Tipo Histológico	Estadío	CASA	Ac- MUC 1 IgM	Ac- MUC 1 IgG	MUC1-CIC- IgM	MUC1-CIC-IgG
Papilar	I	<2U/ml 0.209	0.105	0.187	0.197	0.476
NOS ductal	I	<2U/ml 0.299	0.096	0.136	0.089	0.134
Lobulillar	I	4U/ml 0.404	0.165	0.214	0.116	0.135
NOS ductal	I	<2U/ml 0.177	0.017	0.050	0.052	0.197
NOS ductal	I	<2U/ml	ND	ND	ND	ND
NOS ductal	I	2U/ml 0.281	0.023	0.125	0.018	0.086
NOS ductal	II	3U/ml 0.381	0.012	0.053	0.053	0.081
NOS ductal	II	3U/ml 0.391	0.023	0.028	0.079	0.199
NOS ductal	II	3U/ml	0.007	0.011	0.471	0.189
Lobulillar	II	3U/ml	ND	ND	ND	ND
NOS ductal	III	<2U/ml 0.286	0.057	0.080	0.077	0.076
NOS ductal	III	<2U/ml	0.042	0.007	0.707	0.715
NOS ductal	III	<2U/ml	0.047	0.003	0.094	0.133
NOS ductal	III	4U/ml 0.315	0.080	0.063	0.274	0.202
NOS ductal	IV	45U/ml 1.539	0.071	0.092	0.451	0.371
NOS ductal	IV	35U/ml 1.237	0.023	0.058	0.047	0.136
NOS ductal	IV	3U/ml 0.323	0.003	0.005	0.248	0.172

## **Determinación de MUC1 y MUC1-CIC en mujeres sanas**

La Tabla 12 muestra los resultados de todos los grupos considerados; los niveles más elevados de MUC1 y MUC1-CIC se detectaron en mujeres embarazadas. Para aclarar los resultados se agruparon, para el análisis estadístico, las muestras de suero en embarazadas versus no embarazadas y lactancia versus no lactancia. La comparación estadística entre grupos fue realizada por ANOVA con Tukey HSD para un desigual número de casos.

En el caso de embarazadas versus no embarazadas (Tabla 13), se hallaron diferencias significativas en los niveles de MUC1,  $p < 0.02$  (Figura 32 A); en niveles de MUC1-CIC-IgM detectados con ambos AcMo,  $p < 0.02$  (Figura 32 B y C); en MUC1-CIC-IgG detectados con C595,  $p < 0.02$  (Figura 32 E); por el contrario no se hallaron diferencias significativas en MUC1-CIC-IgG detectados con SM3,  $p = 0.826$  (Figura 32 D). El valor de la media y error estándar (que se expresa entre paréntesis) del grupo de embarazadas fue: para MUC1 (U/ml), 68.8 (13.9); para MUC1-CIC (DO), medidos con C595, CIC-IgM, 0.541 (0.03) y CIC-IgG, 0.334 (0.03); para MUC1-CIC medido con SM3, CIC-IgM, 0.422 (0.03) y CIC-IgG, 0.225 (0.02). En el grupo de no embarazadas, la media y el error estándar fue: para MUC1, 1.1 (0.2); para MUC1-CIC medido con C595, CIC-IgM, 0.187 (0.02) y CIC-IgG, 0.214 (0.03); para MUC1-CIC medidos con SM3, CIC-IgM, 0.203 (0.02); y CIC-IgG, 0.230 (0.02).

**Tabla 12:** Niveles séricos de MUC1 MUC1-CIC (IgM e IgG) y de anticuerpos anti MUC1 libres medidos por ELISA. Los valores se expresan como media (Error estándar).

Grupos	n	MUC1	MUC1-CIC				Ac anti-MUC1	
			C595/ IgM	C595/ IgG	SM3/ IgM	SM3/ IgG	IgM MUC1	IgG MUC1
<b>Embarazadas (n=72)</b>								
<b>Múltiparas con lactancia</b>	36	78.4 (22.0)	0.537 (0.04)	0.410 (0.05)	0.438 (0.04)	0.267 (0.03)	0.155 (0.008)	0.073 (0.007)
<b>Primíparas sin lactancia</b>	31	65.0 (18.9)	0.524 (0.04)	0.265 (0.03)	0.386 (0.03)	0.193 (0.03)	0.140 (0.011)	0.057 (0.008)
<b>Múltiparas sin lactancia</b>	5	12.7 (7.8)	0.700 (0.24)	0.17-1 (0.04)	0.554 (0.25)	0.095 (0.01)	0.165 (0.005)	0.093 (0.005)
<b>No embarazadas (n=63)</b>								
<b>Nulíparas</b>	13	1.4 (0.4)	0.256 (0.03)	0.293 (0.07)	0.209 (0.02)	0.200 (0.03)	0.230 (0.017)	0.120 (0.016)
<b>Múltiparas con lactancia actual</b>	24	0.8 (0.2)	0.132 (0.01)	0.197 (0.02)	0.238 (0.01)	0.338 (0.02)	0.253 (0.026)	0.159 (0.015)
<b>Múltiparas con lactancia previa</b>	24	1.2 (0.4)	0.207 (0.20)	0.184 (0.07)	0.169 (0.03)	0.135 (0.03)	0.160 (0.015)	0.114 (0.016)
<b>Múltiparas sin lactancia</b>	2	3.9 (3.9)	0.180 (0.13)	0.262 (0.22)	0.148 (0.09)	0.242 (0.20)	0.123 (0.002)	0.097 (0.004)

Es interesante señalar que la lactancia no es un factor relacionado con el incremento de los parámetros considerados. Cuando se analizó el grupo lactancia versus no lactancia (Tabla 13) no se hallaron diferencias significativas: para MUC1,  $p=0.4689$ ; para niveles de MUC1-CIC-IgM detectados con SM3,  $p=0.5656$ ; para MUC1-CIC-IgG estudiados con SM3,  $p=0.2397$ ; cuando se empleó C595, para MUC1-CIC-IgM se obtuvo un valor de  $p=0.4522$  mientras que para MUC1-CIC-IgG,  $p=0.2961$ . La media y el error estándar de las mujeres con lactancia fueron: para MUC1, 34.1 (10.3), para MUC1-CIC medidos con C595, CIC-IgM, 0.328 (0.03), y CIC-IgG, 0.285 (0.03); para MUC1-CIC medida con SM3, CIC-IgM, 0.304 (0.02) y CIC-IgG, 0.250 (0.02). Las mujeres del grupo sin lactancia revelaron los siguientes resultados: para MUC1 una media de 41.9 (12.4); para MUC1-CIC medido con C595, CIC-IgM, 0.455 (0.04) y CIC-IgG, 0.265 (0.03); para MUC1-CIC medido con SM3, CIC-IgM, 0.344 (0.03) y CIC-IgG, 0.190 (0.02).

**Tabla 13:** Resultados de embarazadas vs no embarazadas. Los resultados se expresan como medias (error estándar) para MUC1, MUC1-CIC-C595IgM, C595IgG y SM3IgM  $p<0.02$ ; para MUCI-CIC SM3IgG  $p$  no significativo;  $n$ =número de muestras.

Grupos	MUC1	MUC1-CIC			
		C5951gM	C5951gG	SM31gM	SM31gG
<b>Embarazadas</b> n=72	68.8 (13.9)	0.541 (0.03)	0.334 (0.03)	0.422 (0.03)	0.225 (0.02)
<b>No Embarazadas</b> n=63	1.1 (0.2)	0.187 (0.02)	0.214 (0.03)	0.203 (0.02)	0.230 (0.02)

Se realizaron análisis de correlación entre los parámetros considerados; sólo se obtuvo correlación positiva entre CIC-IgM medidos con C595 y con SM3 ( $r^2 = 0.85$  para no embarazadas y  $r^2 = 0.80$  para embarazadas). No se halló correlación entre los niveles de MUC1 y MUC1-CIC tanto IgM como IgG medidos con ambos AcMo.

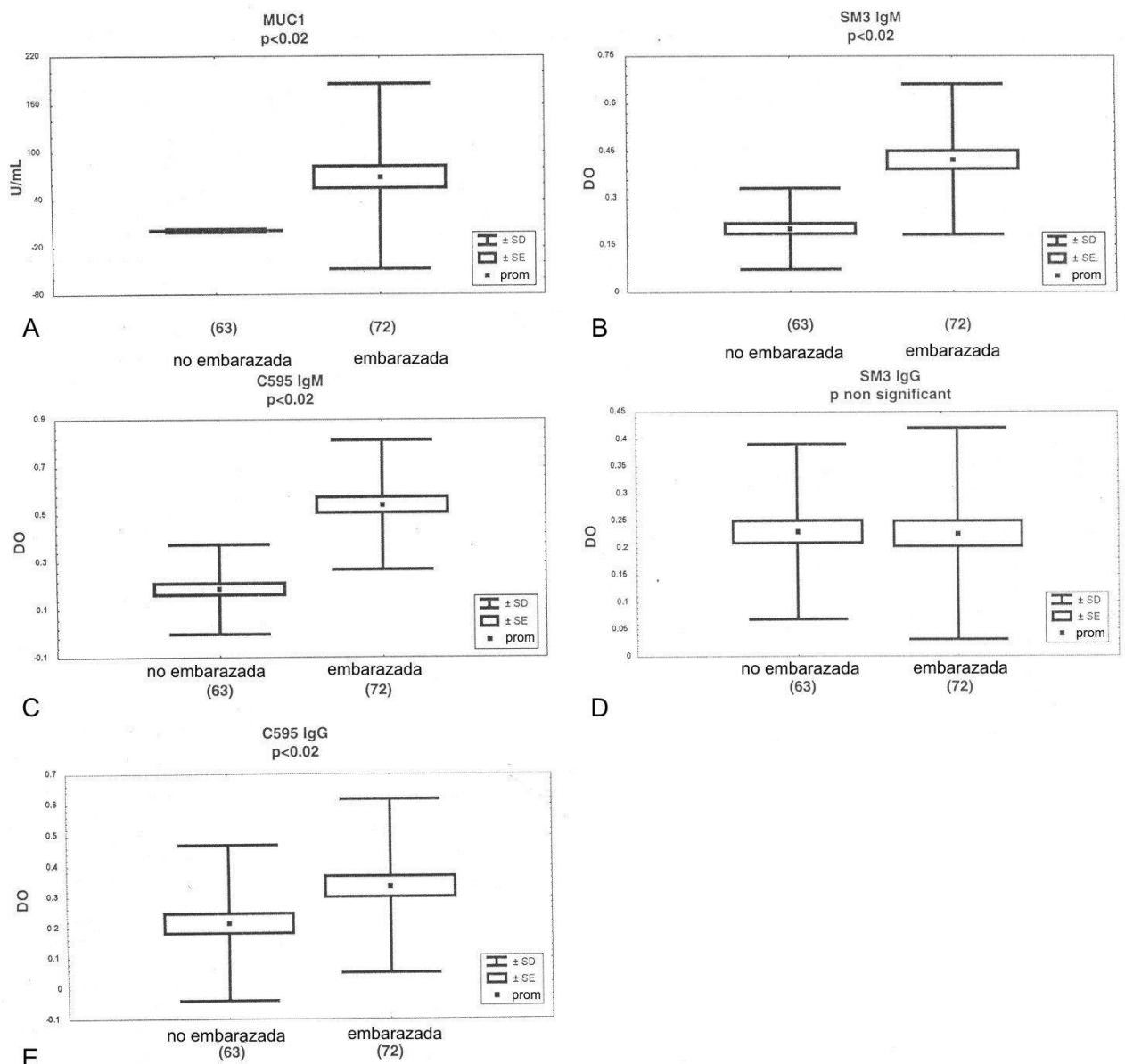
**Tabla 14:** Resultados de lactancia vs no lactancia Los resultados se expresan como medias (error estándar).

Grupos	MUC1	MUC1-CIC			
		C595IgM	C595IgG	SM3IgM	SM3IgG
<b>Lactancia</b> n=85	34.1 (10.3)	0.328 (0.03)	0.285 (0.03)	0.304 (0.02)	0.250 (0.02)
<b>No Lactancia</b> n=50	41.9 (12.4)	0.455 (0.04)	0.265 (0.03)	0.344 (0.03)	0.190 (0.02)

Los resultados se expresan como medias (error estándar); para MUC1  $p=0,670$ , para MUC1-CIC-C595IgM  $p=0,028$ , para MUC1-CIC-C595IgG  $p=0,723$ , para MUC1-CIC-SM3IgM  $p=0.375$ ; para MUCI-CIC SM3IgG  $p=0,089$ ; n=número de muestras.



**Figura 32:** Determinaciones séricas en los grupos de embarazadas y no embarazadas.  
 A-Valores de MUC1 (U/ml) en mujeres embarazadas y no embarazadas.  
 B-Valores de MUC1-CIC-IgM medidos con SM3 en mujeres embarazadas y no embarazadas.  
 C-Valores de MUC1-CIC-IgM medidos con C595 en mujeres embarazadas y no embarazadas.  
 D-Valores de MUC1-CIC-IgG medidos con SM3 en mujeres embarazadas y no embarazadas.  
 E-Valores de MUC1-CIC-IgG medidos con C595 en mujeres embarazadas y no embarazadas.  
 En todos los casos los valores se expresan como DO a 405nm; SD: Desvío Estándar; SE: Error Estándar



## **Análisis de las muestras de mujeres embarazadas**

Cuando se consideraron los trimestres de embarazo y puerperio (Tabla 15), los niveles de MUC1 fueron similares en el primer y segundo trimestres, pero se observó un importante incremento en el tercer trimestre, alcanzando los mayores niveles en el puerperio.

Las mujeres en el primer trimestre de embarazo revelaron los siguientes valores de medias y error estándar: para MUC1, 6.5 (4.1); para MUC1-CIC medido con C595, CIC-IgM, 0.609 (0.07) y CIC-IgG 0.326 (0.09); para MUC1-CIC medido con SM3, CIC-IgM, 0.474 (0.08) y CIC-IgG, 0.173 (0.03). En el segundo trimestre de embarazo, las medias y errores estándar fueron los siguientes: para MUC1, 6.3 (1.2); para MUC1-CIC medido con C595, CIC-IgM, 0.557 (0.06) y CIC-IgG, 0.321 (0.05); para MUC1-CIC medido con SM3, CIC-IgM, 0.437 (0.05) y CIC-IgG, 0.205 (0.02). En el tercer trimestre de embarazo, las medias y errores estándar fueron los siguientes: para MUC1, 119.8 (26.9); para MUC1-CIC medido con C595, CIC-IgM, 0.551 (0.05) y CIC-IgG, 0.325 (0.04); para MUC1-CIC medido con SM3, CIC-IgM, 0.415 (0.05) y CIC-IgG, 0.247 (0.04). Las mujeres puérperas, presentaron las siguientes medias y errores estándar: para MUC1, 131.6 (43.2); para MUC1-CIC medidos con C595, CIC-IgM, 0.413 (0.09) y CIC-IgG, 0.442 (0.09); para MUC1-CIC, 0.419 (0.07) y CIC-IgG, 0.283 (0.12).

