

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

“Estudio de las mucinas polimórficas epiteliales asociadas a tumores malignos”

Tesis presentada en esta Facultad por el:

Médico MARTIN ENRIQUE RABASSA

para optar al grado académico de **Dr. en MEDICINA**

Directores de Tesis:

Prof. Dra. Amada Segal-Eiras:

Profesora Adjunta de la cátedra de Patología “B” de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP

Directora del Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA).

Investigadora Principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET.

Prof. Dra. María Virginia Croce:

Profesora Adjunta de la cátedra de Histología, Embriología y Citología “B” de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP- Investigadora Independiente de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

Agradecimientos:

Es mi deseo expresar el más profundo agradecimiento a mis directoras de Tesis, la Prof. Dra. Amada Segal-Eiras y la Prof. Dra. María Virginia Croce, por su constante apoyo y dedicación en mi formación científica. Así mismo, quiero agradecer al Sr. Decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP y a los profesores de esta alta Casa de Estudios por permitirme desarrollar los trabajos de investigación en esta Unidad Académica. Quiero agradecer también a mis compañeros de trabajo, con quienes siempre estaré en deuda.

Agradezco profundamente el apoyo económico de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (SECYT), del CONICET, de la CICPBA y de la UNLP.

Finalmente quiero expresar mi más profunda gratitud a todos los profesionales y personal hospitalario que contribuyeron a la realización de este trabajo, especialmente a mi colega el Dr. Adrián Pereyra, así como a la Lic. Sandra Demichelis por su experta asistencia en el análisis estadístico.

A Teo, mi esposa

A mis padres

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

- 1) Croce MV, Rabassa ME, Segal Eiras A. Influence of sialic acid removal on MUC1 antigenic reactivity in head and neck carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2005;11(2):74-81.
- 2) Croce MV, Rabassa ME, Price MR, Segal-Eiras A. MUC1 mucin and carbohydrate associated antigens as tumor markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2001;7(4):284-91.

INDICE PRINCIPAL

INTRODUCCIÓN.....	7
OBJETIVOS.....	82
MATERIALES.....	83
MÉTODOS.....	89
RESULTADOS.....	108
DISCUSIÓN.....	143
CONCLUSIONES.....	162
RESUMEN.....	164
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	189

INDICE DE LA INTRODUCCION

El cáncer en la antigüedad.....	7
El cáncer en nuestro tiempo	8
Los antígenos asociados a tumores.....	11
Las mucinas humanas	14
¿Qué son las mucinas?.....	20
MUC1	21
Estructura y biosíntesis	21
Aspectos genéticos.....	21
Regulación de la expresión de MUC1	23
Polimorfismo genético.....	24
Isoformas de MUC1	25
Variabilidad de la secuencia genética de MUC1	26
Modificaciones epigenéticas	27
O-glicosilación.....	27
ppGalNAc Transferasas.....	28
Core1 α 1-3 Gal transferasa	29
Core2 α 1-6 GlcNAc transferasas	31
Cadenas de polilactosaminas	33
Sialil transferasas y fucosil transferasas	34
Transporte y expresión en membrana	41
Función de MUC1 y relación con el cáncer.....	41
Mucinas y respuesta inmune	44
Respuesta Inmune Humoral.....	44
Respuesta Inmune Celular.....	45
Inmunoterapia y MUC1	47
Tumores de Cabeza y Cuello.....	49
Epidemiología.....	50
Factores de Riesgo	52
Tabaco y Alcohol	52
Otros hábitos personales.....	53
Factores hereditarios	54
Estadificación en el CECC.....	54
Biología tumoral.....	56
Lesiones preneoplásicas y cancerización de campo.....	56
Alteraciones genéticas prematuras en el CECC	60
Progresión del CECC.....	63
Hipoxia	63
Neoangiogénesis y linfangiogénesis	64
Invasión local.....	65
Moléculas de adhesión.....	66
Invasión Ganglionar.....	68
Inmunobiología del CECC.....	72
Fenómenos inmunológicos intratumorales	72
Fenómenos sistémicos	73
Citoquinas.....	75
Inmunidad Humoral	77
Antígenos tumorales en el CECC.....	79
MUC1 y antígenos carbohidratos en el CECC.....	79

INTRODUCCIÓN

El cáncer en la antigüedad

El cáncer no es una enfermedad novedosa para el hombre y tampoco lo ha sido para las otras especies que habitan o habitaron nuestro mundo. Existen registros de fósiles de dinosaurios que han sido clasificados como lesiones tumorales óseas por los paleontólogos. Estas lesiones corresponderían a tumores primitivos de los huesos, hemangiomas y hasta existen registros de presuntas lesiones producidas por metástasis (Rothschild BM et al, 1999). Es posible que, a partir del momento en que los primeros organismos multicelulares se organizaron hace más de 600 millones de años, el cáncer haya acompañado el proceso evolutivo como un error indeseable pero inevitable.

Los primeros registros del cáncer en la historia de la humanidad nos remontan al antiguo Egipto. Se han hallado algunos papiros (fechados entre los años 3000 y 1500 AC) en los cuales existen descripciones de pacientes que padecían enfermedades tumorales. Estas obras fueron probablemente inspiradas en las enseñanzas del médico Imhotep, quien fuera venerado como una divinidad de la Medicina tanto por los egipcios como por los griegos. En el papiro “Edwin Smith” se detallan ocho casos de tumores y úlceras de mama tratados por exéresis y cauterización. Sin embargo, los comentarios acerca de la enfermedad eran contundentes: “No existe tratamiento”.

Junto con la declinación del imperio egipcio, muchos de los conocimientos que estos habían adquirido fueron transferidos a otros pueblos. Hipócrates de Cos (460-370 AC) utilizó por primera vez la palabra *karkinos* para referirse a los tumores, ulcerados o no, que invadían los órganos vecinos. Esta palabra griega significa literalmente “cangrejo” y fue elegida por la similitud entre la forma de los tumores y las patas de los cangrejos o también por la forma obstinada en que, tanto tumores como cangrejos se aferran a las cosas. Hipócrates también empleó la palabra *skirros* para referirse a los tumores de consistencia pétreo. Uno de los logros de la medicina hipocrática fue el de

desterrar la concepción del cáncer como una enfermedad producida por espíritus, divinidades u otros agentes de origen supersticioso o religioso. Según Hipócrates, el cáncer se originaba por el predominio del humor bilioso en una determinada parte del cuerpo, teoría que le sobrevivió cientos de años. En el caso de los tumores pequeños, visibles y recientes Hipócrates aconsejaba tratarlos con cirugía y cauterización, pero advertía que no debía realizarse procedimiento alguno si se trataba de tumores grandes u ocultos, ya que en estos casos el médico podía causar un daño mayor.

Los preceptos establecidos por Hipócrates fueron abonados y transmitidos sin mayores cambios durante siglos por numerosos médicos. En el período romano se destacaron, entre otros, Celso y Galeno. Durante los años oscuros de la Edad Media la Medicina Hipocrática floreció en el mundo islámico. Avicenna (en lo que hoy es Irán) y Albucasis (en Andalucía) fueron dos médicos de renombre que vivieron en el siglo X y mantuvieron vivas las enseñanzas de la medicina griega, realizando ellos mismos novedosos aportes usualmente ignorados por la medicina occidental.

No fue sino hasta el renacimiento italiano que la Medicina logró progresos importantes, apoyada en un entendimiento más preciso del funcionamiento del organismo humano. Tanto la realización de autopsias como los adelantos tecnológicos, por ejemplo la invención del microscopio, permitieron desafiar la teoría de los humores de Hipócrates. Tiempo más tarde los patólogos alemanes Johannes Muller y su asistente Rudolph Virchow, dejaron en claro que los tumores malignos estaban compuestos por células que derivaban de otras células.

El cáncer en nuestro tiempo

Desde un punto de vista teórico, el cáncer es concebido como la combinación de daños y cambios que inducen a una célula normal de un individuo sano a crecer en forma autónoma, aun cuando el estímulo inicial haya desaparecido y a pesar de los sistemas que vigilan y modulan la división celular. Los mecanismos que inician este proceso involucran una serie de alteraciones irreversibles en la maquinaria genética de la célula normal que se trasladan a las sucesivas

generaciones de células hijas. Luego de un período de tiempo variable los tumores malignos evolucionan, su población celular se torna heterogénea y progresan a formas capaces de evadir la respuesta inmune antitumoral, proveerse de oxígeno y nutrientes a través de la formación de una red vascular propia, invadir tejidos vecinos o producir metástasis a distancia.

Esta definición resalta la importancia de la alteración genética como causa del cáncer y ubica a las mutaciones, deleciones y alteraciones cromosómicas como los cambios primordiales observados en las células tumorales. Sin embargo, el proceso neoplásico no debe entenderse sólo como la acumulación de errores genéticos.

La asociación de alteraciones genéticas con el cáncer se originó a comienzos del siglo XX cuando T Boveri (1929) sugirió que las aberraciones cromosómicas podrían ser la causa del mismo. A mediados de ese siglo, HJ Muller (1950) observó que la radiación inducía la transformación neoplásica y propuso que para lograr dicha transformación era necesaria la acumulación de varias mutaciones. A partir de entonces ciertos grupos de genes fueron ampliamente estudiados debido a su estrecha relación con el cáncer. Durante la década del '70 Harold Varmus y Michael Bishop descubrieron que las secuencias genéticas virales de un retrovirus, capaces de inducir la transformación neoplásica de las células que infectaba, eran homólogas a genes normales presentes en las mismas células; más tarde determinaron que estos genes codificaban proteínas que ordenaban a la célula entrar en el ciclo de división celular y que la mutación de estos genes actuaba en forma dominante, por lo que los denominaron oncogenes (Varmus HE et al, 1972).

En el año 1971, Alfred Knudson intentó explicar las diferencias de incidencia entre los retinoblastomas (un tumor de retina) espontáneos y hereditarios con la hipótesis de los “dos golpes”. Knudson planteó que para que se desarrolle el retinoblastoma eran necesarias dos alteraciones genéticas, que causaran cada una por separado la pérdida de función del alelo del gen que evitaba la transformación neoplásica y que, además, una de estas alteraciones podía ser heredada (Knudson AG Jr, 1971). Esta visión contrastaba con la definición de los oncogenes en el

sentido de que las mutaciones descritas actuaban de forma recesiva. En el año 1986 Robert Weinberg y colegas aislaron la secuencia del gen Rb, causante del retinoblastoma, asignado a la banda q14 del cromosoma 13. Esta clase diferente de genes asociados a tumores recibió el nombre de antioncogenes, ya que codificaban proteínas relacionadas con las señales de cese en el ciclo celular (Friend SH et al, 1986 y Friend SH et al,1987).

Recientemente han surgido nuevos grupos de genes relacionados con el cáncer. Uno de estos grupos está compuesto por una extensa familia de genes que regulan la muerte celular programada, es decir, controlan los mecanismos que activan la autodestrucción celular en respuesta a la presencia de daño genómico irreparable o como resultado del reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos. Con el tiempo resultó evidente que la inactivación de las vías que inducen la apoptosis es un evento clave en la génesis de muchos tumores. Otros grupos de genes muy estudiados en la actualidad son los relacionados con el mantenimiento de la integridad del genoma celular, los telómeros y una larga lista que continúa.