Se hallaron diferencias significativas entre los niveles de MUC1 del primer y del tercer trimestre ( $p < 0.02$ ) y entre los del segundo y tercer trimestre ( $p < 0.004$ ). Cuando se compararon los valores de MUC1 del primer trimestre con los del puerperio se encontraron también resultados estadísticamente significativos ( $p < 0.02$ ), de igual manera que cuando se compararon los del segundo trimestre con los del puerperio ( $p < 0.006$ ).

Los niveles medios de MUC1-CIC-IgM, medidos con los AcMo C595 y SM3 resultaron levemente superiores al valor de corte durante los tres trimestres, aunque la variación

de estos valores no mostró una tendencia creciente. En el caso de las puérperas, las medias de MUC1-CIC-IgM medidos con C595 fue menor que el valor de corte. Los valores medios de MUC1-CIC-IgG obtenidos con SM3, aunque fueron más bajos mostraron una tendencia creciente siendo más elevados hacia el puerperio.

**Tabla 15:** Niveles séricos de MUC1 y MUC1-CIC en suero de pacientes embarazadas durante los tres trimestres del embarazo y el puerperio. MUC1 está expresada como medias (error estándar) en U/ml; los niveles de MUC1-CIC se expresan como DO a 405 nm; n=número de muestras.

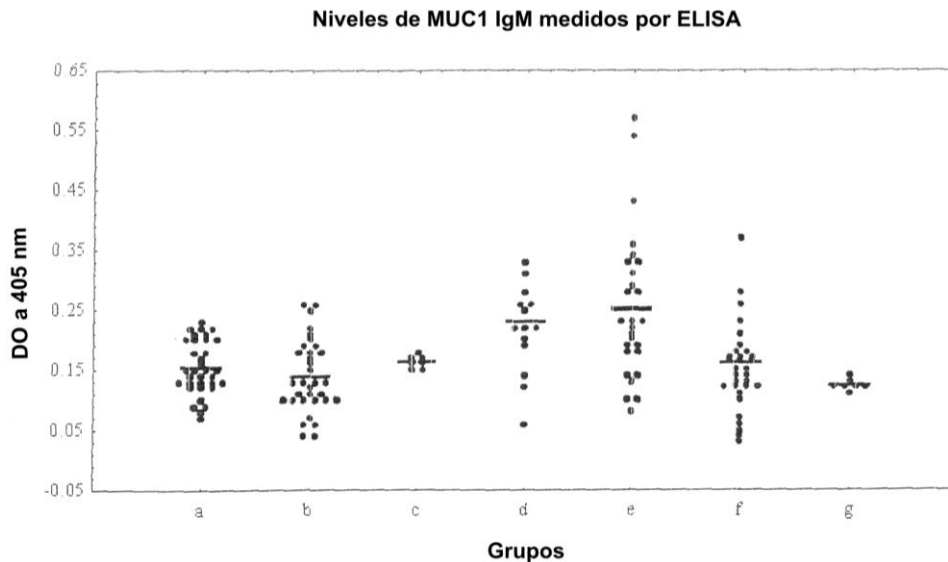
Grupos	MUC1	MUC1-CIC			
		C595/IgM	C595/IgG	SM3/IgM	SM3/IgG
1er trimestre (n=9)	6.5 (4.1)	0.609 (0.07)	0.326 (0.09)	0.474 (0.08)	0.173 (0.03)
2do trimestre (n=22)	6.3 (1.2)	0.557 (0.06)	0.321 (0.05)	0.437 (0.05)	0.205 (0.02)
3er trimestre (n=29)	119.8 (26.9)	0.551 (0.05)	0.325 (0.04)	0.415 (0.05)	0.247 (0.04)
Puerperio (n=9)	131.6 (43.2)	0.413 (0.09)	0.442 (0.09)	0.419 (0.07)	0.283 (0.12)

### **Determinación de Ac libres en mujeres sanas (Tabla 12)**

Se realizaron 20 ensayos de ELISA para la medida de Ac libres en mujeres sanas; en cada ensayo, se incluyeron muestras pacientes con cáncer de mama pre- y post-vacunación, vacunadas con un péptido sintético derivado de MUC1. Para los anticuerpos IgM dirigidos contra el péptido de 100 aminoácidos empleado en el ensayo (IgM-MUC1), la media fue  $x=0.075$  (ES=0.007) para la muestra de suero pre-vacunación, mientras que para la de post-vacunación,  $x=0.326$  (0.030). Para IgG-MUC1, la media de la muestra pre-vacunación  $x=0.098$  (ES=0.011) y la de post-vacunación,  $x=0.305$  (ES=0.027). En la determinación de MUC1 para la muestra pre-vacunación se obtuvo una media de 4 U/ml (ES=0.0001) y en la de post-vacunación,  $x=3.8$  U/ml (ES=0.0002), no obteniéndose diferencia significativa entre ambas.

La Figura 33 muestra los niveles séricos de IgM-MUC1 de todos los grupos de mujeres sanas considerados. En el grupo de embarazadas, las medias y ES ( ) de IgM fueron: en multíparas con lactancia previa (0.008); en primíparas, 0.140 (0.011); en multíparas sin lactancia previa, 0.165 (0.005). En el grupo de no embarazadas, los valores de medias y ES fueron: para MUC1-IgM en nulíparas, 0.230 (0.017); mujeres en período de lactancia,  $x=0.253$  (0.026); multíparas con lactancia previa,  $x=0.160$  (0.015) y multíparas sin lactancia,  $x=0.123$  (0.002).

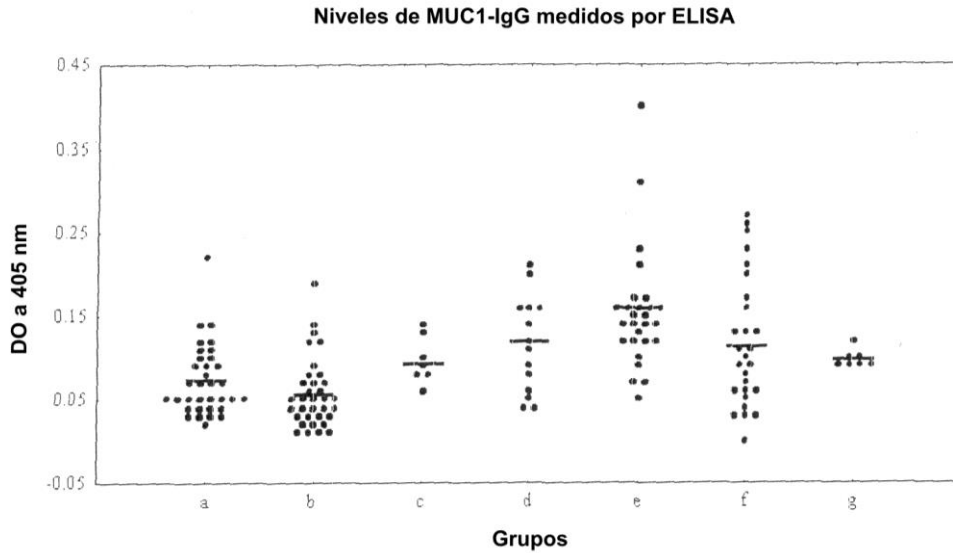
**Figura 33:** Niveles de MUC1-IgM medidos por ELISA (a: embarazadas múltiparas con lactancia previa, b: embarazadas primíparas, c: embarazadas múltiparas sin lactancia previa, d: nulíparas, e: mujeres en período de lactancia, f: múltiparas con lactancia previa, g: múltiparas sin lactancia).



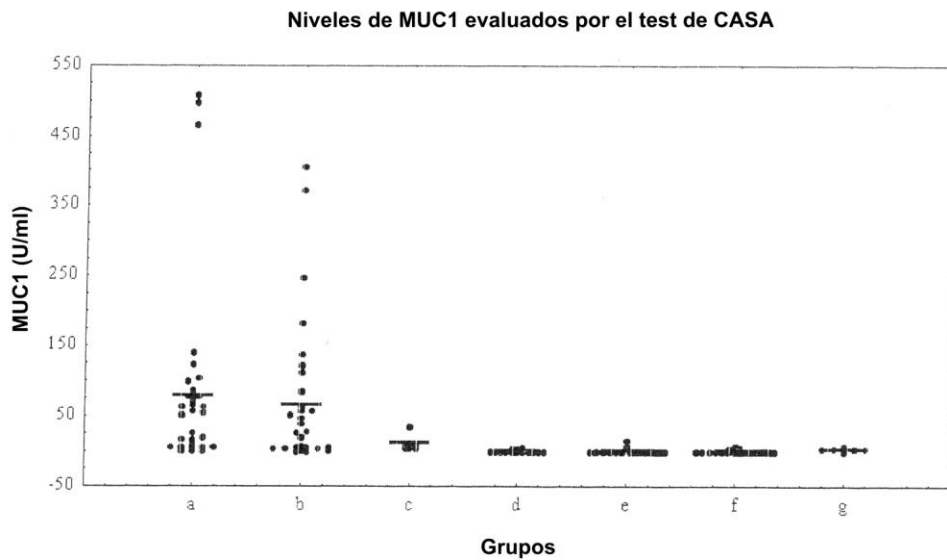
En la Figura 34 se muestran de IgG-MUC1, cuyas medias y errores estándar fueron: en el grupo de embarazadas, múltiparas con lactancia previa, 0.073 (0.007); en primíparas, 0.057 (0.008); en múltiparas sin lactancia previa, 0.093 (0.005). En el grupo de no embarazadas, los valores fueron para nulíparas, 0.120 (0.016); en período de lactancia, 0.159 (0.015); múltiparas con lactancia previa, 0.114 (0.016) y múltiparas sin lactancia previa, 0.097 (0.004).

Los niveles de MUC1 fueron elevados en embarazadas y bajos en el grupo de no embarazadas, independientemente de la lactancia. Los resultados de MUC1 se expresaron en U/ml (Figura 35) siendo la media y el ES los siguientes: en el grupo de embarazadas, múltiparas lactantes, 78.4 (22.0); primíparas, 65.0 (18.9); múltiparas sin lactancia, 12.7 (7.8). En el grupo de no embarazadas, nulíparas, 1.4 (0.4); en período de lactancia, 0.8 (0.2); múltiparas con lactancia previa, 1.2 (0.4) y múltiparas sin lactancia, 3.9 (3.9).

**Figura 34:** Niveles de MUC1-IgG medidos por ELISA (a: embarazadas múltiparas con lactancia previa, b: embarazadas primíparas, c: embarazadas múltiparas sin lactancia previa, d: nulíparas, e: mujeres en período de lactancia, f: múltiparas con lactancia previa, g: múltiparas sin lactancia).



**Figura 35:** Niveles de MUC1 medidos por CASA (a: embarazadas múltiparas con lactancia previa, b: embarazadas primíparas, c: embarazadas múltiparas sin lactancia previa, d: nulíparas, e: mujeres en período de lactancia, f: múltiparas con lactancia previa, g: múltiparas sin lactancia).



### **Análisis comparativo de MUC1 y Ac libres anti- MUC1 en mujeres sanas**

La comparación entre Ac libres y niveles de MUC1 se realizó entre el grupo de embarazadas y no embarazadas. Se puede observar en la Figura 36 A que la media de IgM-MUC1 de mujeres no embarazadas (0.210) es superior a la de embarazadas (0.150), ( $p < 0.02$ ); similar a lo encontrado en IgG-MUC1 para no embarazadas (0.130) comparado con embarazadas, (0.060), ( $p < 0.02$ ) (Figura 36 B).

Los niveles de MUC1 (U/ml) están elevados en embarazadas,  $x = 68.8$  (13.9) y muy baja en no embarazadas, media = 1.1 (0.2), ( $p < 0.02$ ) (Figura 36 C).

También se realizó el análisis comparativo entre el grupo de lactancia y no lactancia; IgM-MUC1 obtenidos en el grupo de lactancia (media = 0.190) fue similar a los del grupo de no lactancia (0.160), ( $p$  no significativo); se obtuvieron resultados diferentes con IgG-MUC1 en lactancia (media = 0.110), mientras que, en no lactancia, fue de 0.070, ( $p < 0.02$ ). Los resultados de MUC1 (U/ml) revelaron similares resultados en lactancia (media = 34.1, ES = 10.3) versus no lactancia (media = 41.9, ES = 12.4), ( $p$  no significativo).

El grupo de mujeres en período de lactancia fue el de mayores niveles de anticuerpos libres; en 6 de 27 casos, IgM-MUC1 fueron superiores al control positivo y, en un caso fue el mismo valor (0.326). Un suero mostró niveles elevados de Ac tanto IgG como IgM, mientras que otro sólo reveló altos niveles de IgG (0.404). En estos 7 casos, los valores de MUC1 estuvieron por debajo del valor de corte, así como los de MUC1-CIC, considerando datos anteriores de estas pacientes. En una muestra de 28 de no embarazadas multíparas con lactancia previa, IgM-MUC1 fue superior al valor positivo (0.372) mientras que IgG fue más bajo (0.125) al igual que niveles de MUC1 (2U/ml). Los CIC fueron mayores que el valor de corte, MUC1-CIC-IgM = 1.113 y MUC1-CIC-IgG = 0.924 (valor de corte = 0.500 para ambos). En otra muestra del mismo grupo, los niveles de Ac y de MUC1 fueron menores que el valor de corte y los de MUC1-CIC-IgM e IgG fueron superiores al valor de corte (1.066 y 0.959, respectivamente). En una

muestra de una mujer nulípara se observó un nivel de MUC1 mayor que el control positivo (3.9) junto con un alto valor de MUC1-IgM, similar al del control positivo (0.312).