Como se ha expuesto, el estudio del origen del cáncer ha sufrido una revolución de la mano de los genes asociados a tumores, extendiéndose incluso a campos relacionados con investigaciones de la progresión, invasión y la metástasis tumoral. Sin embargo, raramente se encuentra un oncogen o antioncogen que, como el Rb, se asocie a la totalidad de los casos de una neoplasia maligna originada en un tejido determinado; incluso con técnicas altamente sensibles como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction* o PCR), esta asociación no supera el 40-50% en el mejor de los casos. Y si examinamos las secuencias de mutaciones propuestas para diversos modelos de progresión neoplásica, éstas se cumplen en apenas el 10% de los casos.

Entonces, si bien la aproximación al problema del cáncer a través de un enfoque genético provee muy interesantes hipótesis sobre su origen, otros enfoques son necesarios para abordar cuestiones como diagnóstico, diseminación, pronóstico y tratamiento. Un dato extremadamente interesante es que la mayoría de las proteínas resultantes de la expresión de los genes asociados a

tumores son escasamente antigénicas. Una excepción la constituye el gen *HER-2/neu*, cuyo producto es un receptor para el factor de crecimiento epitelial (EGFR o erbB2) y se encuentra altamente expresado en el 30% de los tumores de mama. Otra muy interesante excepción es la mucina humana 1 (MUC1) cuyo gen es sobreexpresado en numerosos tumores epiteliales y su producto es poderosamente antigénico.

Los antígenos asociados a tumores

La relación entre el sistema inmune de un individuo y los posibles tumores malignos que éste pueda hospedar es, por lo menos, compleja. Los registros históricos dan cuenta de la existencia de numerosos casos de tumores que han sufrido una regresión espontánea la que, en muchos de los casos, se asocia a la presencia de algún tipo de sobreinfección viral, bacteriana o fúngica. Este fenómeno era bien conocido en la antigüedad y algunos médicos, de hecho, implementaron de forma empírica tratamientos en los que se aplicaban diversas fuentes sépticas directamente sobre los tumores, pero con resultados controvertidos.

Recién a fines del siglo XIX William Coley comenzó a emplear de un modo más racional una mezcla de dos bacterias muertas (*Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens*) a través de inyecciones intratumorales en pacientes portadores de sarcomas. Estas inoculaciones, en el mejor de los casos, no mataban al paciente sino que le producían un estado febril, el cual Coley asociaba con la curación de los mismos (Hoption Cann SA, et al 2003). La “toxina de Coley”, como se llamó más tarde, fue aplicada a más de 900 pacientes por él mismo, alcanzando una tasa de remisión superior al 10%. Sin embargo, no existía en ese entonces un andamiaje teórico que permitiera explicar las observaciones de Coley.

A comienzos del siglo XX, Paul Ehrlich sentó las bases de la Inmunología y Hematología modernas. La descripción que realizó de los anticuerpos y sus cadenas laterales bivalentes, como llaves preformadas que encajaban en una cerradura determinada (el antígeno), lo llevó a sugerir que era posible hallar una “bala mágica” que reconociera y destruyera a las células tumorales las cuales

consideraba diferentes en su composición antigénica respecto a su contraparte normal (Schwartz RS, 2004). Tiempo después Ehrlich fue más allá y sugirió que, de no ser por el sistema inmune, los tumores serían terriblemente frecuentes. El sustento de sus afirmaciones se originaba en experimentos de trasplantes de tumores entre ratones, en los que se observaba rechazo tumoral. Sin embargo, estos ratones no eran genéticamente idénticos y la existencia de otros antígenos capaces de mediar el rechazo se contraponía a la posibilidad de una respuesta inmunológica antitumoral.

A fines de la década del '40, el australiano Frank Macfarlane Burnet planteó que el sistema inmunológico logra adquirir tolerancia hacia lo propio a través de un mecanismo de eliminación de los linfocitos autorreactivos durante el desarrollo del sistema inmune, lo que desalentó aún más la posibilidad de encontrar linfocitos o anticuerpos reactivos contra antígenos tumorales.

A mediados del siglo XX, el desarrollo de los ratones singeneicos fue, sin duda, una herramienta fundamental para las investigaciones en inmunología tumoral. Estos ratones, obtenidos por endocría, aceptaban los trasplantes de material singeneico de otro ratón cuyos antígenos de histocompatibilidad eran idénticos. Así mismo, era posible inducir la aparición de un tumor y transplantarlo de un ratón a otro. En ese momento se realizó una observación trascendental que confirmó la existencia de los antígenos asociados a tumores: si los ratones eran desafiados con un segundo trasplante de un mismo tumor eran capaces de producir su rechazo. Los experimentos de R.W. Baldwin con tumores inducidos químicamente mostraban que, en general, no se producía una inmunidad cruzada entre el tumor original y el transplantado. Por otra parte, los tumores inducidos por agentes infecciosos, como el virus del sarcoma de Roux, sí generaban una inmunidad cruzada. Estos experimentos demostraron con claridad la existencia de los antígenos tumorales y surgió así el concepto de antígenos tumorales asociados y antígenos tumorales específicos.

Durante la década del '60 Burnet elaboró una nueva teoría según la cual existía un patrullaje constante de linfocitos en busca de células transformadas, acción mediada presuntamente por los antígenos asociados a tumores. Esta teoría recibió el nombre de inmunovigilancia tumoral y

claramente implicaba la existencia de mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte de las células tumorales (Burnet FM, 1967).

Para poner a prueba la teoría de la inmunovigilancia se desarrollaron numerosos experimentos con ratones inmunodeficientes. Si existía un mecanismo de inmunovigilancia tumoral la incidencia de tumores espontáneos o inducidos en los ratones inmunodeficientes debía ser mayor que en los competentes. Numerosos experimentos fracasaron en el intento de verificar la teoría de Burnet y ésta fue dejada de lado durante décadas para revivir en estos últimos años.

A pesar de las serias dudas que se presentaban al estudiar la respuesta inmunológica antitumoral, las investigaciones para establecer la existencia de los antígenos tumorales prosiguieron y en 1965 P Gold y Freedman SO publicaron el descubrimiento del Antígeno Carcinoembrionario (CEA). Tiempo después desarrollaron un test de radioinmunoensayo para medir los niveles séricos en pacientes con cáncer de colon y de recto (Thomson DM et al, 1969).

Hacia fines de la década del '70 el desarrollo de los anticuerpos monoclonales por G Kohler y C Milstein (1975) significó una revolución en la Inmunología, especialmente en el estudio inmunológico de los tumores y en el campo de los antígenos tumorales.

Una de las primeras consecuencias de su empleo fue la identificación de moléculas antigénicas que se encontraban en mayor cantidad o habían sufrido modificaciones, o directamente no constituían parte de los tejidos normales. Estas moléculas se encontraban presentes en diferentes extractos de células tumorales, obtenidas tanto a partir de tumores completos como de sus diferentes fracciones o a partir de células en cultivo. Muchas de estas moléculas se hallaban asociadas a la membrana celular. Una de estas moléculas resultó extremadamente inmunogénica en el ratón, la mucina humana MUC1.

Las mucinas humanas

Los términos mucoso, mucinoso o mucina hacen referencia a la capa viscosa que recubre los epitelios de los órganos huecos del tracto digestivo, respiratorio y genitourinario, a la que históricamente se le asignó una función protectora frente a las agresiones tanto exógenas como endógenas. Las mucinas son el principal componente de esta capa viscosa y constituyen un grupo heterogéneo de moléculas glicoproteicas, filamentosas y de muy alto peso molecular. Su estructura característica se compone de un centro proteico al que se hallan unidas numerosas cadenas de carbohidratos que conforman más de la mitad de su masa.

Con el tiempo se ha transformado la concepción estática de las mucinas que las consideraba como un simple componente de una barrera defensiva. Numerosos estudios en el campo de la Genética, la Biología Molecular y de la Inmunología han involucrado a estas moléculas en eventos fisiológicos como la diferenciación de los epitelios, la reparación, la protección contra patógenos específicos y, por otra parte, en procesos patológicos como la fibrosis quística o la transformación neoplásica.

Las primeras investigaciones realizadas sobre mucinas se efectuaron a través de estudios bioquímicos que analizaron la composición glicoproteica de los tejidos glandulares de distintos mamíferos. Estos trabajos precursores no sólo determinaron la composición de carbohidratos y aminoácidos de las mucinas, sino que también permitieron sugerir que estas moléculas estaban compuestas por secuencias repetitivas de aminoácidos, ya que al realizar la digestión enzimática de la porción proteica, la proporción de aminoácidos en los polipéptidos producidos era idéntica a la hallada en la molécula intacta (Pigman W et al, 1973). Por aquel entonces las mucinas eran denominadas según su procedencia, por ejemplo, la mucina de la glándula submaxilar ovina o la mucina humana de la mama.

Otros trabajos que contribuyeron a caracterizar a las mucinas se valieron de la electroforesis en geles de poliacrilamida. En estos trabajos se caracterizaron extractos de membranas celulares, en particular de las membranas de los glóbulos de grasa de la leche humana, (Koblyka D y Carraway KL, 1972) los que poseían una fracción invariable de glicoproteínas de alto peso molecular (aproximadamente 240 kDa). Estas fracciones exhibían dos características particulares: primero, una tinción anómala en los geles de poliacrilamida con el colorante azul de Coomassie y segundo, una variación importante en la distancia de migración en la electroforesis y por lo tanto en el cálculo de su peso molecular aparente. Los autores concluyeron que las glicoproteínas de esa fracción presentaban un contenido muy elevado de carbohidratos, lo que explicaba su comportamiento anómalo. A comienzos de la década del '80 M. Shimizu y K Yamauchi (1982) lograron aislar por cromatografía en columna de sefarosa una fracción glicoproteica de alto peso molecular que denominaron PAS-0, rica en treonina, serina y prolina y cuyo peso molecular estaba conformado en más del 50% por carbohidratos.

Debido a su gran tamaño y complejidad, las mucinas constituían un desafío desde el punto de vista bioquímico para su estudio. Sin embargo, ya existía la concepción de dos grupos principales de mucinas, uno formado por las mucinas secretadas que formaban geles, y otro formado por las mucinas de membranas que integraban el glicocáliz.

Como hemos mencionado el desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales (AcMo) por G Köhler y C Milstein hacia fines de la década del 70 permitió realizar avances significativos en el estudio de los antígenos tumorales. Inicialmente se obtuvieron infinidad de AcMo a partir de diferentes materiales utilizados como inmunógenos, entre los que se encontraban las membranas de los glóbulos de grasa de la leche humana, (Xing PX et al, 1989 y Taylor-Papadimitriou J et al, 1981) glicoproteínas urinarias (Price MR et al, 1990) y extractos de células tumorales (Szpak CA et al, 1984 y Metzgar RS et al, 1982). A pesar de los diversos inmunógenos

empleados, muchos de estos anticuerpos identificaban una molécula ampliamente glicosilada que pesaba aproximadamente 400 kD, la que era particularmente inmunogénica en los ratones.

Distintos grupos de trabajo nombraron a esta glicoproteína de diversas maneras: *antígeno DU-PAN-2* (Borowitz MJ et al, 1984); *Peanut reactive urinary mucin* (PUM) (Karlsson S et al, 1983); *antígeno MAM6* (Hilkens J et al, 1984); *Episialina* (Ligtenberg MJ et al, 1990); *antígeno DF3* (Szpak CA et al, 1984); *Polymorphic epithelial mucin* (PEM) (Burchell J, et al. 1983); *Epithelial membrane antigen* (EMA) (Sloane JP et al, 1980), entre tantos otros, y determinaron la importancia que poseían para efectuar el diagnóstico y pronóstico de diferentes neoplasias a través de serología e inmunoquímica, especialmente en el cáncer de mama (Hilkens J et al, 1986 y Hayes DF et al, 1985). Veamos a continuación cuales fueron los hallazgos de estos grupos.

El grupo de Joyce Taylor-Papadimitriou estableció los AcMo HMFG1 y HMFG2 y determinó que estos reconocían determinantes carbohidratos en glicoproteínas de peso molecular superior a 400 kD presentes en los glóbulos de grasa de la leche humana (aunque tiempo más tarde concluyeron que en realidad se dirigían contra una porción proteica), en tanto que en los tumores y en el suero de los pacientes portadores de tumores los anticuerpos reconocían moléculas de pesos moleculares menores, próximos a los 190 o 200 kD (Burchell J et al, 1984). Estas glicoproteínas presentaban variaciones entre distintos individuos, es decir que eran altamente polimórficas, y recibieron el nombre de PEM. Más tarde confirmaron que los anticuerpos dirigidos contra PEM también reconocían otros antígenos similares como EMA y PUM (Swallow DM et al, 1986).

Por otra parte, Swallow y colegas determinaron que una glicoproteína de alto peso molecular presente en el sedimento urinario era reconocida por la lectina del maní PNA y designaron a esta molécula PUM. Los estudios electroforéticos establecieron el polimorfismo de la molécula, ya que ésta también presentaba diversos pesos moleculares, tanto entre los alelos de un individuo como entre los alelos de distintos individuos. Sorprendentemente, al estudiar distintos grupos familiares era evidente la presencia de un locus para PUM de expresión codominante.

El antígeno MAM6, después rebautizado Episialina por John Hilkens, se encontraba presente en la superficie apical de muchos tejidos glandulares y tanto en la superficie como en el citoplasma de células tumorales en cultivo o en cortes histológicos. Esta glicoproteína se expresaba con dos pesos moleculares diferentes superiores a 400 kD y se encontraba ampliamente unida al ácido siálico. Estudios realizados sobre la biosíntesis de episialina revelaron que era producida inicialmente como un precursor de 200 y 350 kD N-glicosilado y que luego era modificada en el aparato de Golgi por O-glicosilación hasta alcanzar un peso molecular final de 450–650 kD (Hilkens J y Buijjs F, 1988).

El AcMo DF3 fue obtenido por Donald Kufe y colegas a partir de protocolos de inmunización con extractos de membranas celulares de metástasis hepáticas de un cáncer de mama (Szpak CA et al, 1984). El AcMo reaccionaba contra una molécula presente en la región apical de células diferenciadas o en el citoplasma de células menos diferenciadas; se relacionaba en forma inversa con el grado histológico y nuclear de la lesión neoplásica y en forma directa con la expresión de receptores de estrógenos (Lundy J et al, 1985). El antígeno identificado por DF3 se mostraba como una glicoproteína de membrana que, en la corrida electroforética, se expresaba como dos bandas cada una con un peso molecular de 330 y 450 kD, respectivamente (Kufe D et al, 1984). En las pacientes portadoras de cáncer de mama podían encontrarse niveles elevados de DF3 en circulación, el cual presentaba pesos moleculares inferiores de alrededor de 300 y 450 kD con una variación muy grande entre pacientes (Hayes DF et al, 1985). El estudio del antígeno en grupos familiares determinó que la heterogeneidad de DF3 también se debía a la expresión codominante de múltiples alelos presentes en un solo locus (Hayes DF et al, 1988).

El AcMo DU-PAN-2 fue establecido contra mucinas de tumores de páncreas y difería sensiblemente del reconocido por los anticuerpos desarrollados contra tumores de mama. La molécula poseía un peso molecular superior a 1000 kD y su porcentaje de carbohidratos era superior al 80%, cuando en la mucina de mama oscilaba alrededor del 50%. Además, los

anticuerpos dirigidos contra la mucina de mama sólo reaccionaban con la mucina obtenida a partir del páncreas cuando esta última era parcialmente deglicosilada (Lan MS et al, 1990b). Sin embargo, tiempo más tarde se determinó que DUPAN-2 en realidad se dirigía contra un carbohidrato sialilado presente en esta mucina.

El desarrollo de las técnicas de clonado y secuenciación genética permitieron finalmente aislar las secuencias de los genes que codifican las mucinas. En 1987 SJ Gendler y colegas anunciaron que habían aislado un fragmento genómico, obtenido de una librería de cDNA de una línea celular de cáncer de mama, cuyo producto era reconocido por los AcMo SM3, HMFG1 y HMFG2. A través de técnicas de hibridación in situ en cromosomas de linfocitos en metafase lograron asignar la localización 1q21-24 al locus de PUM (Swallow DM et al 1987). Otros grupos de investigadores lograron corroborar las observaciones de Gendler, confirmando la identidad de DF3, MAM6 y PEM (Siddiqui J et al, 1988 y Ligtenberg MJ et al, 1990).

Los fragmentos de DNA aislados permitieron ratificar que el polimorfismo característico de estas moléculas se debía a la existencia de un número variable de repeticiones en tandem de veinte aminoácidos (en inglés, *variable number of tandem repeats* o VNTR) cuya secuencia era GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP. Los dos alelos que codifican a la molécula se expresaban de forma codominante y por lo general existían diferencias en el número de VNTR entre las líneas paterna y materna, razón por la cual era característico observar dos bandas en los ensayos de electroforesis. En individuos del norte de Europa se pudieron establecer diferencias de hasta 100 repeticiones en tandem, siendo el número de repeticiones más frecuentemente hallado alrededor de 40 u 80. Estas diferencias provocaban una variación en el peso molecular de la molécula proteica desnuda de hasta 110 kD, siendo los fragmentos más pequeños de 68 kD.

La secuencia genética completa de PEM fue publicada un año después y en forma simultánea por diversos grupos: Joyce Taylor-Papadimitriou (Gendler SJ et al, 1990), John Hilkens (Ligtenberg MJ et al, 1990), Daniel Wreschner (Wreschner DH et al, 1990) y el grupo de Michael

Hollingsworth (Lan MS et al, 1990a), este último utilizando una librería de cDNA obtenida de una línea celular de cáncer de páncreas.

La molécula comprendía un péptido señal de 13 aminoácidos, una región de 127 aminoácidos que flanqueaba la región de los VNTR, ésta de 800 a 1700 aminoácidos de longitud, y a continuación otra de 227 aminoácidos. Las secuencias contiguas a los VNTR presentaban también dos o tres repeticiones de veinte aminoácidos, pero exhibían una degeneración progresiva a medida que se alejaban de los VNTR. A continuación se encontraba una región de transmembrana de 31 aminoácidos y finalmente una región de 72 aminoácidos ubicada en el citoplasma. Las secuencias obtenidas por Gendler y Hollingsworth no mostraron diferencias significativas, en tanto que la hallada por Hilkens mostraba una variante con 14 aminoácidos de más en la región aminoterminal (fueron denominadas variantes A y B), supuestamente resultado del ajuste o empalme (*splicing*) diferencial de alguno de los siete exones que formaban la molécula. Es interesante señalar que los fragmentos genómicos aislados por el grupo de Donald Kufe y colegas no contenían la región de los VNTR; los autores sugirieron que era posible la existencia de una variante de *splicing* en la cual esta región fuera eliminada, ya que por lo demás estos fragmentos eran idénticos a los hallados por otros autores.

Las secuencias informadas por Wreschner también mostraban diferencias en los productos del gen. Por eventos de *splicing* alternativo se generaban dos transcripciones de distinta longitud donde uno codificaba la región hidrofóbica de transmembrana y el otro no lo hacía. Esta situación generaba dos isoformas que probablemente se localizaban en compartimentos intra o extra celulares distintos (Wreschner DH et al, 1990).

Finalmente, en 1992 la secuencia de esta glicoproteína recibió la denominación MUC1 por parte del Comité Internacional de Nomenclatura Genética. El establecimiento de la secuencia completa de MUC1 fue fundamental para hallar respuestas a numerosos interrogantes acerca de la naturaleza de esta molécula.

¿Qué son las mucinas?

Las investigaciones realizadas durante los últimos 15 años han modificado drásticamente los conceptos que deben emplearse en una definición precisa acerca de qué es una mucina y han ampliado considerablemente el número de integrantes que componen la familia.

Entendemos por glicoproteínas a los compuestos conjugados de proteína y carbohidratos. Las glicoproteínas son un grupo muy variable de compuestos que presentan una gama muy amplia de pesos moleculares y el porcentaje de la masa total del conjugado aportado por la fracción de carbohidratos es igualmente muy amplio, pudiendo ser del 1% o incluso mayor al 80%. Las mucinas son glicoproteínas de muy alto peso molecular compuestas principalmente por carbohidratos.

En cuanto a su localización generalmente llamamos mucinas a las glicoproteínas presentes en los tejidos epiteliales glandulares o de recubrimiento, en tanto que se denominan glicoproteínas similares a las mucinas (o en inglés *mucin like glycoproteins*) a las glicoproteínas presentes en el endotelio vascular o en las células de la sangre. Sin embargo se ha determinado la presencia de mucinas propiamente epiteliales en linfocitos y células dendríticas (en inglés *Dendritic Cell* o DC).

Otro criterio ampliamente utilizado para la definición de las mucinas es la presencia de cadenas de carbohidratos unidas a los aminoácidos serina y treonina por medio de enlaces O-glicosídicos (denominados O-glicanos), en contraposición a las cadenas unidas por enlaces N-glicosídicos. En numerosas mucinas ha sido descripta la presencia de ambas formas de glicosilación y este criterio sólo sería aplicable en cuanto al gran predominio de la O-glicosilación en este tipo de moléculas.

Con respecto a la composición de la porción proteica en las mucinas predominan los residuos de serina, treonina, prolina y alanina. Como vimos, los dos primeros aminoácidos son necesarios para la O-glicosilación y por lo tanto son muy abundantes, en tanto que los residuos de

prolina y alanina aseguran la adecuada disposición de la cadena peptídica, permitiendo el acceso de las enzimas responsables de la O-glicosilación.

Según Jan Dekker las dificultades para definir con precisión qué es una mucina radican en dos situaciones poco frecuentes. Primero, el principal criterio para la inclusión de integrantes en la familia se ha basado en modificaciones post-traduccionales como la O-glicosilación y no en la homología de las secuencias peptídicas, situación que altera criterios previos empleados en la nomenclatura genética. Segundo, desde un punto de vista evolutivo la familia de las mucinas es el resultado de la convergencia más que de la divergencia de sus integrantes. Dekker afirma que no existen secuencias comunes a los distintos grupos de mucinas y que las regiones centrales de las moléculas donde ocurre la glicosilación (denominadas PTS por la presencia de cantidades importantes de prolina, treonina y serina) evolucionaron de forma independiente y que, además, estas regiones no se encuentran sujetas a presiones evolutivas para conservar sus secuencias, en tanto permitan la O-glicosilación (Dekker J et al, 2002).

MUC1

Como hemos visto MUC1 fue una de las primeras mucinas en ser descrita y desde entonces se ha acumulado una gran cantidad de datos referentes a ella. A continuación se expondrán brevemente los aspectos fundamentales en cuanto a su estructura, biosíntesis y función, destacando las modificaciones observadas durante el proceso neoplásico.