Entre los trimestres de embarazo se realizó un análisis de MUC1 y de IgM/IgG-MUC1. La Figura 37 presenta resultados comparativos de MUC1 y de IgM- e IgG-MUC1 expresados en unidades de DO. Los valores de MUC1 presentan un gran incremento durante el segundo trimestre y alcanza los niveles más altos en el puerperio. Estos valores caen al final de la primera semana después del nacimiento. Tanto IgM- como IgG-MUC1 decrecieron durante el primer trimestre, alcanzando los valores más bajos en el puerperio seguido de un rápido incremento. Durante la lactancia, los valores de MUC1 fueron similares a los presentados por nulíparas, mientras que IgM- e IgG-MUC1 mostraron un leve incremento comparado con las muestras de embarazadas. Se realizó un análisis de correlación entre niveles de MUC1 y los de IgM- e IgG-MUC1 y se halló una correlación negativa en el tercer trimestre y puerperio en embarazadas multíparas.

### **Estudios de inhibición para determinar la especificidad de IgM- e IgG- MUC1**

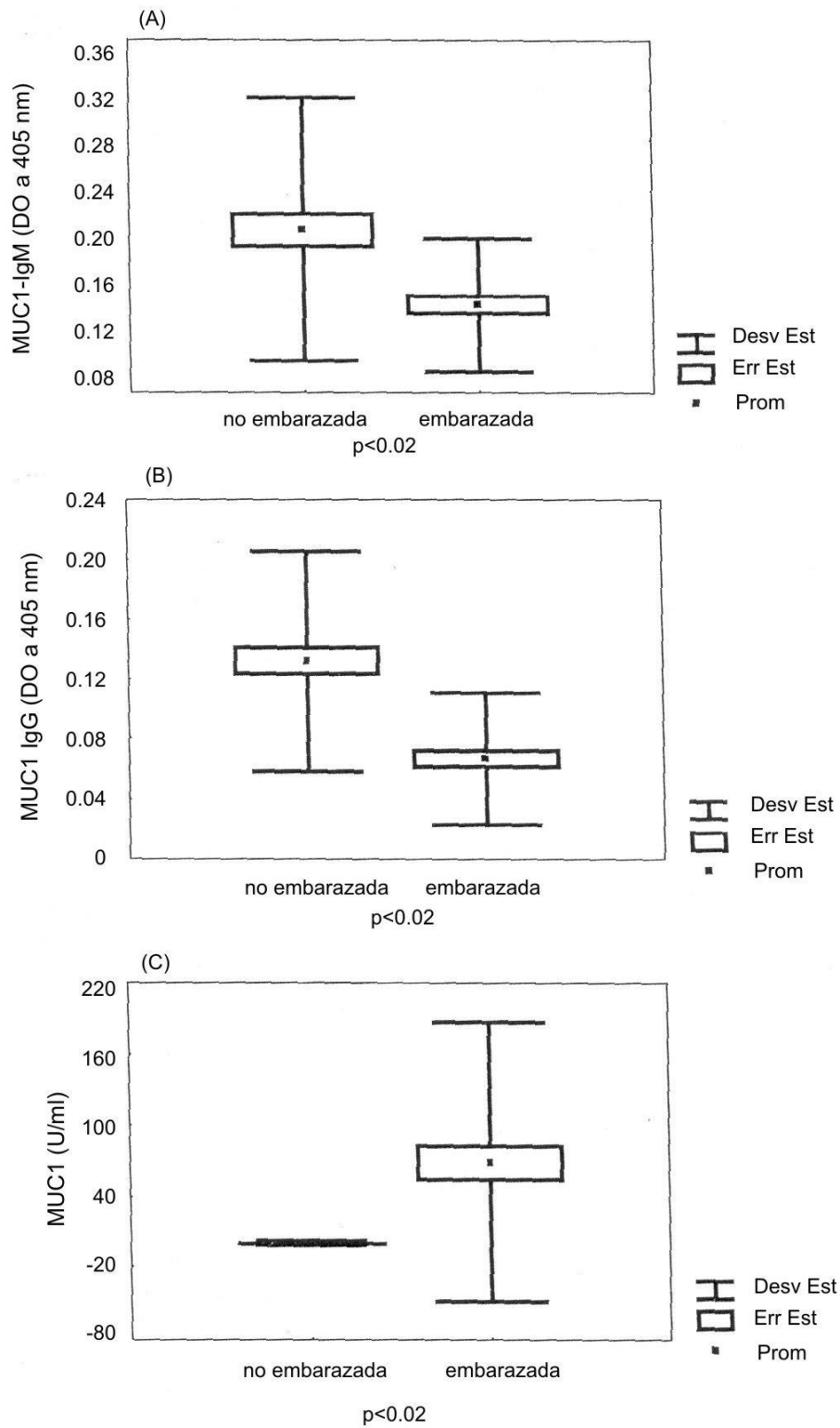
Se realizaron en un grupo de muestras séricas con elevados valores de Ac así como en pre- y post-vacunadas.

Se hicieron diluciones seriadas del péptido derivado de MUC1 de 100mer y se observó una inhibición de los niveles de Ac obtenidos por ELISA (Figuras 38 y 39).

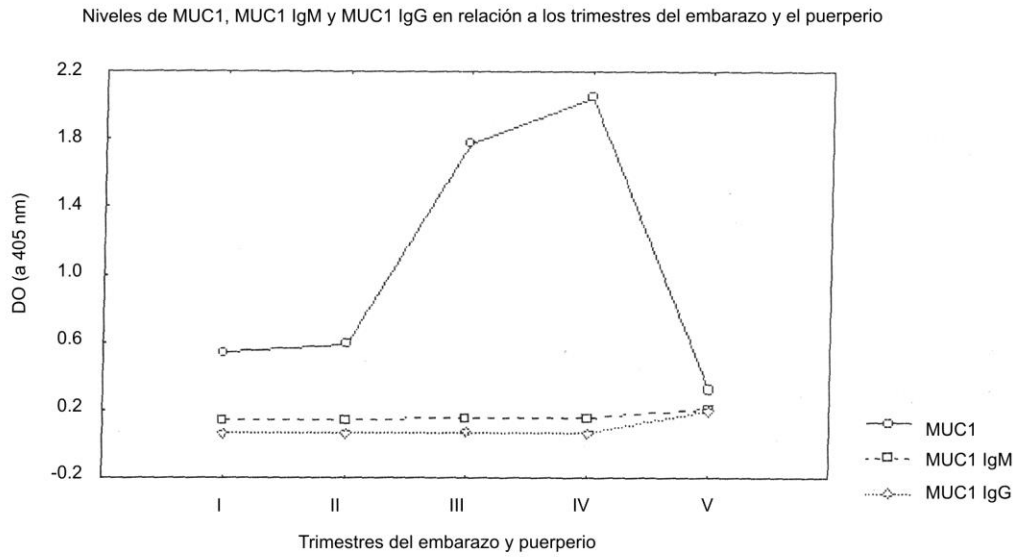


**Figura 36:** Determinaciones séricas en mujeres embarazadas y no embarazadas.

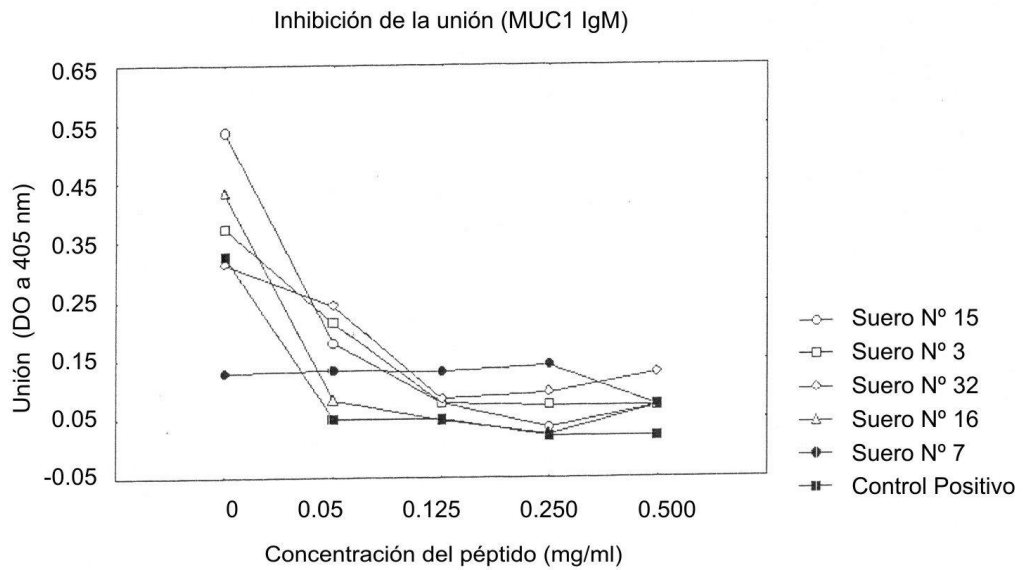
Determinación de MUC1 IgM, MUC1 IgG y MUC1 en embarazadas y no embarazadas



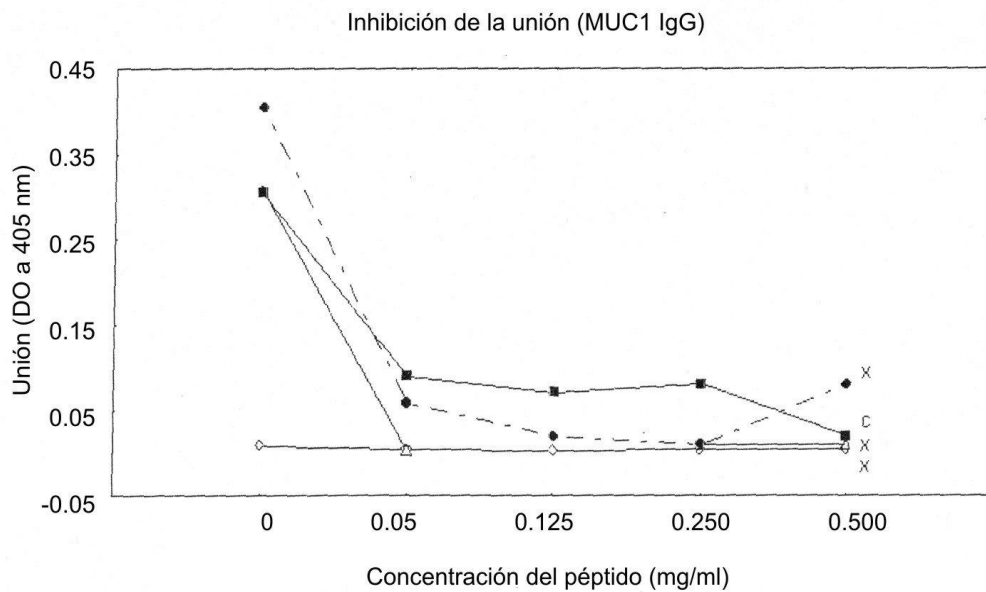
**Figura 37:** Determinaciones séricas en relación a los trimestres de embarazo y puerperio.



**Figura 38:** Ensayo de inhibición de Ac IgM.



**Figura 39:** Ensayo de inhibición de Ac IgG.



### Reactividad de Ac séricos con células

La reactividad de los sueros con antígenos de la superficie celular se llevó a cabo mediante un ELISA de células en suspensión utilizando Ac anti- IgM e IgG marcados con peroxidasa. Un grupo de 6 sueros de mujeres que presentaban altos niveles de IgM e IgG anti-MUC1 reaccionaron con células de la línea celular A549 que se conoce que expresa altos niveles de MUC1 en la membrana. Para IgG la media de los 6 sueros positivos fue 0.319 (ES=0.010) y para IgM, 0.221 (ES=0.031). Los resultados se expresaron en unidades de DO medida a 405 nm. Por el contrario, los tres sueros con bajos valores de IgM e IgG anti MUC1 presentaron una media para IgG de 0.059 (ES=0.010) y para IgM, 0.039 (0.011).

## DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad de alta incidencia en el sexo femenino y presenta una elevada tasa de mortalidad (21%) en nuestro país. El estudio de la expresión de antígenos asociados a tumor se ha incrementado en estos últimos años con el fin de hallar nuevos marcadores tumorales y de evaluar la respuesta inmune generada por dichos antígenos. Su investigación está relacionada tanto con la profundización del conocimiento de la biología tumoral como con la posibilidad de establecer una eficiente inmunoterapia que pueda prevenir o limitar el desarrollo de ciertas localizaciones tumorales.

Las mucinas son antígenos propios de las células normales, localizadas en la parte apical de las células epiteliales. En los tumores de estirpe epitelial, se producen cambios en la síntesis de estas glicoproteínas ya que no sólo están sobreexpresadas, sino que existen alteraciones en su estructura molecular. De acuerdo con esto se ha podido observar que las cadenas de carbohidratos son más cortas y por lo tanto se encuentra más expuesto el centro peptídico (Taylor-Papadimitriou et al, 1991). Asimismo, la localización difiere en las células malignas respecto a las normales ya que se detectan en toda la membrana y citoplasma celular, sin restringirse al polo apical como ocurre normalmente en las células normales epiteliales (Finn et al, 1995; Croce et al, 1995). Estas observaciones también se han hallado en estudios in vitro; en investigaciones realizadas sobre líneas celulares de cáncer de mama se ha demostrado una expresión anómala de MUC1 (Zotter et al, 1988; Hull et al, 1989).

En este trabajo de tesis, se estudió la expresión tisular de MUC1 por IHQ en muestras procedentes de pacientes con cáncer de mama y de controles con patología benigna y normales. Con este fin se utilizaron tres AcMo: C595, HMFG2 y SM3, los que están dirigidos hacia diferentes epitopes ubicados en la secuencia de 20 aminoácidos (TR) del centro proteico de MUC1 y presentan diferente reactividad. C595 reacciona con la

secuencia RPAP, que está muy expuesta por la estructura secundaria que adopta la molécula (Price et al,1990); HMFG2 reconoce DTR (Burchell et al, 1989) mientras que SM3 reacciona con el pentapéptido PDTRP y con el glicopentapéptido PDT(O- $\alpha$ -D-GalNAc)RP, que son epitopes reconocidos cuando la mucina está hipoglicosilada (Burchell et al, 1989; Moller et al, 2002). Karsten et al (1998) demostraron que a nivel molecular la unión de un pequeño oligosacárido a la Thr 3 mejora la afinidad de unión de SM3. Taylor-Papadimitriou et al (1999) señalaron que diversos autores encontraron diferentes porcentajes de positividad según el AcMo Anti-centro proteico de MUC1 empleado.