Estructura y biosíntesis

Aspectos genéticos

El estudio de los aspectos genéticos de MUC1 es de sumo interés para lograr la comprensión de fenómenos poco comunes observados en relación con su expresión antigénica. Sin embargo, la estructura del locus de MUC1 es extremadamente compleja tanto por la función de su

región promotora y los elementos cis-activantes presentes en ella, como por los fenómenos de *splicing* alternativo operados sobre el RNA mensajero. La complejidad y distribución de los elementos reguladores de la región promotora de MUC1 hacen que sea única entre los eucariotas.

Como hemos visto, el gen de MUC1 se encuentra localizado en el cromosoma 1 en la región 1q21 y fue ubicado, secuenciado y clonado por Sandra Gendler y colegas, entre otros grupos. La secuencia completa de MUC1 codifica una proteína de entre 1000 y 2000 amino ácidos (aa). Desde el extremo aminoterminal es posible observar una cola citoplasmática de 72 aa, un dominio hidrofóbico de transmembrana de 31 aa y una región extracelular extendida que contiene en su porción central los VNTR, estas repeticiones en tandem están formadas por secuencias de 20 aa que son en su mayoría idénticas entre sí, salvo por algunas sustituciones (ver página 26). Dentro de la región carboxiterminal, que se extiende desde el dominio transmembrana hasta las repeticiones en tandem, es posible encontrar cinco sitios putativos de N-glicosilación y un dominio poco común denominado SEA (por *Sea-urchin-sperm-protein*, *Enterokinase*, *Aggrin*; otras moléculas en las que se encuentra esta secuencia). Su peculiaridad radica en la capacidad de generar en forma autocatalítica dos fragmentos de MUC1, produciendo un corte a 58 aa del dominio transmembrana en la secuencia ↓SVVV. Los dos fragmentos resultantes se reúnen entre sí por medio de enlaces no covalentes y sensibles al detergente dodecil sulfato sódico (SDS).

Estructuralmente el gen de MUC1 se haya conformado por siete exones, de los cuales el segundo contiene toda la secuencia de VNTR. La secuencia genética de MUC1 es rica en citosina y guanina dentro de la región de VNTR, estas repeticiones en tandem de CG son frecuentemente halladas en regiones no codificantes del genoma humano y usualmente se encuentran metiladas, por lo que son consideradas de baja complejidad. Los niveles de metilación de MUC1 fueron establecidos por S. Zrihan-Licht y colegas (1995) quienes hallaron una completa metilación de la región VNTR de MUC1 en leucocitos de sangre periférica y una ausencia completa en las regiones

proximales extra VNTR, en tanto que en el DNA obtenido de tumores de mama no se observaba metilación alguna.

Regulación de la expresión de MUC1

Los elementos reguladores de la expresión de MUC1 se extienden hasta 1,3 kilo bases (kb) en dirección 5', siendo los 700 pares de bases (pb) próximos a la secuencia codificante suficientes para iniciar la transcripción. En ella se encuentran elementos transcripcionales de células epiteliales, linfoides, musculares y hepáticas, lo que en teoría supone la posibilidad de la expresión de MUC1 en estos tipos celulares.

JZ Zaretsky y colegas (1999) agruparon los elementos reguladores de MUC1 en 16 regiones o "clusters" en las que se hallan distintos elementos cis-activantes. En dirección 3' a 5' nos encontramos con el cluster I que se corresponde con la región central o "core" de inicio de transcripción, en la que pueden hallarse secuencias de tipo TATA box y otras responsables de la unión de la polimerasa de RNA. Los clusters II a IV, ubicadas en la región promotora proximal, poseen secuencias de tipo CG box reconocidas por los factores trans-activantes Sp1, SpA, e Ikaros 1 y 2; además, se localizan por lo menos dos E-box, las cuales han sido denominadas E-MUC en este promotor. Estas secuencias y los elementos trans-activantes que las reconocen, intervienen en el control de la expresión tisular específica de MUC1, actuando en forma conjunta para lograr los niveles óptimos de transcripción. Es interesante señalar que los elementos Ikaros 1 y 2 son específicos de las células T y por lo tanto responsables de la expresión de MUC1 en los linfocitos T activados.

El resto de los clusters ocupan la región promotora distal; se pueden observar diversos elementos entre los que se destacan los elementos de respuesta a STATs (del inglés "*Signaling Transducers and Activators of Transcription*"). En las células epiteliales estos factores de transcripción responden a la acción de moléculas como el interferón gamma (INF γ), prolactina o

interleuquina 6 (IL-6), por lo tanto es posible un aumento de la transcripción de MUC1 frente a estos estímulos, hecho que ha sido comprobado experimentalmente (Reddy PK et al, 2003).

Otros elementos cis-activantes de importancia en la expresión de MUC1 son los factores de respuesta a estrógenos los que se encuentran en las regiones más distales del promotor. Si bien existe consenso en cuanto a que la expresión de MUC1 es elevada por acción de los estrógenos, algunos autores sugieren que este efecto no sería directo.

Polimorfismo genético

Como vimos anteriormente, el polimorfismo genético de MUC1 fue una de las características distintivas de esta glicoproteína al momento de su descubrimiento. El análisis por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida mostraba la presencia de una o dos bandas pertenecientes a MUC1 en un mismo individuo y al realizar estudios en los grupos familiares fue posible establecer la existencia de una expresión codominante de los alelos materno y paterno (Swallow DM et al, 1987). A partir de la secuenciación de MUC1 fue posible determinar que el polimorfismo genético se debía a la presencia de los VNTR, que por fenómenos de cruzamiento desequilibrado (del inglés *unequal crossover*, es decir un evento de recombinación en el cual los sitios recombinantes se encuentran en localizaciones disímiles en el DNA parental), generaban mayor o menor número de repeticiones en tandem y por lo tanto distintos alelos. En una población de 69 individuos del norte de Europa, SJ Gendler y colegas (1990) lograron establecer la existencia de 30 alelos diferentes con una heterozigocidad del 80%. La distribución del número de repeticiones de MUC1 es bimodal, entre ± 30 a ± 45 repeticiones y ± 60 a ± 90 en otro grupo. MJ Ligtenberg y colegas (1990) sugieren que esta separación en dos grupos surgió por la duplicación en su totalidad de la región de VNTR y que el resto de las variaciones se deben a pequeñas alteraciones durante la replicación del DNA.

En trabajos recientes, realizados en individuos originarios de Portugal, el polimorfismo de MUC1 determinado por el número de repeticiones en tandem se asoció a la susceptibilidad hacia algunas patologías como el cáncer gástrico y la infección por *Helicobacter pylori* (Carvalho F et al, 1997 y Silva F et al, 2001). Sin embargo, no pudo establecerse esta relación en individuos de Dinamarca, en los cuales incluso pudo establecerse una menor longitud de la región VNTR que en los portugueses (Carvalho F et al, 1999).

Isoformas de MUC1

Existen nueve isoformas de MUC1 informadas a la base de datos Swiss-Prot¹, las cuales se originan principalmente a través de mecanismos de *splicing* alternativo (tabla 1). Las primeras isoformas fueron descritas por MJ Lightenberg y colegas (1990) y resultan de una modificación en la zona aceptora del *splicing* del primer y segundo exón; de esta manera se obtienen dos moléculas completas pero con una diferencia de 14 aa. Estas dos isoformas recibieron el nombre de A y B pero no se encontraron diferencias en cuanto a su expresión, función o estructura. Otras variantes similares fueron descritas por A Obermair y colegas (2001) siendo denominadas MUC1/C y MUC1/D.

Se ha descrito una variante de *splicing* que carece de la región transmembrana y, por lo tanto, es secretada al espacio extracelular (Wreschner D et al, 1990). Esta forma recibió el nombre de MUC1/SEC y es posible observarla en las secreciones normales, así como en el suero de los pacientes con cáncer (Smorodinsky et al, 1996).

Otra variante de MUC1 generada por *splicing* alternativo se encuentra desprovista de la región central de repeticiones en tandem. Luego de analizar la secuencia de aminoácidos obtenida, se dedujo que esta nueva forma de MUC1 probablemente actúa como un receptor de membrana y modulador de la transducción de señales y recibió el nombre de MUC1/Y (Wreschner D et al,

¹ <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>

1994). En forma similar a la obtención de MUC1/Y se descubrieron las isoformas MUC1/Z y MUC1/X a partir de DNA de tumores de cuello uterino (Oosterkamp HM et al, 1997).

Recientemente F. Levitin y colegas (2005) han descrito una nueva variante de MUC1 la cual se obtiene por corrimiento del marco de lectura. El significado y función de este nuevo producto del gen de MUC1 se desconocen.

Tabla 1: Isoformas de MUC1 resultado del *splicing* alternativo.

ISOFORMAS	CARACTERÍSTICA
MUC1/REP o MUC1/A	Molécula completa, heterodímero de transmembrana.
MUC1/B MUC1/C MUC1/D	Variantes más cortas de la región VNTR.
MUC1/ZD	Multímero de 60kD obtenido por corrimiento del marco de lectura.
MUC1/SEC	Sin la región transmembrana y cola citoplasmática.
MUC1/X MUC1/Y MUC1/Z	Sin la región VNTR, posibles receptores de MUC1/SEC.

Variabilidad de la secuencia genética de MUC1

A partir de un trabajo publicado por FG Hanisch y colegas (1999) pudo establecerse que existían sustituciones en la secuencia peptídica de MUC1 en la región de los VNTR. Estas sustituciones consistían en el cambio de DTR por ESR en la secuencia icosapéptica y fueron de interés debido a su localización en un sitio inmunodominante de la molécula. Más tarde fue posible determinar la existencia de variaciones de la secuencia de los TR a nivel genético, las cuales se acumulaban en los extremos 5' y 3' de la región VNTR y generaban el reemplazo de una prolina por treonina, alanina o glutamina y el previamente mencionado (Hanisch FG et al, 1999 y Engelmann K et al, 2001). Estas modificaciones son sumamente frecuentes, como lo ejemplifica el hallazgo en la población general de un 90% de reemplazos de DTR por ESR, los cuales se distribuyen formando clusters en la región 5' del VNTR.

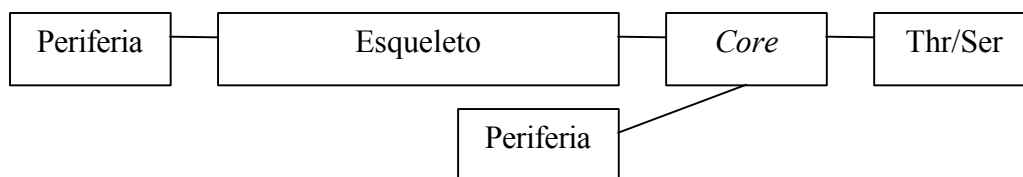
Modificaciones epigenéticas

O-glicosilación

Las cadenas de O-glicanos de MUC1 poseen, según el estado de maduración de la molécula, desde uno hasta más de 16 residuos de carbohidratos, formando cadenas que pueden estar o no ramificadas. Si bien el proceso de síntesis es muy complejo, existen una serie de reglas que permiten la aparición de determinadas estructuras y no de otras. Este proceso se ve influenciado, entre otros factores, por la expresión de las glicosiltransferasas (enzimas que intervienen en la transferencia de un residuo carbohidrato a una secuencia peptídica u otro residuo carbohidrato), su afinidad por el sustrato, la disponibilidad de éste y la localización de las glicosiltransferasas en determinados compartimientos del aparato de Golgi.

En los mamíferos la O-glicosilación se inicia con la adición de un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a una serina o treonina de la cadena polipeptídica; esta reacción es mediada por las enzimas UDP-GalNAc:polipéptido-N-acetilgalactosaminiltransferasas o ppGalNAcT. A partir de allí se genera por adición de un segundo residuo la región inicial del O-glicano, denominada en inglés “*Core*”; luego la estructura puede ser extendida, o no, a través de la formación un esqueleto de tipo polilactosamina y finalizada con regiones periféricas ricas en residuos de fucosa o ácido siálico (figura 1), las cuales constituyen los antígenos de grupo sanguíneo o histo-asociados de tipo Lewis o ABO (Fukuda M, 2002).

Figura 1: Estructura esquemática de una cadena de carbohidratos unidos por enlaces O-glicosídicos.



Existen ocho estructuras iniciales posibles en la naturaleza: “*Core1*”, “*Core2*” y hasta “*Core8*”. Las cuatro primeras son las formas más frecuentemente encontradas en las glicoproteínas de tipo mucinas. A continuación se describen las principales enzimas encargadas de la síntesis de estructuras del *Core* y la periferia, así como los importantes grupos de antígenos asociados a tumores que se generan.

ppGalNAc Transferasas

En los mamíferos se han descrito hasta la actualidad 24 enzimas capaces de transferir GalNAc a proteínas y se las designa con la sigla GalNAc seguida de la letra T y a continuación un número de isotipo (por ejemplo GalNAc T1, T2, etc.) (Fritz TA et al, 2004).

La gran cantidad de enzimas que constituyen esta familia de glicosiltransferasas sugiere que muchas de ellas en realidad son redundantes. Sin embargo al estudiar su estructura se destacan dominios de tipo lectina que les permiten reconocer la presencia de residuos GalNAc previamente transferidos a la secuencia peptídica, modificándose la afinidad por el sustrato (Kato K et al, 2001). De esta manera, el conjunto de ppGalNAc transferasas expresadas por una célula, actúa de manera coordinada logrando un número más o menos establecido de sitios de glicosilación en una secuencia peptídica determinada. Por otra parte, de esta manera se explica por qué no existe una secuencia peptídica consenso en las glicoproteínas para iniciar la O-glicosilación (Wandall HH et al, 1997).

El estudio de la relación entre estas glicosiltransferasas y el cáncer ha cobrado relevancia debido a que, al ser las primeras enzimas en actuar sobre un sustrato como es el centro proteico de las mucinas, pueden definir muchas de las características antigénicas de estas moléculas (Brokx RD et al, 2003).

Por otra parte, la transferencia de GalNAc a MUC1 muestra una competencia entre las ppGalNAc transferasas y otras enzimas como la *Core1* 1-3 Gal transferasa. Por ejemplo, la actividad de ppGalNAc T4 sólo puede darse sobre treoninas o serinas libres en un péptido

glicosilado previamente por T1 o T2 y su predominio sobre *Core1* α 1-3 Gal transferasa provoca una ocupación de la totalidad de los sitios de O-glicosilación, favoreciendo la sialilación temprana e impidiendo la elongación de las cadenas, tal como se observa en algunas líneas celulares de cáncer de mama (Stadie TR et al, 1995 y Bennet EP et al, 1998).

Core1 α 1-3 Gal transferasa

Contrariamente a lo que se observa respecto de otras glicosiltransferasas, se ha reconocido hasta el momento una sola enzima capaz de transferir residuos de galactosa a la posición 3 del residuo de GalNAc unido a proteína.

La actividad de *Core1* α 1-3 Gal transferasa (C1GT) fue inicialmente descrita por H Schachter y colegas (1971) en mucinas de las glándulas salivales de porcinos y bovinos. Muchos años después T Ju y colegas (2002) detallaron su secuencia genética al compararla con la secuencia hallada en la C1GT de rata; estos autores describieron que la actividad de C1GT se observa en numerosos tipos celulares o tejidos distintos y que se encuentra relacionada con fenómenos de diferenciación celular.

La C1GT constituye el segundo paso hacia la construcción de *Core2*, una de las principales estructuras observadas en las moléculas maduras de MUC1 y por lo tanto, necesaria para que se desarrollen el resto de las estructuras de las cadenas de carbohidratos. Por otra parte, el producto de su actividad, Gal α 1-3 GalNAc α 1 Ser/Thr, se denomina antígeno de Thomsen-Friedenreich o antígeno TF o simplemente antígeno T, el cual se halla asociado a diversos procesos neoplásicos.

Los antígenos Tn y T

Desde el punto de vista antigénico la unión de GalNAc a serina o treonina determina la aparición del epítipo Tn. Este antígeno fue caracterizado por R Moreau y colegas (1957) al estudiar la aglutinación de glóbulos rojos con suero humano independientemente del grupo sanguíneo que tuvieran. Los autores describieron dos grupos de pacientes, uno con expresión antigénica transitoria

secundaria a la actividad de enzimas bacterianas sobre eritrocitos envejecidos, y otro grupo donde la expresión era constante, acompañándose de leucopenia, trombocitopenia y anemia hemolítica. Más tarde, Sturgeon y colegas sugirieron que la aglutinación constante de eritrocitos mediada por el antígeno Tn se originaba en la ausencia de la enzima C1GT. De una u otra manera quedaba expuesto el antígeno Tn a expensas de la ausencia de la estructura *Core1*.

Por otra parte, el antígeno T se conocía desde 1927 cuando Oluf Thomson y su asistente Friedenreich describieron fenómenos de pan-aglutinación en eritrocitos humanos. Tiempo después W Dahr y colegas (1974) determinaron por hidrólisis enzimática la presencia de T y Tn asociados a mucinas y describieron su estructura.

La relación entre la expresión de los antígenos T/Tn y el desarrollo de un fenotipo neoplásico fue descrita hace más de treinta años por GF Springer y colegas (1975). Estos autores demostraron la correlación entre la expresión de estos antígenos y la agresividad tumoral, el estadio de desarrollo de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes. Los primeros estudios de la distribución de estos antígenos mostraron una amplia expresión en casi la totalidad de los tumores epiteliales y se sospechaba que dicha expresión debía poseer alguna relación con la capacidad de invasión y metástasis de los tumores (Springer GF y Tegtmeier H, 1983 y Springer GF, 1984). Por otra parte, en los pacientes portadores de tumores se podía constatar la existencia de una respuesta inmune inducida por el tumor contra el antígeno Tn (Springer GF et al, 1985).

La expresión de Tn en los tejidos normales se restringe a muy pocas localizaciones. Dependiendo del AcMo utilizado puede ser hallado en las glándulas corpo-fúndicas del estómago o en el epitelio del intestino delgado, limitado a la región supranuclear o del aparato de Golgi. También se lo ha hallado presente en los túbulos colectores renales, en las células espermatoocíticas y en el endometrio. En la piel puede expresarse en las capas basales o suprabasales (Cao Y et al, 1996).

El interés por establecer un marcador tumoral común a neoplasias epiteliales de distinto origen llevó a la obtención de numerosos AcMo dirigidos contra los antígenos T/Tn, utilizando diversos inmunógenos tales como glicopéptidos sintéticos (Longenecker BM et al, 1987), células tumorales de colon en cultivo (Numata Y et al, 1990), eritrocitos humanos (Springer GF et al, 1988), membrana plasmática de células tumorales de pulmón (Hiroashi S et al, 1985) o el antígeno purificado (Takahashi HK et al, 1988).

Estos AcMo han permitido el estudio de la expresión de los antígenos Tn y T en series importantes de pacientes, tanto en los tumores primarios como en el suero de los mismos. Los resultados más prometedores fueron hallados en el cáncer de mama, localización en la cual se ha determinado la utilidad de Tn como factor pronóstico (Wang BL et al, 1997 e Imai J et al, 2001), como marcador de lesión preneoplásica (Babino A et al, 2000) e incluso se ha evaluado su utilidad como agente terapéutico en la vacunación de pacientes portadoras de tumores invasores (Lo Man R et al, 2001). Con respecto al antígeno T, si bien es ampliamente expresado por los tumores de mama, no parece estar relacionado con la sobrevida de los pacientes.

Otras localizaciones tumorales en las cuales se ha podido establecer la utilidad de estos antígenos son ovario (Inoue M et al, 1990; Inoue M et al, 1991 y Kobayashi H et al 1991), cuello de útero (Hamada S et al, 1993), colon (Itzkowitz SH et al, 1989; Itzkowitz SH et al, 1992 y Dahiya R et al, 1992) y páncreas (Itzkowitz SH et al, 1991 y Osako M et al, 1993).

Core2 α 1-6 GlcNAc transferasas

La actividad de la *Core2* α 1-6 GlcNAc transferasa (C2GnT) y por lo tanto la conversión de la estructura *Core1* en *Core2* es un acontecimiento ampliamente estudiado. Las primeras investigaciones que lograron caracterizar la actividad C2GnT fueron llevadas a cabo por D Williams y H Schachter (1980) y la primera clonación de una de estas enzimas fue realizada por MF Bierhuizen y M Fukuda (1992) (*Core2* α 1-6 GlcNAc T-I) e inmediatamente se caracterizó toda una familia de enzimas de actividad similar y elevada homología. Dentro de esta familia se

destacaron dos enzimas, una presente abundantemente en los tejidos productores de mucinas (*Core2* α 1-6 GlcNAc T-II o “mucin-type”) y otra cuya expresión estaba restringida al timo (*Core2* α 1-6 GlcNAc T-III o “thymus-type”).

Las enzimas que transfieren N-acetilglucosamina en forma ramificada presentan diferencias en cuanto al sitio aceptor. *Core2* α 1-6 GlcNAc T-I y TIII generan exclusivamente la estructura *Core2*, mientras que IGlcNAcT y *Core2* α 1-6 GlcNAc T-II pueden generar estructuras de tipo *Core2*, *Core4* y ramificaciones en las cadenas extendidas de polilactosaminas.

La expresión de la estructura *Core2* posee gran importancia en fenómenos de diferenciación celular y en la clase de estructuras periféricas que se generan a partir de ella. El primer ejemplo de esta importancia se advirtió en el desarrollo y diferenciación de los linfocitos T, en los que se observaron cambios profundos en la actividad de síntesis de *Core2* asociado a la presencia o ausencia de *sialil Lewis x* como estructura terminal.

Core2 y neoplasia

Durante la transformación neoplásica se advierten profundos cambios en la glicosilación de MUC1 y la formación de *Core2* es un fenómeno de importancia al intentar una explicación de las modificaciones observadas. Las descripciones iniciales de las estructuras de carbohidratos presentes en MUC1 se obtuvieron a partir de la leche materna y mostraban diferencias en cuanto al largo de las cadenas al compararlas con las presentes en mucina de origen tumoral, estas últimas mucho más cortas (Hanisch FG et al, 1989). Al estudiar el comportamiento de líneas celulares tumorales se halló que estas modificaciones eran más profundas cuanto más indiferenciadas eran las células (Lloyd KO et al, 1996 y Dalziel M et al, 2001). Finalmente se estableció que las células tumorales expresan en abundancia la enzima galactosil α 2-3 sialil transferasa I (ST3Gal I) cuya distribución en el aparato de Golgi se superpone con la expresión de C2GnT1. Estas dos enzimas compiten por el mismo sustrato, fenómeno que permite explicar la presencia de cadenas sialiladas basadas en la

estructura *Core1* (Whitehouse C et al, 1997 y Dalziel M et al, 2001). Por lo tanto en las células tumorales se observaría un cambio de estructuras basadas en *Core2* a estructuras *Core1*, lo que expondría el corazón peptídico de MUC1.