Los resultados positivos obtenidos en esta Tesis al analizar por IHQ 160 muestras de cáncer de mama con C595 y HMFG2 (58% y 61%, respectivamente) fueron superiores al obtenido con SM3 (43%). En los casos de carcinoma ductal, al emplear C595 y HMFG2, el patrón de reacción fue mayormente mixto, mientras que, con SM3, fue principalmente lineal. En las muestras procedentes de pacientes con carcinoma lobulillar, con C595, el patrón de expresión también fue mayormente mixto; con HMFG2 y SM3, el patrón observado fue principalmente lineal.

Es posible que esta reactividad diferencial obtenida con distintos AcMo se deba a la detección de diferentes glicofomas de MUC1 (Taylor-Papadimitriou et al, 1999, Croce et al ) así como a la reactividad propia de cada AcMo , o ambos. Brockhausen et al (1995) afirma que el patrón de glicosilación en el carcinoma de mama es característico y los resultados mostraron estructuras basadas en el core 1, como los antígenos sialilT y sialil Tn. Se halló una correlación estadísticamente significativa entre SM3 y HMFG2 y entre HMFG2 y C595. Se encontró una correlación negativa estadísticamente significativa entre HMFG2 y el estadio tumoral.

En muestras normales y benignas, se evidenció un patrón apical con los tres AcMo Anti-MUC1 empleados. Las muestras benignas presentaron un patrón de expresión

apical, lineal y continuo con C595 o con HMFG2, pero presentaron un bajo porcentaje de reacción con SM3. Las muestras normales también reaccionaron mayormente con al menos uno de los AcMo empleados mostrando un patrón apical, lineal y continuo. La reactividad de HMFG2 con muestras normales y benignas pareció indicar que la longitud del carbohidrato sustituido en Thr no altera la capacidad de reacción. La reactividad con C595 y HMFG2 tanto de muestras tumorales como de las muestras normales y benignas pareció indicar que no existe mayormente diferencias entre ellas, sin embargo, debe mencionarse especialmente el distinto patrón de expresión presente en las muestras malignas dado que la polarización de esta glicoproteína se ha perdido completamente.

Los resultados obtenidos en la determinación de MUC1 pueden variar, probablemente porque los diferentes AcMo utilizados en cada método detectan diferentes glicofomas de esta glicoproteína. CASA es un método de ELISA "sandwich" que incluye los AcMo BC2 y BC3, ambos dirigidos contra el epítipo APDTR del centro proteico de MUC1. En cambio, otro método de detección de MUC1 como el CA 15-3 es una técnica de IRMA diseñada con los AcMo 115D8, que reconoce un epítipo carbohidrato (Burchell et al, 1989) y DF3 dirigido a DTRPAP del centro proteico de la glicoproteína.

En las pacientes con cáncer de mama, MUC1 medido por el método de CASA se observó elevado en el 25% de los casos, en la mayor parte de los cuales, presentaron valores elevados. El mayor porcentaje de valores elevados se obtuvo en pacientes con estadio IV (57%). Los niveles de MUC1 sérica no concordaron con la elevada expresión de MUC1 tisular en cáncer de mama. Devine et al (1994) hallaron elevados niveles de MUC1 en pacientes con carcinoma de ovario mediante este mismo método.

Los Ac libres de isotipo IgG se elevaron en el 22% de las muestras provenientes de pacientes con cáncer de mama y los IgM en el 9 % de los casos, siendo los valores ligeramente superiores al valor de corte. Las pacientes de estadio IV son las que

presentaron el mayor porcentaje de positivos. Kotera et al (1994) hallaron Ac libres de tipo IgM en menos del 10% de las muestras de cáncer de mama que estudiaron.

Para la determinación de los niveles de MUC1-CIC en los casos de cáncer de mama estudiado, se emplearon métodos de ELISA con C595 y SM3 y con ambos AcMo se encontraron porcentajes elevados de valores por encima del valor de corte tanto para IgM como para IgG. Gourevitch et al en 1995 estudiaron 151 pacientes con cáncer de mama previo tratamiento primario y 61 con cáncer de mama progresivo o recurrente de gran tamaño y encontraron MUC1-CIC en el 20% de los casos, principalmente de isotipo IgG, lo que sugiere especificidad hacia los epitopes de MUC1.

Al analizar los resultados obtenidos a partir de las muestras de pacientes en estadio IV no se halló un patrón único de detección de MUC1 tisular en combinación con las determinaciones séricas de MUC1, MUC1-CIC y de Ac libres.

En determinaciones en muestras de pacientes con cáncer de mama pre y post-vacunación provenientes del estudio llevado a cabo en el Memorial Sloan-Kettering Hospital de Nueva York se obtuvieron valores más elevados de Ac libres en las muestras de post-vacunación. A diferencia de esto, no se hallaron cambios en los valores de MUC1 y MUC1-CIC obtenidos.

Como se ha mencionado previamente, MUC1 es una proteína integral de transmembrana asociada al fenotipo metastásico, está sobreexpresada en muchas células de carcinoma humano. Se postula que MUC1-CT funciona en transducción de señales por interacción con moléculas tales como Grb-2/SOS, c-src y  $\beta$ -catenina (Wen et al, 2003). Aunque la presencia de sitios de fosforilación en su dominio citoplasmático sugiere su potencial rol como receptor, el desconocimiento de un ligando para esta mucina ha limitado el entendimiento de su función (Meerzaman et al, 2000).

Para estudiar la presencia de la cola citoplasmática de MUC1 (CT) en muestras de pacientes con cáncer de mama se utilizó IHQ con el empleo del AcMo CT2 (Schroeder et al, 2001). Este AcMo se desarrolló en hamster armenio y está dirigido contra los últimos 17 aminoácidos de CT de MUC1 (SSLSYNTPAVAATSANL).

Se comprobó que, de las 98 muestras de cáncer de mama estudiadas, el 93% reaccionaron positivamente con CT2. En la mayoría de los casos, la reacción fue intensa. En las muestras procedentes de carcinoma ductal NOS se halló considerable heterogeneidad de reacción a nivel de la localización celular. El 44,2% de las muestras presentaron reacción positiva a nivel de membrana plasmática. Las muestras de carcinoma de tipo lobulillar mostraron en un 64 % reacción positiva en un patrón mixto y los DCIS papilares presentaron reacción positiva principalmente a nivel de membrana plasmática, mientras que, en MC, el patrón predominante fue citoplasmático.

Las muestras estudiadas fueron negativas en el 22% de los casos frente al AcMo C595, dirigido contra RPAP del centro proteico de MUC1. Se halló una correlación estadísticamente significativa entre los AcMo CT2 y C595, lo que demuestra la utilidad de la detección tisular de MUC1 por medio de la detección de su CT, ya que es independiente de la glicosilación, lo que no ocurre al emplear un AcMo Anti-VNTR. Todos los controles, tanto benignos como normales mostraron reacción positiva con un patrón de expresión principalmente apical, lo que concuerda con la expresión normal de MUC1 en los epitelios.

Cuando se realizó el análisis de las fracciones subcelulares, por SDS-PAGE y Western Blot, mediante el empleo de CT2, se obtuvo una banda de reacción muy intensa compatible con CT en la fracción de membranas, si bien se evidenció esta banda en las fracciones citoplasmáticas y nucleares, aunque con menor intensidad. Por medio de C595 se hallaron dobles bandas entre 180-200kD, compatibles con la presencia de MUC1, en las muestras procedentes de pacientes con cáncer de mama y en las



muestras controles. También se hallaron bandas adicionales con C595 tanto en muestras malignas como controles.

La detección de células tumorales aisladas en la médula ósea de pacientes con neoplasias de estirpe epitelial es un factor pronóstico independiente para varias entidades tales como cáncer de mama, cáncer colorrectal o cáncer de pulmón que no sean de células pequeñas (Weihrauch et al, 2002).

A 17 pacientes con cáncer de mama, además de extraérseles muestras del tumor primario se les realizó punción de médula ósea para aislar células tumorales. El 53% de las muestras de tumores fueron positivas cuando se les realizó IHQ con tres AcMo dirigidos contra el centro proteico de MUC1 (C595, HMFG2 y SM3). Se obtuvo un patrón de expresión lineal, citoplasmático o mixto, no apical.

En los procesos de metástasis de tumores situados en diferentes localizaciones se han involucrado a los antígenos carbohidratos. Consecuentemente se estudió la expresión por IHQ de los antígenos Tn, Lewis x, s Lewis x y Lewis y. En el 29,5% de las muestras se evidenció reacción positiva para el hapteno Tn, mostrando una reacción leve y restringida a algunas áreas celulares. El 59% de las muestras reaccionaron con Anti-Lewis x, observándose principalmente una reacción citoplasmática, mientras que el 12% lo hizo con Anti-sLewis x con un patrón mixto. El 6% mostró reacción positiva con Anti-Lewis y, con una reacción moderada en membrana y citoplasma.

En punciones de médula ósea de 7 pacientes se logró aislar células tumorales de estirpe epitelial comprobada por la reactividad con Anti-EpCAM y con Anti-citoqueratinas. 2 de las muestras pertenecieron al estadio I, 1 al estadio II, 1 al estadio III y 3 al estadio IV. A todas estas muestras se les realizó ICQ para caracterizar su expresión Antigénica.

Todas las células aisladas expresaron MUC1 y en la mayoría, Tn, Lewis x y sLewisx. Esporadicamente se halló reacción frente a Lewis y.

El control positivo para este ensayo fue realizado con células de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 diluídas en la muestra de médula ósea de una paciente con anemia megaloblástica. Por medio de ICQ se determinó que las células de la línea celular MCF-7 aisladas por el método inmunomagnético reaccionaron con los AcMo Anti-MUC1, mientras que con KM 380 y Anti-Tn mostraron una baja reactividad.

Braun et al (1999) utilizaron técnicas de ICQ con doble tinción para la detección de citoqueratinas y EpCAM en células tumorales aisladas de médula ósea. Sobre la base de los datos obtenidos, concluyen que la expresión de antígenos por las células micrometastásicas podría ser un mejor predictor de respuesta a terapias basadas en Anticuerpos que la expresión antigénica del tumor primario relacionado.

Zhong et al (2000) por medio de un método de separación inmunomagnética con Ac Anti-MUC1 y Anti-citoqueratina 19, y posteriormente RT-PCR obtuvieron una sensibilidad diez veces mayor que con RT-PCR de rutina. En 18 de 26 muestras de médula ósea provenientes de pacientes con cáncer de mama se detectaron transcritos de CK19 por este método. 14 y 13 muestras de las 26 fueron positivas por RT-PCR o por ICQ de rutina, respectivamente (Jiang et al, 2002). En un estudio similar, Weihrauch et al (2002) utilizaron un método de clasificación de células por activación magnética (MACS) y encontraron que el 83% de 12 muestras provenientes de pacientes con carcinoma metastásico y el 75% de 8 muestras procedentes de pacientes sin metástasis presentaron reacción positiva con AcMo Anti-citoqueratinas 7 y 8 en células aisladas de médula ósea, lo que denota su estirpe epitelial.

A diferencia de los estudios citados, también se realizó la detección sérica de MUC1, de MUC1-CIC y de Ac libres Anti-MUC1 en las muestras de sangre obtenidas de las mismas pacientes al momento de la punción de médula ósea y previo a la cirugía del

tumor. El nivel sérico de MUC1, detectado por CASA, fue elevado en 2 muestras provenientes de pacientes en estadio IV. Los niveles de MUC1-CIC-IgM e IgG fueron elevados en una sola muestra de una paciente con estadio III. Se evidenciaron niveles bajos de Ac libres en todas las muestras. Estos resultados muestran que no pudo establecerse un patrón común de determinaciones séricas que se correlacione con el aislamiento de células tumorales en médula ósea. En cambio, se pudo establecer correlación significativa entre la presencia de células tumorales en médula ósea con el estadio de la enfermedad, por un lado y, con la afectación de ganglios linfáticos, por otro.

En la presente Tesis se planteó la hipótesis de que la glicofoma de MUC1 asociada al embarazo y/o la lactancia, al estar hipoglicosilada (Mc Guckin et al, 1994), podría generar una respuesta inmune humoral que protegería contra el cáncer de mama. Para su investigación, se realizaron determinaciones del antígeno circulante en sueros y la evaluación de la respuesta inmune humoral por medio de determinaciones de Ac libres circulantes y de CIC. Se utilizaron sueros de mujeres normales, las cuales se clasificaron teniendo en consideración al embarazo y la lactancia como variables de estudio. Al agrupar los datos, con fines estadísticos según pertenecieran a muestras de mujeres embarazadas o no embarazadas, se halló, en concordancia con Mc Guckin et al (1994), que la concentración sérica media de MUC1 estaba significativamente elevada en el grupo de embarazadas respecto al de las no embarazadas. Además, se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos en las determinaciones de MUC1-CIC-IgM detectados por ELISA con los AcMo C595 y SM3 así como en MUC1-CIC-IgG detectado con C595. Se utilizaron cuatro ensayos para MUC1-CIC con dos AcMo muy estudiados contra MUC1: C595 desarrollado con células de urotelio normal (Price et al, 1990) mientras que SM3 tiene una particular especificidad contra cáncer de

mama (Burchell et al,1987). Ambos reconocen epitopes de la región VNTR (Petraou et al, 1998), pero muestran una diferente reactividad, dado que MUC1-CIC-IgM reaccionaron con ambos AcMo mientras que C595 fue también útil para detectar MUC1-CIC-IgG. Las diferencias significativas existentes entre las determinaciones del grupo de embarazadas y el de no embarazadas estarían indicando una respuesta inmune humoral generada hacia el antígeno MUC1 durante el embarazo. Cuando se agruparon los datos según las muestras pertenecieran a mujeres con lactancia (previa o actual) versus el grupo de mujeres que no habían experimentado lactancia, no hubo diferencias significativas en cuanto a los niveles de MUC1. Estos resultados sugieren que la elevación de los niveles séricos de MUC1 estaría asociada al estado de embarazo y no al de lactancia. Al considerar la concentración de MUC1 sérica durante los trimestres del embarazo, se observó un incremento significativo entre el segundo y el tercer trimestre, y mayores en puerperio, lo que coincide con los resultados hallados por Mc Guckin et al (1994) y Richards et al (1998). Según los primeros, la MUC1 hallada en el líquido amniótico podría provenir de la orina fetal, de un clearance alterado de mucinas o bien, tratarse de un producto de secreción de la mama. Se le ha asignado a la MUC1 un rol en la implantación uterina interviniendo en los pasos iniciales de la adhesión del embrión a la superficie apical del epitelio uterino (De Loia et al, 1998). También se ha sugerido una regulación de MUC1 inducida por la progesterona (Hey et al,1994). En la superficie luminal uterina se halló que se expresan diferentes glicoformas de MUC1 que presentan cadenas de oligosacáridos tales como sLe x y sLe a (Hey et al, 1996). Aplin et al (1998) observaron variaciones en la expresión de carbohidratos en respuesta a la progesterona.