Sin embargo, estudios realizados por S Müller y colegas (1999) pusieron en duda este modelo de glicosilación, y sobretodo, el origen del aumento de la antigenicidad del centro proteico de MUC1. A través de estudios de espectrometría de masa, Müller y colegas corroboraron en las mismas líneas celulares una disminución de la longitud de las cadenas de carbohidratos con un cambio de expresión de *Core2* por *Core1* en algunas de ellas, pero también determinaron un porcentaje de ocupación de los sitios de glicosilación superior al 90%. Los autores atribuyeron el aumento de la antigenicidad de MUC1 a una estabilización de la conformación de la secuencia DTR, como consecuencia de la glicosilación (Hanisch FG, 2000).

La antigenicidad de MUC1 depende entonces de diversos factores, entre los que encontramos el porcentaje de ocupación de los sitios de O-glicosilación, el largo de las cadenas de carbohidratos y la presencia de residuos de ácido siálico.

Cadenas de polilactosaminas

La elongación de las cadenas de O-glicanos sobre estructuras *Core2* se caracteriza por la adición alternante de residuos de Gal y de GalNAc (Rege VP et al, 1963). Este proceso da origen a dos tipos de cadenas diferentes según la posición a la que se unen los residuos: las cadenas tipo I poseen una estructura Gal β 1,3-GalNAc β 1,3 en tanto que las cadenas de tipo II poseen una estructura Gal β 1,4-GalNAc β 1,3. Las cadenas no ramificadas de unidades repetitivas de tipo II se denominan poli-N-acetilactosaminoglicanos, o más comúnmente polilactosaminas.

La síntesis de polilactosaminas se encuentra gobernada por la actividad de varias enzimas como la α 1-4 Gal transferasa (GT4) y la α 1-3 GlcNAc transferasa (GnT3). Además es frecuente encontrar la presencia de ramificaciones logradas por la adición de un residuo de GlcNAc en la

posición 6 de una Gal de la cadena. La actividad de la α 1-6 GlcNAc transferasa (GnT6) ha sido ampliamente estudiada ya que la presencia de ramificaciones es un acontecimiento asociado al desarrollo y la diferenciación celular.

Sialil transferasas y fucosil transferasas

Los residuos de ácido siálico, también llamado ácido N-acetilneuramínico (NeuNAc), representan junto con los residuos de fucosa (Fuc) las unidades terminales que se agregan a las cadenas de O-glicanos. El ácido siálico es un azúcar de nueve carbonos que presenta una carga neta negativa a pH fisiológico, en tanto que la fucosa es una hexosa de carga neutra. Su posición en las cadenas de O-glicanos y su característica carga negativa, en el caso del ácido siálico, les confieren un rol preponderante en las funciones de las mucinas (Tsuji S et al, 1996).

Las sialiltransferasas (ST) son las enzimas encargadas de la adición de residuos de NeuNAc y se denominan con la sigla ST seguida por el número del carbono y la sigla de la molécula aceptor y un número romano correspondiente al isotipo, por ejemplo ST3Gal-I (Harduin-Lepers A et al, 2001).

Las fucosiltransferasas (FucT) son un grupo de enzimas que transfieren residuos de fucosa a partir de GDP-fucosa hacia la posición α 2, 3, 4 o 6 de la molécula aceptor, por lo general otro carbohidrato en el interior o la periferia de las cadenas de oligosacáridos. Se las denomina con la sigla FucT seguida de un número romano que denota su isotipo. Al igual que las ST las FucT poseen un patrón de actividad complejo y una distribución tisular especializada, en ocasiones superponiéndose su actividad.

Sialiltransferasas y neoplasia

Las ST cumplen un papel de importancia en el proceso neoplásico como lo demuestran diversos trabajos. Los primeros indicios sobre esta relación surgieron cuando se determinó la existencia de una mayor expresión de ácido siálico en líneas celulares metastásicas en comparación

con las no metastásicas (Collard JG et al, 1986) y que estos niveles eran semejantes a los hallados en células embrionarias. Posteriormente se comprobó que los pacientes que presentaban niveles elevados de ácido siálico, expresado tanto a nivel tisular como sérico, poseían un peor pronóstico.

En primer lugar la presencia de ácido siálico previene la interacción célula-célula a través de un efecto no específico de repulsión de cargas; en segundo lugar puede enmascarar el reconocimiento de estructuras proteicas u otros carbohidratos a los cuales se une mediado por lectinas o anticuerpos; tercero, el ácido siálico puede ser reconocido a través de un mecanismo específico en el cual intervienen moléculas del grupo de las selectinas o de la familia de las siglec y por lo tanto favorece la adhesión celular; finalmente, la expresión de las ST se encuentra asociada a la alteración de diversas vías de la oncogénesis, como por ejemplo la activación de *ras* (Easton EW et al 1991).

Otro efecto importante de la actividad de las ST lo constituye la detención de la elongación de las cadenas de oligosacáridos observada en las células tumorales. Cuando el ácido siálico es agregado de forma anormal sobre las regiones del *Core* en crecimiento, debido a la expresión o localización aberrante de las glicosiltransferasas en el aparato de Golgi, se inhibe la actividad de las enzimas responsables de la extensión de las cadenas lo cual da lugar a la aparición de nuevos epitopes de suma importancia en el proceso neoplásico.

El antígeno sTn

La adición del ácido siálico a GalNAc provoca la aparición del epitope sTn y aún más relevante, la detención de la elongación de la cadena de carbohidratos. El antígeno fue descrito por D. Colcher y colegas (1981) y M Nuti y colegas (1982) cuando desarrollaron el AcMo B72.3 preparado contra células humanas metastásicas de cáncer de mama; sin embargo, este tipo de carbohidratos ya era conocido como un componente de la mucina ovina submaxilar (Hill HD et al, 1977).

La expresión de sTn en tejidos normales es escasa pero puede ser hallado en las criptas de las glándulas intestinales y en las células epiteliales de las gástricas. Además, puede ser detectado en las capas basales y para-basales de la mucosa de la vía aérea superior, la cavidad oral y el epitelio estratificado del cuello uterino (Ravn V y Dabelsteen E, 2000)

En las células tumorales, la síntesis de sTn depende en gran medida de la actividad de la ST6 GalNacT I y de su posición relativa en el aparato de Golgi para acceder a su sustrato, ya que otras enzimas, encargadas de la formación de las estructuras *Core1* y *2* y la elongación de las cadenas, compiten con ella. En el cáncer de mama las enzimas encargadas de la síntesis de *Core2* se encuentran disminuidas y por lo tanto se acumulan formas sialiladas de los antígenos T y Tn (Whitehouse C et al, 1997).

El valor predictivo de sTn ha sido evaluado en numerosos trabajos y se ha determinado su utilidad como factor pronóstico en el cáncer de mama, especialmente en el corto plazo (Kinney AY et al 1997 y Leivonen M et al, 2001) y en carcinoma de estómago (Terashima S et al, 1998). Sin embargo, en pacientes portadores de tumores de colon su utilidad ha sido cuestionada (Nakagoe T et al, 2001 y Lundin M et al, 1999).

La evidencia acumulada a favor de la utilidad como factor pronóstico de sTn permitió el desarrollo de diversos protocolos de inmunización con un epítotope sintético, empleado con éxito en la vacunación de pacientes con tumores de mama y de ovario (Sandmaier BM et al, 1999 y Miles D y Papazisis K, 2003).

A pesar de las numerosas investigaciones realizadas en torno a la utilidad de sTn como marcador diagnóstico, pronóstico y como vacuna contra el cáncer, su rol biológico aún no ha sido completamente aclarado.

Los antígenos del grupo sanguíneo Lewis

Estos antígenos representan variaciones fucosiladas de los precursores de los antígenos del grupo sanguíneo ABO. Las enzimas que intervienen en su síntesis son fucosiltransferasas y sialiltransferasas, las cuales utilizan como sustrato cadenas de polilactosaminas tanto de tipo I como de tipo II. Las formas más simples presentan un solo residuo de fucosa y se denominan *Lewis a* y *Lewis x*, formados a partir de cadenas de tipo I y II, respectivamente. Las formas más complejas presentan dos residuos de fucosa y comparten un intermediario en la síntesis de los epitopes del grupo ABO, el antígeno H (es decir, la ausencia de epitope A y B). En la síntesis intervienen en primera instancia las α 1-2 fucosiltransferasas (FucT I o II) formando el antígeno H, tanto sobre cadenas de tipo 1 como 2. Luego, actúan las α 1-3/4 fucosiltransferasas (FucT III a VII) que determinan la aparición de los epitopes *Lewis b* y *Lewis y*, sobre cadenas de tipo 1 o 2 respectivamente.

Los antígenos del grupo Lewis fueron descritos por AE Mourant (1946) quien sospechó que el locus del gen asociado a su expresión representaba una glicosiltransferasa (Mourant AE, 1946). Si bien los antígenos del grupo Lewis fueron hallados en los eritrocitos, estos no se sintetizan en estas células, sino que son adsorbidos a partir de las lipoproteínas plasmáticas, siendo la principal fuente de antígenos del grupo Lewis las células del epitelio exocrino del tubo digestivo.

Los antígenos del grupo Lewis asociados a mucinas fueron estudiados intensamente por KO Lloyd y colegas (1966) quienes lograron aislar “sustancias de grupo sanguíneo” a partir de las mucinas presentes en tumores quísticos de ovario.

Lewis y

Lewis y es un tetrasacárido cuya estructura es Fuc α 1-2 Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc-R, el cual puede ser hallado en las células epiteliales del tubo aerodigestivo y genitourinario pero también en granulocitos de sangre periférica (Muroi K et al, 1992 y Kitamura K et al, 1994). Es considerado como un antígeno oncofetal, ya que se expresa durante el primer y segundo mes del desarrollo embrionario

Se encuentra sobreexpresado en la mayoría de los carcinomas humanos incluyendo mama, colon, ovario, páncreas, próstata y pulmón, en los cuales se asocia tanto a glicolípidos como glicoproteínas de la superficie celular. Su función se relaciona con fenómenos de adhesión y reconocimiento celular, de acuerdo con los hallazgos del desarrollo embrionario; también es posible que module la función de otras glicoproteínas de la membrana plasmática como por ejemplo el receptor ErbB, un receptor del factor de crecimiento epitelial (Klinger M et al, 2004). Por otra parte, se ha descrito una asociación entre la expresión de *Lewis y* y la presencia de apoptosis en distintas poblaciones de células tumorales (Hiraishi K et al, 1993; Yamada T et al, 1996 y Azuma Y et al, 2004).

El análisis de la expresión de *Lewis y* en diversas series de pacientes ha arrojado resultados contradictorios. Por una parte, se ha informado una relación entre la expresión elevada de *Lewis y*, la presencia de invasión vascular y una menor sobrevida en el post operatorio de pacientes con cáncer de pulmón (Ogawa J et al, 1995); por otra parte, Tanaka y colegas hallaron una asociación entre la expresión elevada de *Lewis y*, la presencia de grados moderados y elevados de diferenciación celular y una mejor sobrevida a los cinco años (Tanaka F et al, 1998).

Lewis x

Lewis x es un trisacárido cuya estructura es Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc-R. Inicialmente fue descrito como un antígeno asociado a una etapa particular del desarrollo embrionario (SSEA-1) en mamíferos y expresándose en el ser humano en ciertas etapas de la morfogénesis del mesonefros, en tanto que en el adulto se limita a las superficies epiteliales del tubo aerodigestivo.