Existen diferentes ensayos para medir MUC1, entre ellos se hallan: CA 15-3, CASA, MCA, CA549, BCM, CA 27-29. A pesar de que los AcMo empleados estén dirigidos hacia el centro proteico de MUC1, se han encontrado diferencias en las

determinaciones debido a la distinta reactividad de cada AcMo utilizado y al diferente diseño de cada ensayo (Robertson et al, 1990; Petrakou et al, 1998). En pacientes con cáncer de mama y de ovario, se ha empleado la determinación de MUC1 como marcador tumoral (Devine et al, 1993; Devine et al, 1994).

En un estudio, Von Mensdorff-Pouilly et al (2000) utilizaron sueros de mujeres embarazadas, de nulíparas y de múltiparas y determinaron la concentración de MUC1 con el método CA 15-3. A diferencia de lo que se obtuvo en la presente Tesis, todas las muestras de mujeres embarazadas dieron niveles de MUC1 por debajo del valor de corte, mientras que el 9 % de las nulíparas y el 13 % de las mujeres sanas dieron valores positivos.

Devine et al (1994) hallaron diferencias entre los valores de MUC1 obtenidos por CASA (ELISA) y por CA 15-3 (IRMA) en el suero de mujeres embarazadas. La media, por el método de CASA, fue de 33.6 veces el valor de corte; mientras que con CA 15-3, sólo fue de 0.88 veces el valor de corte. No se evidenció correlación entre los dos métodos empleados en los sueros de mujeres embarazadas ( $r=0.29$ ,  $p=0.4099$ ). Estos hallazgos pueden deberse a la diferente especificidad de los AcMo utilizados en cada ensayo.

En 1995, Gourevitch et al, en un estudio realizado en pacientes con carcinoma de mama y de ovario demostraron la presencia de MUC1-CIC en el 20 % de los casos, fundamentalmente de tipo Ig G. Al realizar la determinación de MUC1 por el método CA 15-3, no detectaron el antígeno involucrado en el complejo inmune, pero al aislar MUC1 de CIC hallaron elevados los niveles de CA 15-3. Para la determinación de CIC emplearon un método de ELISA similar al que se utilizó en esta Tesis, aunque el buffer de bloqueo y el sistema de revelado fueron diferentes. Von Mensdorff-Pouilly et al (1997) afirmaron que un tercio de las pacientes con carcinoma de mama y de ovario presentan Ac contra MUC1, libres o bajo la forma de inmunocomplejos y sugirieron que la presencia de CIC implicaría una evolución favorable en cáncer de mama si están

presentes al momento del diagnóstico. Estos autores postularon la existencia de una correlación inversa entre la presencia de MUC1-CIC y la extensión de la enfermedad. Los CIC asociados al embarazo podrían corresponder a una respuesta inmune desencadenada hacia MUC1 que resultaría protectora para el eventual desarrollo de cáncer de mama, que sería capaz de reconocer células tumorales circulantes que expresen MUC1, permitiendo, de este modo, el rechazo del tumor o al menos provocarían una regresión del mismo. Podría ser posible que una glicofoma específica pueda prevalecer en una mezcla de diferentes glicofomas en condiciones fisiológicas particulares como el embarazo o en condiciones patológicas como el desarrollo de tumores y su diseminación.

Otras evidencias avalan que la multiparidad otorga protección contra el cáncer de mama. Forsman et al (1984) hallaron Anticuerpos que median una citotoxicidad dependiente de Anticuerpos contra el cáncer de mama. Existen evidencias epidemiológicas que indican que la multiparidad protege contra el desarrollo de cáncer de mama, como muestra el trabajo de Kalache et al (1993), en el cual se observa una menor tendencia de multíparas respecto de primíparas y nulíparas a desarrollar la enfermedad. La hipótesis del antígeno fetal sugiere que existe una respuesta inmune desencadenada hacia antígenos fetales que otorgaría protección a la madre ante la aparición de un tumor que exprese los mismos antígenos fetales a los que estuvo expuesta durante el período del embarazo. Se ha sugerido que la MUC1 podría ser un antígeno fetal que brindaría protección a través de una inmunización natural (Agrawal et al, 1996; Botelho et al, 1998).

Agrawal et al (1995,1998) describieron la existencia de células T CD4+ provenientes de mujeres bíparas, que proliferaron in vitro en respuesta a secuencias derivadas del centro proteico de MUC1 y señalaron también que la multiparidad otorga protección hacia el cáncer de mama. Este grupo estudió sueros de mujeres multíparas y hallaron

la presencia de Ac que median citotoxicidad, no encontrándose ni en mujeres nulíparas ni en hombres. Estos autores describieron también que MUC1 soluble inhibe la proliferación de células T e induce un estado de anergia reversible por IL-2. Además, encontraron que las células T activadas expresan MUC1, lo que involucraría a MUC1 en la regulación inmune normal.

La respuesta inmune desarrollada hacia MUC1 durante el embarazo podría ser tolerogénica. Es posible que la protección provista por la parición estuviera influenciada por el desafío Antigénico del tumor. En estas mujeres, el desarrollo de un carcinoma podría revertir el estado de tolerancia como una consecuencia de un switch de Anticuerpos y/o una adecuada activación de células T (Agrawal et al, 1996). La presencia de MUC1-CIC-IgM en mujeres embarazadas es consistente con su potencial rol de vigilancia inmunológica y podría proveer una explicación para la tolerancia inmunológica de MUC1.

En esta Tesis se estudió la respuesta inmune humoral por medio de la detección de CIC por un método de ELISA, como se mencionó previamente, y a través de un ELISA dirigido a detectar Ac libres Anti MUC1, para lo cual, se empleó una técnica ampliamente modificada a partir del método descrito por Von Mensdorff-Pouilly et al, 1998; las placas fueron incubadas con BSA y posteriormente se le agregó un péptido sintético de 100 mer derivado del centro proteico de MUC1 junto con un derivado sustituido de la carbodiimida que sirve de ligando entre el péptido y la BSA, una conjugación *in situ* similar a la descrita previamente por Price et al (1993) para la determinación de MUC2. La elección del péptido de 100 mer para este ensayo se basó en el hecho de que este péptido largo que representa 5 repeticiones en tandem del centro proteico de MUC1 adopta una conformación en  $\beta$ -hélice que permite la exposición de distintos epitopes (Adluri et al, 1999). Los valores de corte utilizados para

este ensayo fueron calculados en base a los valores obtenidos para mujeres normales como la media +DE, siendo de 0.227 para IgG y 0.340 para IgM.

En concordancia con los resultados obtenidos por Von Mensdorff-Pouilly et al, se observó que este método fue útil para la detección de MUC1 IgM e IgG. El ensayo utilizado por este grupo difería en que el péptido empleado fue de 60 mer y la conjugación del mismo a BSA no se realizó *in situ*. Estudios similares realizados en pacientes con cáncer de mama, colon, páncreas, ovario y mujeres normales permitieron detectar sólo Ac de isotipo IgM (Kotera et al, 1994; Richards et al, 1998; Petrarca et al, 1999). Los ensayos utilizados por ambos grupos estaban basados en la adsorción directa del péptido en el fondo de la placa. Kotera et al (1994) utilizaron en sus ensayos péptidos de 60, 80 y 105 mer. Al emplear péptidos de menor longitud o mucina pura, no detectaron Ac. La presencia de Ac libres Anti MUC1 en mujeres normales podría indicar la existencia de una respuesta inmune humoral natural hacia esta glicoproteína.

Se hallaron diferencias significativas entre los valores medios de Ac de tipo IgM en muestras de mujeres embarazadas y no embarazadas, obteniéndose los valores mayores en estas últimas, aunque no superaron el valor correspondiente al del control positivo. Los valores de IgM fueron superiores, en promedio, a los de IgG.

Al considerar la lactancia como variable de estudio, no se observaron diferencias significativas entre los valores medios de IgM para las muestras provenientes de los grupos de mujeres con lactancia y sin lactancia. Sí se observó diferencia significativa para IgG, siendo mayor la media para el grupo de mujeres que experimentaron lactancia (previa o al momento de la extracción de la muestra).

Durante la lactancia, MUC1 se sobreexpresa en la mama (Taylor- Papadimitriou et al, 1981), pero no se halla aumentada en circulación. Los niveles de Anticuerpos en el grupo de muestras de mujeres en período de lactancia al momento de la obtención de



la muestra fueron los más elevados y se observó que en 6 de 27 casos superaron el valor del control positivo para los Ac de tipo IgM. Sería de esperar que este grupo de mujeres presentara una menor incidencia de cáncer de mama respecto de las que poseen niveles de Ac Anti-MUC1 más bajos.

Durante los trimestres de embarazo, IgM e IgG mostraron una tendencia decreciente, alcanzando los valores más bajos en el puerperio, seguido de un rápido incremento. Si bien el aumento de MUC1 entre los trimestres de embarazo y con el puerperio, mostraba diferencias significativas, no fue así con los niveles de Ac libres, tanto IgM como IgG. Se halló una correlación negativa entre MUC1 e IgM y MUC1 e IgG durante el tercer trimestre y en el puerperio.

Por ensayos de inhibición se determinó la especificidad de los Ac hacia el péptido de 100 mer derivado de MUC1. Se incubaron las muestras de las pacientes vacunadas en el Memorial Sloan Kettering Cáncer Center y las de las mujeres normales con el péptido de 100 mer y se evidenció una inhibición de los Ac al realizar el ensayo de ELISA. Se necesitó una mayor concentración del péptido para inhibir los Ac naturales de las muestras de mujeres normales.

Se realizó otro ensayo con muestras que presentaban elevados niveles de Ac IgM e IgG con el método de ELISA previamente descrito y se enfrentaron a células de la línea celular de cáncer de pulmón A549, utilizando un ELISA con células en suspensión. Esta línea celular expresa elevados niveles de MUC1. Los epitopes reconocidos por los Ac son aún inciertos, aunque se comprobó la reactividad del AcMo HMFG1 con las células. Hubo correlación de los valores de Ig obtenidos por ambos métodos.

Miles et al en 1999 y Gileswski et al en 2000 han utilizado a la MUC1, la mejor caracterizada de las mucinas de superficie celular tumorales (Burchell, 1987), como base para diferentes protocolos de vacunación. Se han empleado diferentes péptidos y

glicopéptidos derivados de esta glicoproteína con distintos adyuvantes con el fin de lograr una inmunoterapia Antitumoral efectiva (Von Mensdorff-Pouilly et al, 2000).

Los niveles de Ac específicos luego de la vacunación son elevados, pero ejercen un efecto limitado contra el tumor primario, aunque podrían ser efectivos en la erradicación de células tumorales simples o de émbolos de células tumorales circulantes (Zhang et al, 1998).

Las muestras de mujeres no embarazadas presentaron los niveles más elevados de Ac Anti-MUC1 en relación a los otros grupos de mujeres, pero los valores séricos obtenidos fueron menores que el nivel de Ac de las muestras post-vacunación.

Las diferencias entre la respuesta inmune natural y la inducida a través de la vacunación está asociada a factores tales como la relación de epitopes, el método de conjugación a adyuvantes y la naturaleza Antigénica de las moléculas, que influyen en la inmunogenicidad (Ragupathi et al, 1999).

Es interesante remarcar que los Anticuerpos naturales Anti- MUC1 pueden reconocer moléculas glicosiladas, como así también la región peptídica de la MUC1.

Al considerar el embarazo como variable, se obtuvieron Ac de isotipos IgM e IgG; en el caso de la variable lactancia, sólo se observó la presencia de Ac de isotipo IgG en el grupo de mujeres que experimentaron lactancia. Es posible que estos últimos Ac estén involucrados en una respuesta Anti-carbohidratos.

Es de esperar que los avances logrados en el campo de las investigaciones sobre MUC1 y la respuesta inmune inducida por esta glicoproteína signifiquen un aporte para el desarrollo de una eficiente inmunoterapia que resulte efectiva para la prevención y el tratamiento del cáncer de mama.

## CONCLUSIONES

- MUC1 está altamente expresada en el cáncer de mama. Esta glicoproteína fue detectada tanto en especímenes de tejido como en muestras de suero; los estudios inmunohistoquímicos realizados sobre tumores malignos mamarios determinaron que más del 70% de las muestras expresaron MUC1 detectadas por los diferentes anticuerpos monoclonales reactivos con el centro proteico de la fracción extramembranosa de MUC1. El patrón, la intensidad y la extensión de la reacción positiva no varía de acuerdo al subtipo histopatológico de cáncer de mama ni al estadio de la enfermedad. Estos estudios contribuirían a la detección de diferentes glicoformas de MUC1. Por otra parte, no se halló correlación entre los niveles de expresión tisular y los niveles séricos.
- Mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal contra la cola intracitoplasmática de MUC1, las muestras de tumores malignos fueron positivas en un porcentaje mayor al 90%. Por este motivo, podemos concluir que la detección de la cola intracitoplásmica de MUC1 (MUC1-CT) podría constituir un mejor indicador de la producción de esta mucina porque no depende de la glicosilación ni es liberada al medio extracelular. El patrón, la intensidad y la extensión de la reacción positiva tampoco varían de acuerdo al subtipo histopatológico de cáncer de mama ni al estadio de la enfermedad.
- Se midieron los niveles séricos de MUC1 en pacientes con cáncer de mama hallándose niveles más elevados en los estadios más avanzados de la enfermedad.
- En mujeres sin enfermedad, se encontraron valores elevados de MUC1 en embarazadas respecto del grupo de no embarazadas, mientras que no se

hallaron diferencias entre las mujeres con lactancia respecto del grupo sin lactancia. Se detectó un gran aumento en MUC1 desde el segundo trimestre alcanzando el valor máximo durante la primera semana del puerperio.