Lewis x se encuentra sobreexpresado en diversos tumores epiteliales pero a niveles inferiores a los descritos para *Lewis y* o *sialil Lewis x*. Su acumulación resulta de la ausencia o disminución de la actividad de las enzimas productoras de los antígenos ABO y de un aumento de la actividad de las fucosiltransferasas, aunque gran parte del *Lewis x* puede ser transformado a su

vez en *Lewis y*. La expresión de *Lewis x* ha sido especialmente estudiada en tumores de próstata y vejiga, en donde se observó una importante utilidad clínica (Pode D et al, 1998).

Sialil Lewis x

Sialil Lewis x es un tetrasacárido cuya estructura es NeuNAc α 2-3 Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc-R y que ocupa las regiones terminales de muchos O-Glicanos. La primera descripción de este antígeno se realizó en gangliósidos obtenidos a partir de células epiteliales renales del túbulo contorneado proximal y la rama descendente del asa de Henle (Rauvala H, 1976). Más tarde, el primer AcMo dirigido contra *sialil Lewis x* (CSLEX1) fue establecido por Fukushima y colegas al inmunizar ratones con extractos de proteínas de membranas de un adenocarcinoma de estómago y observaron una distribución en tejidos normales similar a *Lewis x* (Fukushima K et al, 1984).

Si bien la descripción de *sialil Lewis x* se ajustaba bien a las observaciones previas que indicaban una relación entre las alteraciones de las membranas celulares y el proceso neoplásico y que estas alteraciones modificaban la capacidad adhesiva de las células, no se conocían los mecanismos que subyacían a estos fenómenos. La descripción de un grupo de moléculas de adhesión denominadas selectinas y la clonación de las glicosiltransferasas responsables de la síntesis de *sialil Lewis x* permitió el establecimiento de una explicación racional de la asociación con el cáncer (Gillespie W et al, 1992 y Wen DX et al, 1992).

En el año 1990 distintos grupos hallaron que una molécula de la superficie celular denominada ELAM-1 permitía la adhesión de leucocitos (Lowe JB et al, 1990) o células tumorales (Phillips ML et al, 1990) a células del endotelio vascular. Actualmente ELAM-1 pertenece a una familia de moléculas de adhesión denominadas Selectinas, las cuales son un factor importante en el control de la metástasis hematogena de los tumores ya que pueden ser producidas tanto por las células tumorales como por las células endoteliales blanco de la metástasis.

Posteriormente A Takada y colegas (1993) demostraron experimentalmente que diversas líneas de células tumorales se adhieren específicamente a cultivos de células endoteliales de vena umbilical empleando *sialil Lewis x*.

La expresión de *sialil Lewis x* se origina a partir de dos mecanismos. El primero de ellos es ocasionado por la síntesis incompleta de las moléculas que utilizan a *sialil Lewis x* como precursor, fenómeno que es de aparición temprana en el proceso neoplásico. Por ejemplo, la falta de actividad de la enzima sialil 6-sulfotransferasa en tumores de colon provoca la acumulación de *sialil Lewis x* (Camerini V et al, 1993 y Izawa M et al, 2000).

El otro mecanismo involucra el aumento de la expresión de las enzimas y de la disponibilidad de los sustratos en un fenómeno denominado *neosíntesis* por S Hakomori (2001). El antígeno *sialil Lewis x* se completa primero por acción de una sialiltransferasa seguido de la transferencia de un residuo de fucosa, siendo la estructura aceptora Gal β 1-4GalNAc, es decir una cadena de tipo II o polilactosamina. Mientras que el *sialil Lewis a* (un isómero de *sialil Lewis x*) es sintetizado exclusivamente por la Fucosiltransferasa III (FucT III), en la síntesis de *sialil Lewis x* pueden intervenir FT III, IV, VI y VII lo que complica la comprensión del fenómeno.

De las FucT involucradas en la síntesis de *sialil Lewis x* sólo algunas presentarían actividad en células epiteliales, ya que la administración in vitro de DNA antisentido para FucT III y VI en células tumorales de colon provoca la desaparición de *sialil Lewis x* y disminuye su capacidad para adherirse a células endoteliales y establecer metástasis a distancia (Weston BW et al, 1999). Sin embargo no se ha podido establecer una correlación entre los niveles de RNA mensajero de estas enzimas y la expresión de *sialil Lewis x*. Otra glicosiltransferasa, FucT VII se encuentra elevada en algunos tipos de leucemias y algunos trabajos sugieren que es responsable de la síntesis de *sialil Lewis x* en tumores epiteliales (Martín-Saute M et al, 1999).

Transporte y expresión en membrana

Como hemos mencionado, MUC1 es una molécula de transmembrana de Clase I la cual posee un dominio extracelular largo, un dominio de transmembrana y una cola citoplasmática (en inglés *Cytoplasmic Tail* o CT); MUC1 es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y ampliamente glicosilada en el aparato de Golgi. El análisis *in vitro* de la cinética de expresión de MUC1 demuestra que la síntesis y transporte de la molécula desde el RER hacia el aparato de Golgi toma aproximadamente 30 minutos, en tanto que la glicosilación y expresión en la membrana plasmática toma aproximadamente unas dos horas (Kinlough CL et al, 2004).

En los epitelios simples la expresión de MUC1 se encuentra polarizada hacia la región apical cubriendo la superficie celular desde las zonas de adhesión firme o *zonula occludens*. Sin embargo, en varios epitelios se ha descrito la recirculación de la molécula desde la superficie celular hacia el aparato de Golgi y nuevamente a la superficie celular (Litvinov SV y Hilkens J, 1993).

Aparentemente, durante el primer paso por el aparato de Golgi no se produce una glicosilación completa de MUC1, la cual es finalizada luego de varios ciclos de recirculación en los que se agregan principalmente azúcares terminales de las cadenas de carbohidratos, tales como fucosa o ácido siálico. Se desconoce que sucede con las distintas variantes de *splicing* de MUC1; si tomamos en cuenta que la variante SEC no posee el dominio de transmembrana y la CT, resulta en consecuencia que esta molécula puede ser directamente liberada a la luz glandular o al torrente sanguíneo (como sucede en las células tumorales que pierden la polaridad). Sin embargo, se ha establecido que MUC1/SEC puede unirse a las variantes carentes del dominio extracelular como MUC1/Z o X. (Julian J y Carson DD, 2002)

Función de MUC1 y relación con el cáncer

Si bien tradicionalmente se le ha asignado a las mucinas un papel protector en los epitelios, actualmente se sabe que MUC1 cumple, además, una función integradora de numerosas señales

extracelulares (Wreschner DH, 1994). La estructura del dominio extracelular de MUC1, el cual se extiende cientos de Å por sobre el resto de los componentes del glicocálix y se encuentra en contacto con la barrera viscoelástica de mucinas formadoras de geles tales como MUC2, MUC5AC, MUC5B o MUC6, permitiría a la molécula detectar cambios en las propiedades físico-químicas del medio extracelular entre las que se podría incluir a variaciones de pH o de osmolaridad. Además la disociación directa del heterodímero de MUC1 (recordemos que la molécula presentaba un corte autocatalítico y re-unión no covalente) también induciría cambios en la conformación del resto de la molécula, afectando el estado de fosforilación de su CT (Gendler SJ, 2001).

Los fenómenos relacionados con la fosforilación de la CT de MUC1 resultan entonces fundamentales para evaluar adecuadamente el rol fisiológico y en el proceso neoplásico de esta mucina.

La CT de MUC1 se halla muy conservada desde el punto de vista filogenético, presentando por ejemplo una elevada homología con la CT de la mucina 1 del ratón (cuyo gen y producto se denominan *muc1*) resultado de la importancia de la secuencia peptídica y la existencia de funciones de relevancia. Según H Wang y colegas (2004), al comparar la CT de MUC1 con otros dominios citoplasmáticos de proteínas de clase I se observa una semejanza con los receptores de citoquinas, con la diferencia de que no se ha descrito en MUC1 la formación de dímeros en respuesta a la unión de ligandos.

S Zrihan-Licht y colegas (1994) fueron los primeros en describir la existencia de fosforilación en la CT de MUC1 y especularon que la molécula se comportaría como un traductor de señales. Tiempo más tarde determinaron la existencia de las variantes de *splicing* carentes de repeticiones en tandem y sugirieron que ese tipo de moléculas constituían una variedad particular de receptor, cuyo ligando era la propia MUC1. Posteriormente, P Pandey y colegas (1995) determinaron los sitios de fosforilación activos de MUC1 y qué moléculas eran capaces de reconocerlos.

Una de las consecuencias de la fosforilación de MUC1 es la unión de la CT a β -catenina, lo que sucede tanto en epitelios normales, donde se encuentran co-localizadas en las uniones adherentes, como en tejidos neoplásicos. Normalmente la β -catenina se asocia a la porción intracitoplasmática de E-cadherina y estabiliza las uniones homofílicas entre las células epiteliales vecinas. En los tumores donde se halla una sobre-expresión de MUC1, es posible observar un secuestro de β -catenina, lo que contribuye a la pérdida de adhesión de las células tumorales.

Y Li y colegas (2001) demostraron que la unión de β -catenina a la CT de MUC1 depende de la fosforilación producida por la quinasa C-src o por los receptores con actividad de quinasa C-erbB. Por otra parte, la interacción con los receptores del EGF con la CT estimula la proliferación celular.

Estos hallazgos permiten suponer una función integradora de MUC1 entre las señales de diferenciación celular (interacción célula-célula) y de proliferación celular (inducida por ligandos del EGFR).

MUC1 también puede ser expresada en la superficie de distintas células del sistema inmune, en las cuales cumpliría un rol más crítico del que cumple en los epitelios. La producción de ratones deficientes de la mucina 1 murina no produce alteraciones morfológicas o fisiológicas sobre los epitelios pero induce la ausencia de proliferación de los LT en respuesta a la activación del TCR, impide la maduración de los timocitos a LT doble positivos, así como diversas alteraciones en la función de células NK y dendríticas. Si bien los mecanismos involucrados en la señalización son distintos de los observados en las células epiteliales y no están del todo aclarados, en los linfocitos T se ha demostrado la interacción de la CT con quinasas activadas luego del reconocimiento antigénico, tales como PI3K, lck y ZAP70 (Gendler SJ, 2001).

Actualmente se han descrito nuevas funciones de la CT de MUC1, la cual ha sido hallada en el núcleo celular y en las mitocondrias. Al respecto Wei y colegas demostraron la interacción entre

la cola citoplasmática de MUC1 y p53 en los elementos de respuesta de este último, localizados en el promotor de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (Wei X et al, 2005).

MUC1 y respuesta inmune

Respuesta Inmune Humoral

A Rughetti y colegas (1993) fueron los primeros en demostrar la existencia de una respuesta inmune humoral al estudiar los linfocitos de ganglios de pacientes con cáncer de ovario. Al mismo tiempo Y Kotera y colegas (1994) describían en pacientes portadores de tumores de páncreas la existencia de una respuesta inmune humoral dirigida contra péptidos no glicosilados de MUC1, conformada principalmente por anticuerpos de tipo IgM cuyos niveles no pudieron ser correlacionados con el estadio de la enfermedad. De manera similar, una respuesta inmune humoral anti-MUC1 ha podido ser establecida en pacientes con cáncer de mama y colon, entre otros. Por otra parte, la existencia de anticuerpos dirigidos contra la región en tandem de MUC1 había sido descrita previamente en enfermedades benignas como la colitis ulcerosa (Hinoda Y et al, 1993).