- En las mismas muestras de mujeres sanas se estudió la respuesta inmune humoral mediante la medición de anticuerpos anti-MUC1 libres y acomplejados. Se detectó un aumento moderado de los niveles de MUC1-CIC con el progreso del embarazo. Asimismo, se demostraron elevados niveles de anticuerpos libres anti-MUC1 de tipo IgM e IgG en mujeres no embarazadas versus embarazadas y de IgG en mujeres con lactancia respecto de las que carecían de ella; estos anticuerpos reaccionaron con el centro proteico de la mucina y podrían reducir el riesgo de padecer cáncer de mama. No se hallaron diferencias en los niveles de IgM e IgG anti-MUC1 libres entre los trimestres del embarazo. Por otra parte, se halló un aumento de los niveles de MUC1-CIC durante el embarazo. Se concluye que los niveles séricos de MUC1 y MUC1-CIC son aparentemente inducidos por el embarazo y no parecen estar asociados con la lactancia.
- MUC1 puede circular unida a IgG o IgM formando complejos inmunes circulantes (CIC); en consecuencia, una determinación completa de la mucina debería incluir las formas libre y acomplejada de los anticuerpos anti-MUC1.
- La expresión de antígenos carbohidratos es superior en células neoplásicas aisladas de la médula ósea (MO) comparado con el tumor original. Es probable que el patrón de expresión observado en células metastásicas pueda favorecer el "homing" y la supervivencia de las células en MO. Sin embargo, se halló una correlación negativa entre la presencia de células malignas en la MO versus la respuesta inmune humoral hacia MUC1 estudiada. Los epitopes carbohidratos estudiados son, usualmente, crípticos en tejidos sanos y aumentan en tejidos

tumorales como resultado de la glicosilación aberrante. La alta incidencia de invasión y metástasis de los carcinomas hace necesario proseguir con el estudio de los epitopes carbohidratos, ya que podrían ser blanco de inmunoterapia.

## BIBLIOGRAFÍA

Adluri S, Gilewski T, Zhang S, Ramnath V, Ragupathi G, Livingston P. Specificity analysis of sera from breast cancer patients vaccinated with MUC1-KLH plus QS-21. *Br J Cancer*. 1999 Apr;79(11-12):1806-12

Agrawal B, Krantz MJ, Parker J, Longenecker BM. Expression of MUC1 mucin on activated human T cells: implications for a role of MUC1 in normal immune regulation. *Cancer Res*. 1998 Sep 15;58(18):4079-81.

Agrawal B, Krantz MJ, Reddish MA, Longenecker BM. Rapid induction of primary human CD4+ and CD8+ T cell responses against cancer-associated MUC1 peptide epitopes. *Int Immunol*. 1998 Dec;10(12):1907-16.

Agrawal B, Reddish MA, Krantz MJ, Longenecker BM. Does pregnancy immunize against breast cancer? *Cancer Res*. 1995 Jun 1;55(11):2257-61.

Agrawal B, Reddish MA, Longenecker BM. In vitro induction of MUC-1 peptide-specific type 1 T lymphocyte and cytotoxic T lymphocyte responses from healthy multiparous donors. *J Immunol*. 1996 Sep 1;157(5):2089-95.

Aplin JD, Hey NA, Graham RA. Human endometrial MUC1 carries keratan sulfate: characteristic glycoforms in the luminal epithelium at receptivity. *Glycobiology*. 1998 Mar;8(3):269-76

Apostolopoulos V, Karanikas V, Haurum JS, McKenzie IF. Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen. *J Immunol*. 1997 Dec 1;159(11):5211-8.

Baldus SE, Engelmann K, Hanisch FG. MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2004;41(2):189-231. Review.

Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(18):7159-63.

Baruch A, Hartmann M, Yoeli M, Adereth Y, Greenstein S, Stadler Y, Skornik Y, Zaretsky J, Smorodinsky NI, Keydar I, Wreschner DH. The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein. *Cancer Res.* 1999 Apr 1;59(7):1552-61.

Baruch A, Hartmann M, Zrihan-Licht S, Greenstein S, Burstein M, Keydar I, Weiss M, Smorodinsky N, Wreschner DH. Preferential expression of novel MUC1 tumor antigen isoforms in human epithelial tumors and their tumor-potentiating function. *Int J Cancer.* 1997 May 29;71(5):741-9.

Blockzijl A, Nilsson K, Nilsson O. Epitope characterization of MUC1 antibodies. *Tumour Biol.* 1998;19 Suppl 1:46-56.

Bon GG, von Mensdorff-Pouilly S, Kenemans P, van Kamp GJ, Verstraeten RA, Hilgers J, Meijer S, Vermorken JB. Clinical and technical evaluation of ACS BR serum assay of MUC1 gene-derived glycoprotein in breast cancer, and comparison with CA 15-3 assays. *Clin Chem.* 1997 Apr;43(4):585-93.

Botelho F, Clark DA. How might pregnancy immunize against breast cancer? *Am J Reprod Immunol.* 1998 Apr;39(4):279-83. Review.

Breast Cancer Society of Canada. Historia del cancer de mama. La información suministrada por esta Sociedad sirvió de base para la narración de los aspectos históricos del cáncer de mama.

Brockhausen I, Romero PA, Herscovics A. Glycosyltransferase changes upon differentiation of CaCo-2 human colonic adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 1991 Jun 15;51(12):3136-42.

Brockhausen I, Yang JM, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem.* 1995 Oct 15;233(2):607-17.

Brooks SA, Leathem AJ. Expression of alpha-GalNAc glycoproteins by breast cancers. *Br J Cancer.* 1995 May;71(5):1033-8.

Brown A, Ellis IO, Embleton MJ, Baldwin RW, Turner DR, Hardcastle JD. Immunohistochemical localization of Y hapten and the structurally related H type-2

blood-group antigen on large-bowel tumours and normal adult tissues. *Int J Cancer*. 1984 Jun 15;33(6):727-36.

Brugger W, Buhring HJ, Grunebach F, Vogel W, Kaul S, Muller R, Brummendorf TH, Ziegler BL, Rappold I, Brossart P, Scheduling S, Kanz L. Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells. *J Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1535-44.

Burchell J, Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Girling A, Lewis A, Millis R, Lamport D. Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. *Cancer Res*. 1987 Oct 15;47(20):5476-82.

Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Boshell M, Gendler S, Duhig T. A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *Int J Cancer*. 1989 Oct 15;44(4):691-6.

Burchell J, Taylor-Papadimitriou J. Effect of modification of carbohydrate side chains on the reactivity of antibodies with core-protein epitopes of the MUC1 gene product. *Epithelial Cell Biol*. 1993 Oct;2(4):155-62.

Burchell J, Wang D, Taylor-Papadimitriou J. Detection of the tumour-associated antigens recognized by the monoclonal antibodies HMFG-1 and 2 in serum from patients with breast cancer. *Int J Cancer*. 1984 Dec 15;34(6):763-8.

Cannon PM, Ellis IO, Blamey RW, Bell J, Elston CW, Robertson JF. Expression of tumour-associated antigens in breast cancer primary tissue compared with serum levels. *Eur J Surg Oncol*. 1993 Dec;19(6):523-7.

Chittal SM, Delsol G. The interface of Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Surv*. 1997;30:87-105. Review.

Clausen H, Bennett EP. A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology*. 1996 Sep;6(6):635-46.

Croce MV, Colussi AG, Price MR, Segal-Eiras A. Expression of tumour associated antigens in normal, benign and malignant human mammary epithelial tissue: a



comparative immunohistochemical study. *Anticancer Res.* 1997 Nov-Dec;17(6D):4287-92.

Croce MV, Price MR, Segal-Eiras A. Expression of monoclonal-antibody-defined antigens in fractions isolated from human breast carcinomas and patients' serum. *Cancer Immunol Immunother.* 1995 Feb;40(2):132-7.

Croce MV, Isla-Larrain MT, Price MR, Segal-Eiras A. Detection of circulating mammary mucin (Muc1) and MUC1 immune complexes (Muc1-CIC) in healthy women. *Int J Biol Markers.* 2001 Apr-Jun;16(2):112-20.

Croce MV, Isla-Larrain MT, Rua CE, Rabassa ME, Gendler SJ, Segal-Eiras A. Patterns of MUC1 tissue expression defined by an anti-MUC1 cytoplasmic tail monoclonal antibody in breast cancer. *J Histochem Cytochem.* 2003 Jun;51(6):781-8.

Croce MV, Isla-Larrain M, Remes-Lenicov F, Colussi AG, Lacunza E, Kim KC, Gendler SJ, Segal-Eiras A. MUC1 cytoplasmic tail detection using CT33 polyclonal and CT2 monoclonal antibodies in breast and colorectal tissue. *Histol & Histopathol*, en prensa, 2006.

DeLoia JA, Krasnow JS, Brekosky J, Babaknia A, Julian J, Carson DD. Regional specialization of the cell membrane-associated, polymorphic mucin (MUC1) in human uterine epithelia. *Hum Reprod.* 1998 Oct;13(10):2902-9.

Denda-Nagai K, Irimura T. MUC1 in carcinoma-host interactions. *Glycoconj J.* 2000 Jul-Sep;17(7-9):649-58. Review.

Dent GA, Civalier CJ, Brecher ME, Bentley SA. MUC1 expression in hematopoietic tissues. *Am J Clin Pathol.* 1999 Jun;111(6):741-7.

Devine PL, McGuckin MA, Ramm LE, Ward BG, Pee D, Long S. Serum mucin antigens CASA and MSA in tumors of the breast, ovary, lung, pancreas, bladder, colon, and prostate. A blind trial with 420 patients. *Cancer.* 1993 Sep 15;72(6):2007-15.

Devine PL, Yarker JY, Fong KM, Mc Guckin MA, Scells B, Ward BG, Thynne GS, Zimmerman PV. Serum markers CASA, CEA, CYFRA 21-1, MSA, NSE, TPA and Tps in lung cancer. *Int J Oncol.* 1994; 4; 1129-1134.

Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Nov 20;88(22):1652-8.

Dokurno P, Bates PA, Band HA, Stewart LM, Lally JM, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J, Snary D, Sternberg MJ, Freemont PS. Crystal structure at 1.95 Å resolution of the breast tumour-specific antibody SM3 complexed with its peptide epitope reveals novel hypervariable loop recognition. *J Mol Biol.* 1998 Dec 4;284(3):713-28.

Domenech N, Henderson RA, Finn OJ. Identification of an HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin. *J Immunol.* 1995 Nov 15;155(10):4766-74.

Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, Barratt-Boyes SM. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol Rev.* 1995 Jun;145:61-89. Review.

Forsman LM, Jouppila PI, Andersson LC. Sera from multiparous women contain antibodies mediating cytotoxicity against breast carcinoma cells. *Scand J Immunol.* 1984 Feb;19(2):135-9.

Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani EN, Wilson D. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem.* 1990 Sep 5;265(25):15286-93.

Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:607-34. Review.

Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2001 Jul;6(3):339-53. Review.

Gilewski T, Adluri S, Ragupathi G, Zhang S, Yao TJ, Panageas K, Moynahan M, Houghton A, Norton L, Livingston PO. Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clin Cancer Res.* 2000 May;6(5):1693-701.

Gourevitch MM, von Mensdorff-Pouilly S, Litvinov SV, Kenemans P, van Kamp GJ, Verstraeten AA, Hilgers J. Polymorphic epithelial mucin (MUC-1)-containing circulating immune complexes in carcinoma patients. *Br J Cancer*. 1995 Oct;72(4):934-8.

Grinstead JS, Koganty RR, Krantz MJ, Longenecker BM, Campbell AP. Effect of glycosylation on MUC1 humoral immune recognition: NMR studies of MUC1 glycopeptide-antibody interactions. *Biochemistry*. 2002 Aug 6;41(31):9946-61.

Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*. 2002 Nov 14;347(20):1593-603.

Hanai N, Shitara K, Yoshida H. Generation of monoclonal antibodies against human lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma using mice rendered tolerant to normal human lung. *Cancer Res*. 1986 Sep;46(9):4438-43.

Hanisch FG, Müller S, Hassan H, Clausen H, Zachara N, Gooley AA, Paulsen H, Alving K, Peter-Katalinic J. Dynamic epigenetic regulation of initial O-glycosylation by UDP-N-Acetylgalactosamine:Peptide N-acetylgalactosaminyltransferases. site-specific glycosylation of MUC1 repeat peptide influences the substrate qualities at adjacent or distant Ser/Thr positions. *J Biol Chem*. 1999 Apr 9;274(15):9946-54.

Hanisch FG, Muller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*. 2000 May;10(5):439-49. Review.

Hanisch FG, Peter-Katalinic J, Egge H, Dabrowski U, Uhlenbruck G. Structures of acidic O-linked polylactosaminoglycans on human skim milk mucins. *Glycoconj J*. 1990;7(6):525-43.

Hanisch FG, Stadie TR, Deutzmann F, Peter-Katalinic J. MUC1 glycoforms in breast cancer--cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. *Eur J Biochem*. 1996 Feb 15;236(1):318-27.

Hanisch FG, Uhlenbruck G, Peter-Katalinic J, Egge H, Dabrowski J, Dabrowski U. Structures of neutral O-linked polylactosaminoglycans on human skim milk mucins. A novel type of linearly extended poly-N-acetyllactosamine backbones with Gal beta(1-4)GlcNAc beta(1-6) repeating units. *J Biol Chem*. 1989 Jan 15;264(2):872-83.

Hayes DF, Sekine H, Ohno T, Abe M, Keefe K, Kufe DW. Use of a murine monoclonal antibody for detection of circulating plasma DF3 antigen levels in breast cancer patients. *J Clin Invest.* 1985 May;75(5):1671-8.

Hellstrom I, Garrigues HJ, Garrigues U, Hellstrom KE. Highly tumor-reactive, internalizing, mouse monoclonal antibodies to Le(y)-related cell surface antigens. *Cancer Res.* 1990 Apr 1;50(7):2183-90.

Hey NA, Aplin JD. Sialyl-Lewis x and Sialyl-Lewis a are associated with MUC1 in human endometrium. *Glycoconj J.* 1996 Oct;13(5):769-79.

Hey NA, Graham RA, Seif MW, Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Feb;78(2):337-42

Hilkens J, Buijs F. Biosynthesis of MAM-6, an epithelial sialomucin. Evidence for involvement of a rare proteolytic cleavage step in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1988 Mar 25;263(9):4215-22.

Hilkens J, Vos HL, Wesseling J, Boer M, Storm J, van der Valk S, Calafat J, Patriarca C. Is episialin/MUC1 involved in breast cancer progression? *Cancer Lett.* 1995 Mar 23;90(1):27-33. Review.

Hiltbold EM, Alter MD, Ciborowski P, Finn OJ. Presentation of MUC1 tumor antigen by class I MHC and CTL function correlate with the glycosylation state of the protein taken up by dendritic cells. *Cell Immunol.* 1999 Jun 15;194(2):143-9.

Hiltbold EM, Vlad AM, Ciborowski P, Watkins SC, Finn OJ. The mechanism of unresponsiveness to circulating tumor antigen MUC1 is a block in intracellular sorting and processing by dendritic cells. *J Immunol.* 2000 Oct 1;165(7):3730-41.

Janni W, Rjosk D, Braun S. Clinical relevance of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with different stages of breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2000 Oct;1(3):217-25. Review.

Jerome KR, Barnd DL, Bendt KM, Boyer CM, Taylor-Papadimitriou J, McKenzie IF, Bast RC Jr, Finn OJ. Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast

adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res.* 1991 Jun 1;51(11):2908-16.

Julian J, Carson DD. Formation of MUC1 metabolic complex is conserved in tumor-derived and normal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 May 17;293(4):1183-90.

Kalache A, Maguire A, Thompson SG. Age at last full-term pregnancy and risk of breast cancer. *Lancet.* 1993 Jan 2;341(8836):33-6

Kam JL, Regimbald LH, Hilgers JH, Hoffman P, Krantz MJ, Longenecker BM, Hugh JC. MUC1 synthetic peptide inhibition of intercellular adhesion molecule-1 and MUC1 binding requires six tandem repeats. *Cancer Res.* 1998 Dec 1;58(23):5577-81.

Kamoshida S, Tsutsumi Y. Expression of MUC-1 glycoprotein in plasma cells, follicular dendritic cells, myofibroblasts and perineurial cells: immunohistochemical analysis using three monoclonal antibodies. *Pathol Int.* 1998 Oct;48(10):776-85.

Karsten U, Diotel C, Klich G, Paulsen H, Goletz S, Muller S, Hanisch FG. Enhanced binding of antibodies to the DTR motif of MUC1 tandem repeat peptide is mediated by site-specific glycosylation. *Cancer Res.* 1998 Jun 15;58(12):2541-9.

Kenemans P, Bast RC, Yemeda CA, Price MR, Hilgers J. Mucins and mucin-like antigens as tumor markers. En: Hilgers J, Zotter S. Eds. *Cancer Reviews*. Copenhagen, Munksgaard, 1989, pp 19-44.

Kerin MJ, McAnena OJ, O'Malley VP, Grimes H, Given HF. CA15-3: its relationship to clinical stage and progression to metastatic disease in breast cancer. *Br J Surg.* 1989 Aug;76(8):838-9.

Kotera Y, Fontenot JD, Pecher G, Metzgar RS, Finn OJ. Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res.* 1994 Jun 1;54(11):2856-60.

Kudryashov V, Glunz PW, Williams LJ, Hintermann S, Danishefsky SJ, Lloyd KO. Toward optimized carbohydrate-based anticancer vaccines: epitope clustering, carrier structure, and adjuvant all influence antibody responses to Lewis(y) conjugates in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 13;98(6):3264-9

Kumamoto K, Mitsuoka C, Izawa M, Kimura N, Otsubo N, Ishida H, Kiso M, Yamada T, Hirohashi S, Kannagi R. Specific detection of sialyl Lewis X determinant carried on the mucin GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$  core structure as a tumor-associated antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jun 18;247(2):514-7.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-684, 1970.

Lamblin G, Boersma A, Lhermitte M, Roussel P, Mutsaers JH, van Halbeek H, Vliegthart JF. Further characterization, by a combined high-performance liquid chromatography/ $^1\text{H}$ -NMR approach, of the heterogeneity displayed by the neutral carbohydrate chains of human bronchial mucins. *Eur J Biochem*. 1984 Aug 15;143(1):227-36.

Lan MS, Batra SK, Qi WN, Metzgar RS, Hollingsworth MA. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J Biol Chem*. 1990 Sep 5;265(25):15294-9.

Lancaster CA, Peat N, Duhig T, Wilson D, Taylor-Papadimitriou J, Gendler SJ. Structure and expression of the human polymorphic epithelial mucin gene: an expressed VNTR unit. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990

Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H. Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial. *J Clin Pathol*. 1990 Mar;43(3):213-9.

Li Y, Bharti A, Chen D, Gong J, Kufe D. Interaction of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin. *Mol Cell Biol*. 1998 Dec;18(12):7216-24.

Ligtenberg MJ, Buijs F, Vos HL, Hilkens J. Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin. *Cancer Res*. 1992 Apr 15;52(8):2318-24.

Ligtenberg MJ, Vos HL, Gennissen AM, Hilkens J. Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J Biol Chem*. 1990 Apr 5;265(10):5573-8.

Lillehoj EP, Han F, Kim KC. Mutagenesis of a Gly-Ser cleavage site in MUC1 inhibits ectodomain shedding. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Aug 1;307(3):743-9

Linsley PS, Brown JP, Magnani JL, Horn D. Monoclonal antibodies reactive with mucin glycoproteins found in sera from breast cancer patients. *Cancer Res.* 1998 Apr 15;48(8):2138-48.

Litvinov SV, Hilkens J. The epithelial sialomucin, episialin, is sialylated during recycling. *J Biol Chem.* 1993 Oct 5;268(28):21364-71.

Lloyd KO, Burchell J, Kudryashov V, Yin BW, Taylor-Papadimitriou J. Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *J Biol Chem.* 1996 Dec 27;271(52):33325-34.

Luna-More S, Rius F, Weil B, Jimenez A, Bautista MD, Perez-Mellado A. EMA: a differentiation antigen related to node metastatic capacity of breast carcinomas. *Pathol Res Pract.* 2001;197(6):419-25.

Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet.* 1999 Jul 17;354(9174):197-202.

Matsuura N, Narita T, Mitsuoka C, Kimura N, Kannagi R, Imai T, Funahashi H, Takagi H. Increased level of circulating adhesion molecules in the sera of breast cancer patients with distant metastases. *Jpn J Clin Oncol.* 1997 Jun;27(3):135-9.

Meerzaman D, Xing PX, Kim KC. Construction and characterization of a chimeric receptor containing the cytoplasmic domain of MUC1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Mar;278(3):L625-9.

McGuckin MA, Devine PL, Ramm LE, Ward BG. Factors effecting the measurement of tumor-associated MUC1 mucins in serum. *Tumour Biol.* 1994;15(1):33-44.

McGuckin MA, Thornton DJ. Detection and quantitation of mucins using chemical, lectin, and antibody methods. *Methods Mol Biol.* 2000;125:45-55. Review.

McGuckin MA, Walsh MD, Hohn BG, Ward BG, Wright RG. Prognostic significance of MUC1 epithelial mucin expression in breast cancer. *Hum Pathol.* 1995 Apr;26(4):432-9.

Miles DW, Taylor-Papadimitriou J. Therapeutic aspects of polymorphic epithelial mucin in adenocarcinoma. *Pharmacol Ther.* 1999 Apr;82(1):97-106. Review.

Moller H, Serttas N, Paulsen H, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J; Bernd Meyer. NMR-based determination of the binding epitope and conformational analysis of MUC-1 glycopeptides and peptides bound to the breast cancer-selective monoclonal antibody SM3. *Eur J Biochem.* 2002 Mar;269(5):1444-55

Muller S, Alving K, Peter-Katalinic J, Zachara N, Gooley AA, Hanisch FG. High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T47D breast cancer cells. *J Biol Chem.* 1999 Jun 25;274(26):18165-72.

Muller S, Hanisch FG. Recombinant MUC1 probe authentically reflects cell-specific O-glycosylation profiles of endogenous breast cancer mucin. High density and prevalent core 2-based glycosylation. *J Biol Chem.* 2002 Jul 19;277(29):26103-12. Epub 2002 May 8

Mutsaers JH, van Halbeek H, Vliegenthart JF, Wu AM, Kabat EA. Typing of core and backbone domains of mucin-type oligosaccharides from human ovarian-cyst glycoproteins by 500-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Eur J Biochem.* 1986 May 15;157(1):139-46.

Nath D, Hartnell A, Happerfield L, Miles DW, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Crocker PR. Macrophage-tumour cell interactions: identification of MUC1 on breast cancer cells as a potential counter-receptor for the macrophage-restricted receptor, sialoadhesin. *Immunology.* 1999 Oct;98(2):213-9.

Obermair A, Schmid BC, Packer LM, Leodolter S, Birner P, Ward BG, Crandon AJ, McGuckin MA, Zeillinger R. Expression of MUC1 splice variants in benign and malignant ovarian tumours. *Int J Cancer.* 2002 Jul 10;100(2):166-71.

Oosterkamp HM, Scheiner L, Stefanova MC, Lloyd KO, Finstad CL. Comparison of MUC-1 mucin expression in epithelial and non-epithelial cancer cell lines and demonstration of a new short variant form (MUC-1/Z). *Int J Cancer.* 1997 Jul 3;72(1):87-94.

Pandey P, Kharbanda S, Kufe D. Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein. *Cancer Res.* 1995 Sep 15;55(18):4000-3.

Parmley RR, Gendler SJ. Cystic fibrosis mice lacking Muc1 have reduced amounts of intestinal mucus. *J Clin Invest.* 1998 Nov 15;102(10):1798-806.



- Pastan I, Lovelace ET, Gallo MG, Rutherford AV, Magnani JL, Willingham MC. Characterization of monoclonal antibodies B1 and B3 that react with mucinous adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1991 Jul 15;51(14):3781-7.
- Pemberton L, Taylor-Papadimitriou J, Gendler SJ. Antibodies to the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin show conservation throughout mammals. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 May 29;185(1):167-75.
- Pemberton LF, Rughetti A, Taylor-Papadimitriou J, Gendler SJ. The epithelial mucin MUC1 contains at least two discrete signals specifying membrane localization in cells. *J Biol Chem.* 1996 Jan 26;271(4):2332-40.
- Pérez-Vilar J, Hill RL. The structure and assembly of secreted mucins. *J Biol Chem.* 1999 Nov 5;274(45):31751-4.
- Petrakou E, Murray A, Price MR. Epitope mapping of anti-MUC1 mucin protein core monoclonal antibodies. *Tumour Biol.* 1998;19 Suppl 1:21-9.
- Petrakou E, Murray A, Rosamund C, Graves L, Price MR. Evaluation of Pepscan analyses for epitope mapping of anti-MUC1 monoclonal antibodies--a comparative study and review of five antibodies. *Anticancer Res.* 1998 Nov-Dec;18(6A):4419-21.
- Petrarca C, Rughetti A, Rahimi H, D'Agostini F, Turchi V, Apollonj Ghetti C, Scambia G, Frati L, Nuti M. Human antibodies against the polymorphic epithelial mucin in ovarian cancer patients recognise a novel sequence in the tandem repeat region. *Eur J Cancer.* 1996 Nov;32A(12):2155-63.
- Pratt WS, Islam I, Swallow DM. Two additional polymorphisms within the hypervariable MUC1 gene: association of alleles either side of the VNTR region. *Ann Hum Genet.* 1996 Jan;60 ( Pt 1):21-28. Dec 31;173(3):1019-29.
- Price MR, Hudecz F, O'Sullivan C, Baldwin RW, Edwards PM, Tendler SJ. Immunological and structural features of the protein core of human polymorphic epithelial mucin. *Mol Immunol.* 1990 Aug;27(8):795-802.
- Price MR, Pugh JA, Hudecz F, Griffiths W, Jacobs E, Symonds IM, Clarke AJ, Chan WC, Baldwin RW. C595--a monoclonal antibody against the protein core of human

urinary epithelial mucin commonly expressed in breast carcinomas. *Br J Cancer*. 1990 May;61(5):681-6.

Price MR, Rye PD, Petrakou E, Murray A, Brady K, Imai S, Haga S, Kiyozuka Y, Schol D, Meulenbroek MF, Snijdwint FG, von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten RA, Kenemans P, Blockzijl A, Nilsson K, Nilsson O, Reddish M, Suresh MR, Koganty RR, Fortier S, Baronie L, Berg A, Longenecker MB, Hilgers J, et al. Summary report on the ISOBM TD-4 Workshop: analysis of 56 monoclonal antibodies against the MUC1 mucin. San Diego, Calif., November 17-23, 1996. *Tumour Biol*. 1998;19 Suppl 1:1-20. Review.

Price MR, Sekowski M, Hooi DS, Durrant LG, Hudecz F, Tendler SJ. Measurement of antibody binding to antigenic peptides conjugated in situ to albumin-coated microtitre plates. *J Immunol Methods*. 1993 Feb 26;159(1-2):277-81.

Ragupathi G, Howard L, Cappello S, Koganty RR, Qiu D, Longenecker BM, Reddish MA, Lloyd KO, Livingston PO. Vaccines prepared with sialyl-Tn and sialyl-Tn trimers using the 4-(4-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxyl hydrazide linker group result in optimal antibody titers against ovine submaxillary mucin and sialyl-Tn-positive tumor cells. *Cancer Immunol Immunother*. 1999 Apr;48(1):1-8.

Rahn JJ, Dabbagh L, Pasdar M, Hugh JC. The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature. *Cancer*. 2001 Jun 1;91(11):1973-82. Review.

Rare Cancer Alliance. Historia del cancer. La información suministrada por esta Sociedad sirvió de base para la narración de los aspectos históricos del cancer.

Reddish M, MacLean GD, Koganty RR, Kan-Mitchell J, Jones V, Mitchell MS, Longenecker BM. Anti-MUC1 class I restricted CTLs in metastatic breast cancer patients immunized with a synthetic MUC1 peptide. *Int J Cancer*. 1998 Jun 10;76(6):817-23.

Regimbald LH, Pilarski LM, Longenecker BM, Reddish MA, Zimmermann G, Hugh JC. The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res*. 1996 Sep 15;56(18):4244-9.

Renkonen J, Paavonen T, Renkonen R. Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis(x) and sialyl Lewis(a) in lesions of breast carcinoma. *Int J Cancer*. 1997 Jun 20;74(3):296-300.

Richards ER, Devine PL, Quin RJ, Fontenot JD, Ward BG, McGuckin MA. Antibodies reactive with the protein core of MUC1 mucin are present in ovarian cancer patients and healthy women. *Cancer Immunol Immunother*. 1998 Jul;46(5):245-52.

Robbins. *Pathology basis of disease*. Sixth edition. Cap.7.

Robertson JF, Pearson D, Price MR, Selby C, Badley RA, Pearson J, Blamey RW, Howell A. Assessment of four monoclonal antibodies as serum markers in breast cancer. *Eur J Cancer*. 1990;26(11-12):1127-32.

Rughetti A, Turchi V, Ghetti CA, Scambia G, Panici PB, Roncucci G, Mancuso S, Frati L, Nuti M. Human B-cell immune response to the polymorphic epithelial mucin. *Cancer Res*. 1993 Jun 1;53(11):2457-9.

Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ. Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem*. 2001 Apr 20;276(16):13057-64. Epub 2001 Jan 22.

Sikut R, Zhang K, Baeckstrom D, Hansson GC. Distinct sub-populations of carcinoma-associated MUC1 mucins as detected by the monoclonal antibody 9H8 and antibodies against the sialyl-Lewis a and sialyl-Lewis x epitopes in the circulation of breast-cancer patients. *Int J Cancer*. 1996 May 29;66(5):617-23.

Spencer DI, Missailidis S, Denton G, Murray A, Brady K, Matteis CI, Searle MS, Tendler SJ, Price MR. Structure/activity studies of the anti-MUC1 monoclonal antibody C595 and synthetic MUC1 mucin-core-related peptides and glycopeptides. *Biospectroscopy*. 1999;5(2):79-91.

Steplewski Z, Lubeck MD, Scholz D, Loibner H, McDonald Smith J, Koprowski H. Tumor cell lysis and tumor growth inhibition by the isotype variants of MAb BR55-2 directed against Y oligosaccharide. *In Vivo*. 1991 Mar-Apr;5(2):79-83.

Strous GJ, Dekker J. Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1992;27(1-2):57-92.

Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J, Pimental RA, Wegner CC, Dey SK, Carson DD. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology.* 1995 Aug;136(8):3639-47.

Takada A, Ohmori K, Yoneda T, Tsuyuoka K, Hasegawa A, Kiso M, Kannagi R. Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res.* 1993 Jan 15;53(2):354-61.

Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N, Imai K, Yachi A. Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. *J Immunol.* 1994 Sep 1;153(5):2102-9.

Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles DW, Dalziel M. MUC1 and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Oct 8;1455(2-3):301-13. Review.

Taylor-Papadimitriou J, Peterson JA, Arklie J, Burchell J, Ceriani RL, Bodmer WF. Monoclonal antibodies to epithelium-specific components of the human milk fat globule membrane: production and reaction with cells in culture. *Int J Cancer.* 1981 Jul 15;28(1):17-21.

Touitou Y, Darbois Y, Bogdan A, Auzeby A, Keusseoglou S. Tumour marker antigens during menses and pregnancy. *Br J Cancer.* 1989 Sep;60(3):419-20.

Towbin H , Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979.

Treon SP, Mollick JA, Urashima M, Teoh G, Chauhan D, Ogata A, Raje N, Hilgers JH, Nadler L, Belch AR, Pilarski LM, Anderson KC. Muc-1 core protein is expressed on multiple myeloma cells and is induced by dexamethasone. *Blood.* 1999 Feb 15;93(4):1287-98.

von Mensdorff-Pouilly S, Gourevitch MM, Kenemans P, Verstraeten AA, Litvinov SV, van Kamp GJ, Meijer S, Vermorken J, Hilgers J. Humoral immune response to

polymorphic epithelial mucin (MUC-1) in patients with benign and malignant breast tumours. *Eur J Cancer*. 1996 Jul;32A(8):1325-31.

von Mensdorff-Pouilly S, Gourevitch MM, Kenemans P, Verstraeten AA, van Kamp GJ, Kok A, van Uffelen K, Snijdewint FG, Paul MA, Meijer S, Hilgers J. An enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of circulating antibodies to polymorphic epithelial mucin (MUC1). *Tumour Biol*. 1998;19(3):186-95.

von Mensdorff-Pouilly S, Petrakou E, Kenemans P, van Uffelen K, Verstraeten AA, Snijdewint FG, van Kamp GJ, Schol DJ, Reis CA, Price MR, Livingston PO, Hilgers J. Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and n-acetylgalactosamine (GalNAc) peptides. *Int J Cancer*. 2000 Jun 1;86(5):702-12.

Vredenburgh JJ, Simpson W, Memoli VA, Ball ED. Reactivity of anti-CD15 monoclonal antibody PM-81 with breast cancer and elimination of breast cancer cells from human bone marrow by PM-81 and immunomagnetic beads. *Cancer Res*. 1991 May 1;51(9):2451-5.

Weihrauch MR, Skibowski E, Koslowsky TC, Voiss W, Re D, Kuhn-Regnier F, Bannwarth C, Siedek M, Diehl V, Bohlen H. Immunomagnetic enrichment and detection of micrometastases in colorectal cancer: correlation with established clinical parameters. *J Clin Oncol*. 2002 Nov 1;20(21):4338-43.

Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens J. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol Biol Cell*. 1996 Apr;7(4):565-77

Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol*. 1995 Apr;129(1):255-65.

Whitehouse C, Burchell J, Gschmeissner S, Brockhausen I, Lloyd KO, Taylor-Papadimitriou J. A transfected sialyltransferase that is elevated in breast cancer and localizes to the medial/trans-Golgi apparatus inhibits the development of core-2-based O-glycans. *J Cell Biol*. 1997 Jun 16;137(6):1229-41.

- Winterford CM, Walsh MD, Leggett BA, Jass JR. Ultrastructural localization of epithelial mucin core proteins in colorectal tissues. *J Histochem Cytochem.* 1999 Aug;47(8):1063-74.
- Wreschner DH, Hareuveni M, Tsarfaty I, Smorodinsky N, Horev J, Zaretsky J, Kotkes P, Weiss M, Lathe R, Dion A, et al. Human epithelial tumor antigen cDNA sequences. Differential splicing may generate multiple protein forms. *Eur J Biochem.* 1990 May 20;189(3):463-73.
- Yamaguchi A, Ding K, Maehara M, Goi T, Nakagawara G. Expression of nm23-H1 gene and Sialyl Lewis X antigen in breast cancer. *Oncology.* 1998 Jul-Aug;55(4):357-62.
- Yamamoto M, Bharti A, Li Y, Kufe D. Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J Biol Chem.* 1997 May 9;272(19):12492-4.
- Zhang H, Zhang S, Cheung NK, Ragupathi G, Livingston PO. Antibodies against GD2 ganglioside can eradicate syngeneic cancer micrometastases. *Cancer Res.* 1998 Jul 1;58(13):2844-9.
- Zhang K, Baeckstrom D, Brevinge H, Hansson GC. Secreted MUC1 mucins lacking their cytoplasmic part and carrying sialyl-Lewis a and x epitopes from a tumor cell line and sera of colon carcinoma patients can inhibit HL-60 leukocyte adhesion to E-selectin-expressing endothelial cells. *J Cell Biochem.* 1996 Mar 15;60(4):538-49.
- Zotter S, Hageman PC, Lossnitzer A, Mooi WJ, Hilgers J. Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin. *Cancer Rev.* 1988 11-12, 55-101
- Zotter S, Lossnitzer A, Hageman PC, Delemarre JF, Hilkens J, Hilgers J. Immunohistochemical localization of the epithelial marker MAM-6 in invasive malignancies and highly dysplastic adenomas of the large intestine. *Lab Invest.* 1987 Aug;57(2):193-9.
- Zrihan-Licht S, Baruch A, Elroy-Stein O, Keydar I, Wreschner DH. Tyrosine phosphorylation of the MUC1 breast cancer membrane proteins. Cytokine receptor-like molecules. *FEBS Lett.* 1994 Dec 12;356(1):130-6.

<b>Figura 1:</b> Porcentaje de mortalidad por cáncer en mujeres en la Argentina.....	15
<b>Figura 2:</b> Tasa de incidencia de cáncer de mama cada 100.000 habitantes.....	16
<b>Figura 3:</b> Tasa de mortalidad por cáncer de mama cada 100.000 habitantes.....	17
<b>Tabla 1:</b> Series de mucinas humanas (MUCs). .....	26
<b>Figura 4:</b> Esquema de la glicoproteína MUC1.....	29
<b>Figura 5:</b> Impedimento de la interacción entre E-cadherina y $\beta$ -catenina por MUC1. ....	31
<b>Figura 6:</b> Expresión de MUC1 en células normales (A) y en células neoplásicas (B). .....	33
<b>Figura 7:</b> A-Estructura del gen de MUC1. ....	35
<b>Figura 8:</b> Productos de splicing alternativo de la MUC1.....	36
<b>Figura 9:</b> Vías de glicosilación de Ser y Thr. ....	40
<b>Figura 10:</b> Histograma de edad de las pacientes con cáncer de mama.....	48
<b>Tabla 2:</b> Tipos histológicos de las pacientes (porcentajes).....	49
<b>Tabla 3:</b> Estadíos tumorales de las pacientes (porcentajes).....	49
<b>Tabla 4:</b> Clasificación de mujeres sanas (porcentajes).....	51
<b>Tabla 5:</b> Anticuerpos monoclonales.....	52
<b>Figura 11:</b> Curva de calibración de MUC1 medida por el test de CASA. ....	59
<b>Figura 12:</b> Curva de calibración de ELISA de MUC1-CIC. ....	61
<b>Figura 13 A:</b> IHQ de una sección de tejido mamario normal incubado con el AcMo C595.....	67
<b>Figura 13 B:</b> IHQ de una sección de una displasia de mama incubada con C595.....	67
<b>Figura 13 C:</b> IHQ de una sección de tejido de carcinoma de mama ductal incubado con el AcMo SM3.....	68

<b>Figura 13 D:</b> IHQ de una sección de un carcinoma ductal incubado con HMFG2.....	68
<b>Figura 13 E:</b> IHQ de una sección de tejido de un carcinoma de tipo lobulillar incubado con HMFG2. ....	69
<b>Figura 13 F:</b> IHQ de una sección de un carcinoma ductal infiltrante incubado con C595.....	69
<b>Tabla 6:</b> Expresión de MUC1 en muestras tisulares normales y tumorales, tanto benignas como malignas.....	70
<b>Figura 14:</b> Niveles de MUC1 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama.....	71
<b>Figura 15:</b> Niveles de MUC1 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadíos .....	71
<b>Figura 16:</b> Niveles de MUC1-CIC-IgM con el AcMo C595 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama.....	73
<b>Figura 17:</b> Niveles de MUC1-CIC-IgG con el AcMo C595 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama.....	73
<b>Figura 18:</b> Niveles de MUC1-CIC-IgM con el AcMo C595 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadíos .....	74
<b>Figura 19:</b> Niveles de MUC1-CIC-IgG con el AcMo C595 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadíos .....	74
<b>Figura 20:</b> Niveles de MUC1-CIC-IgM con el AcMo SM3 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama.....	75
<b>Figura 21:</b> Niveles de MUC1-CIC-IgG con el AcMo SM3 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama.....	75
<b>Figura 22:</b> Niveles de MUC1-CIC-IgM con el AcMo SM3 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadíos .....	76



<b>Figura 23:</b> Niveles de MUC1-CIC-IgG con el AcMo SM3 expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadíos .....	76
<b>Figura 24:</b> Niveles de IgM expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama.....	77
<b>Figura 25:</b> Niveles de IgG expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama.....	78
<b>Figura 26:</b> Niveles de IgM expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadíos .....	78
<b>Figura 27:</b> Niveles de IgG expresados como DO en muestras normales y de cáncer de mama según los diferentes estadíos .....	79
<b>Tabla 7:</b> Expresión de MUC1 en el suero y muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama de acuerdo al estadio tumoral.....	81
<b>Figura 28:</b> Análisis de Componentes Principales de la contribución relativa de la expresión antigénica detectada con los AcMo C595, HMFG2 y SM3 y de los niveles séricos de MUC1 y de Ac libres y bajo la forma de inmunocomplejos, con el estadio y la edad de las pacientes .....	84
<b>Tabla 8:</b> Patrón de expresión estudiado por inmunohistoquímica en muestras de carcinoma de mama (%). .....	87
<b>Figura 29 A :</b> IHQ de una sección de tejido proveniente de un carcinoma de mama de tipo NOS ductal incubada con el AcMo CT2 .....	88
<b>Figura 29 B:</b> IHQ de una sección de un carcinoma ductal NOS incubada con el AcMo CT2. ....	88
<b>Figura 29 C:</b> IHQ de una sección de un carcinoma NOS ductal incubada con el AcMo CT2. ....	89
<b>Figura 29 D:</b> IHQ de una sección de un carcinoma de tipo lobulillar incubada con CT2.....	89

<b>Figura 29 E:</b> IHQ de una sección de un carcinoma de tipo papilar incubada con CT2. ....	90
<b>Figura 29 F:</b> IHQ de una sección de una displasia atípica incubada con CT2. ....	90
<b>Figura 30:</b> Western blot de fracciones subcelulares pertenecientes a muestras de cáncer de mama.....	92
<b>Tabla 9:</b> Expresión de MUC1 en muestras de pacientes portadoras de cáncer de mama de acuerdo a su estadio tumoral .....	95
<b>Tabla 10:</b> Expresión de MUC1 en células aisladas de aspirados de médula ósea. ....	96
<b>Figura 31 A:</b> IHQ de un tumor primario de mama incubada con el AcMo SM3. ....	97
<b>Figura 31 B:</b> ICQ de células de cáncer de mama aisladas de un aspirado de MO .....	97
<b>Figura 31 C:</b> IHQ de una sección de un cáncer de mama primario incubada con el AcMo anti-Tn. ....	98
<b>Figura 31 D:</b> ICQ de células de cáncer de mama aisladas de un aspirado de MO luego de la incubación con el AcMo anti-Tn .....	98
<b>Tabla 11:</b> Niveles séricos de MUC1, MUC1-CIC (IgM e IgG) y anticuerpos anti-MUC1 libres (IgM e IgG) obtenidos por ELISA.....	100
<b>Tabla 12:</b> Niveles séricos de MUC1 MUC1-CIC (IgM e IgG) y de anticuerpos anti MUC1 libres medidos por ELISA.....	102
<b>Tabla 13:</b> Resultados de embarazadas vs no embarazadas. ....	103
<b>Tabla 14:</b> Resultados de lactancia vs no lactancia .....	104
<b>Figura 32:</b> Determinaciones séricas en los grupos de embarazadas y no embarazadas.....	105
<b>Tabla 15:</b> Niveles séricos de MUC1 y MUC1-CIC en suero de pacientes embarazadas durante los tres trimestres del embarazo y el puerperio. ....	107

<b>Figura 33:</b> Niveles de MUC1-IgM medidos por ELISA. ....	109
<b>Figura 34:</b> Niveles de MUC1-IgG medidos por ELISA.....	110
<b>Figura 35:</b> Niveles de MUC1 medidos por CASA.....	110
<b>Figura 36:</b> Determinaciones séricas en mujeres embarazadas y no embarazadas.....	113
<b>Figura 37:</b> Determinaciones séricas en relación a los trimestres de embarazo y puerperio. ....	114
<b>Figura 38:</b> Ensayo de inhibición de Ac IgM. ....	114
<b>Figura 39:</b> Ensayo de inhibición de Ac IgG.....	115