Los anticuerpos producidos por los linfocitos B (LB) humanos reconocen regiones distintas de las que reconoce el sistema inmune murino cuando se realiza el desafío inmunológico para la obtención de anticuerpos monoclonales. Estos últimos reconocen principalmente una región peptídica cuya secuencia es PDTR, la cual posee una configuración particular no sólo por la secuencia en sí, sino también por la presencia de un residuo de GalNAc unido a la treonina. La presencia de glicosilación, hasta cierto punto, es responsable de la estabilización del epítopo y por lo tanto necesaria para el reconocimiento por parte de estos anticuerpos (Kinarsky L et al, 2003). Es interesante señalar que las secuencias alteradas que flanquean a las repeticiones en tandem poseen mayor flexibilidad y se encuentran glicosiladas en menor grado, generando toda una gama diferente de anticuerpos anti-MUC1 (von Mensdorff-Pouilly S et al, 2005).

Los anticuerpos humanos reconocen más frecuentemente la región RPAP y también reaccionan más fuertemente con los péptidos unidos a GalNAc que ante péptidos desnudos. Los anticuerpos libres se han asociado a una mayor supervivencia de las pacientes con cáncer de mama probablemente por la capacidad de evitar el establecimiento de metástasis. También ha sido demostrada la existencia de complejos inmunes circulantes (CIC) con MUC1, los cuales poseen una relación inversa con la progresión de los tumores

MV Croce y colegas (1995) junto MM Gouretvich y colegas (1995) fueron los primeros en determinar la presencia de MUC1 en los CIC de pacientes con cáncer de mama. Posteriormente evaluaron la respuesta inmune humoral anti-MUC1 en mujeres sanas, analizando el efecto que el embarazo y la lactancia producían en ella. En las mujeres multíparas se observa un aumento de MUC1 sérica y pueden ser demostrados tanto anticuerpos naturales como activación de linfocitos T. Aparentemente durante el embarazo se produce una inmunización natural originada en la presencia de MUC1 pobremente glicosilada, resultado del efecto proliferativo de los estrógenos. De esta manera se puede explicar en parte el efecto protector del embarazo sobre el cáncer de mama, siendo el efecto de la lactancia diferente (Croce MV et al, 2001).

Respuesta Inmune Celular

Los primeros resultados publicados en relación con la existencia de una respuesta inmune celular anti-MUC1 tuvieron lugar al mismo tiempo en que lograba clonar y secuenciar el gen de MUC1. A través de estos primeros trabajos resultó evidente que el sistema inmune era capaz de establecer una respuesta celular débil y preponderantemente mediada por linfocitos T citotóxicos (CTL, del inglés *Citotoxic T Lymphocyte*) frente a la presencia de la mucina sérica derivada de los tumores (Barnd DL et al, 1989 y Magarian-Blander J et al, 1993).

Una de las características más relevantes de la respuesta inmune anti-MUC1 mediada por CTL es la ausencia de restricción por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), es decir, la

existencia de un mecanismo de activación linfocitario en el cual no es necesaria la presentación de un segmento procesado del antígeno en el contexto del reconocimiento por MHC – receptor de células T (TCR). Este mecanismo se origina en la presencia de una estructura repetitiva en la porción extracelular de MUC1, capaz de ser reconocida por los TCR, lo que induce su entrecruzamiento y finalmente activa al CTL. Por otra parte, KR Jerome y colegas (1991) demostraron que la administración de un anticuerpo dirigido contra el centro proteico de MUC1 inhibía la activación de los CTL, confirmando la especificidad de la reacción.

Si bien éste no es el mecanismo tradicionalmente descrito para la activación de los CTL, solo difiere en los pasos iniciales de reconocimiento, siendo el resto de los fenómenos resultantes idénticos (Magarian-Blander J et al, 1998). Finalmente, la activación irrestricta de MHC mediada por MUC1 generaría un fenómeno de escape tumoral dado que la presencia de cantidades abundantes de MUC1 circulante podría unirse a los CTL circulantes evitando el reconocimiento y destrucción de las células neoplásicas.

Por otra parte, EM Hiltbold y colegas (1998) demostraron la existencia de LT CD4+ específicos para MUC1 luego de estimular linfocitos naive (que no han sido previamente activados por antígenos) con un péptido que contenía 5 repeticiones en tandem presentado por DC. Estos linfocitos demostraron una actividad citolítica moderada y la producción de cantidades apreciables de INF- γ .

Posteriormente, estos mismos autores establecieron que distintos péptidos pertenecientes a la región de repeticiones en tandem podían ser reconocidas en el contexto tanto de MHC de clase I como de clase II, induciendo principalmente la activación de CTL y escasa respuesta LT CD4+. La presencia de glicosilación sobre los péptidos disminuye el procesamiento antigénico de las DC y por lo tanto afecta la presentación en el contexto del MHC de clase II (Hiltbold EM et al, 1999).

Si bien la mayor atención ha sido dispuesta sobre la región de repeticiones en tandem de MUC1, otros investigadores determinaron que una región próxima a la secuencia líder de MUC1 era capaz de generar una respuesta inmune celular y fue utilizada para generar CTL específicos anti MUC1 restringidos por MHC (Brossart P et al, 1999).

El origen de una respuesta deficitaria por parte de los LT CD4+ se hallaría en un bloqueo del procesamiento antigénico en células presentadoras de antígenos. Se ha demostrado que las DC captan la mucina glicosilada circulante a través de un mecanismo mediado por receptores de manosa, los cuales reconocen residuos fucosilados en la periferia de las cadenas de carbohidratos de MUC1. Luego de la formación de los endosomas tempranos, la transformación en endosomas tardíos se acompaña de la liberación de las moléculas unidas a los receptores de manosa, sin embargo, la gran cantidad de epitopes expresados por cada molécula dificulta la disociación y MUC1 no sufre las modificaciones posteriores necesarias para su presentación en el contexto del MHC (Hiltbold EM et al, 2000). Si las DC son expuestas a péptidos sintéticos de MUC1 no glicosilados, estos son captados por pinocitosis, y por lo tanto pueden ser presentados en el contexto de MHC y producir la activación de los LT CD4+.

Otros autores han podido corroborar estas afirmaciones, sin embargo en un modelo de hibridoma murino fue posible observar la presentación de péptidos de MUC1 glicosilados en el contexto del MHC de clase II los cuales fueron reconocidos por LT CD4+, este fenómeno amplía el repertorio de epitopes derivados de MUC1 capaces de iniciar una respuesta inmune celular (Vlad AM et al, 2002).

Inmunoterapia y MUC1

El estudio de los aspectos inmunológicos de MUC1 y su importante relación con el fenómeno neoplásico han abierto una serie de posibilidades terapéuticas para distintos tipos de tumores.

Los métodos desarrollados para la inmunoterapia dirigida contra MUC1 se han basado en diversas aproximaciones entre las que se destacan: la utilización de anticuerpos radio-marcados dirigidos contra la región de repeticiones en tandem (Gold DV et al, 1997 y Cardillo TM et al, 2002); la utilización de quimeras de anticuerpos anti-MUC1 con IL-2 para lograr la activación de las células NK (Heuser C et al, 2003); la utilización de péptidos o ADN aplicados directamente o a través de células presentadoras de antígenos para inducir tanto una respuesta inmune celular mediada por CTL (Graham RA et al, 1996; Guan HH et al, 1998 y Johnen H et al, 2001), como la producción de anticuerpos para promover la citotoxicidad mediada por anticuerpos (Snijdewint FG et al, 2001).

Si bien se han informado algunos resultados verdaderamente promisorios, la mayoría de estas investigaciones continúan hoy en día y se aguardan futuros progresos.

TUMORES DE CABEZA Y CUELLO

Los “tumores de cabeza y cuello” son un conjunto de lesiones neoplásicas pertenecientes al tracto aerodigestivo superior. Esta región anatómica, que se extiende desde la base del cráneo hasta un plano que se apoya en el borde superior de la sexta vértebra cervical contiene órganos encargados de funciones primordiales como son la respiración, la masticación y deglución y el habla. La frase “tumores de cabeza y cuello” empleada en las publicaciones a nivel universal hace referencia a un grupo heterogéneo de lesiones benignas y malignas entre las cuales el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC) representa la mayoría de las lesiones malignas. En este trabajo de tesis se hará referencia a este tipo de neoplasia y no a las originadas en las glándulas salivales u otras de distinta estirpe.

El CECC se origina en la transformación neoplásica del epitelio que recubre el tracto aerodigestivo superior, el cual es de tipo plano estratificado con queratinización en las áreas de mayor daño mecánico como las encías, el paladar duro y el dorso de la lengua; en tanto que, en otras áreas expuestas a actividad mecánica menos intensa, el epitelio es plano estratificado sin queratinización como es el caso de las mejillas, la base de la lengua y el piso de la boca, el paladar blando en su superficie oral, la mitad superior de la epiglotis, la superficie de las cuerdas vocales y los cartílagos aritenoides. El resto de la laringe y casi la totalidad de la faringe se encuentran cubiertas por epitelio cilíndrico simple ciliado seudoestratificado.

Según la Clasificación Internacional de Enfermedades Oncológicas (ICD-10)² los tumores de cabeza y cuello poseen tres localizaciones anatómicas principales: la cavidad oral, la faringe y la laringe, las cuales a su vez poseen distintas sublocalizaciones (Tabla 2); estas mismas localizaciones se utilizan para la estadificación de los tumores.

² <http://www.who.int/classifications/icd/en/>

Tabla 2: Sitios anatómicos en el CECC según la clasificación internacional de las enfermedades (ICD) de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Sitio Anatómico	ICD-10
Cavidad Oral	C00-C06
Labio	C00
Base de Lengua	C01
Otras partes de la lengua	C02
Encías	C03
Piso de la boca	C04
Paladar	C05
Otras partes no especificadas	C06
Faringe	C10-C13
Orofaringe	C10
Nasofaringe	C11
Seno Piriforme	C12
Hipofaringe	C13
Otros partes no especificadas de la cavidad oral y faringe	C14
Senos accesorios	C31
Laringe	C32
Glottis	C32.0
Supraglottis	C32.1
Subglottis	C32.2

Epidemiología

Incidencia, prevalencia y mortalidad

En la República Argentina, durante el año 2002, las tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad informadas de tumores de la cavidad oral, faringe y laringe pueden observarse en las tablas 3, 4 y 5. Del análisis de estos datos se desprende un predominio de los tumores de cabeza y cuello en la población masculina la cual acumula más del 85% de la incidencia, siendo esta

distribución atribuible al predominio de los factores de riesgo en la población masculina. En la población femenina se observa un predominio de los tumores de cavidad oral, en tanto que la población masculina posee porcentajes elevados de tumores localizados tanto en la cavidad oral como en la laringe, estas diferencias en la localización de los tumores también se relacionan con el predominio del tabaquismo y el alcoholismo entre los hombres y rara vez pueden observarse tumores de hipofaringe o laringe en pacientes no fumadores.

La edad promedio de presentación del CECC es de 60 años, sin embargo existen variaciones que nuevamente se relacionan con el hábito de fumar. Pacientes no fumadores desarrollan CECC a edades relativamente más tempranas o tardías.

La mortalidad por CECC al año de diagnosticada la enfermedad y a los cinco años no se ha modificado sustancialmente, a pesar de los profundos cambios aplicados a los protocolos de diagnóstico y tratamiento. Sin embargo, se ha logrado una reducción importante de la morbilidad asociada al tratamiento quirúrgico al imponerse tratamientos radioquimioterapéuticos de primera línea a fin de preservar órganos como la laringe.

Tabla 3: Tasa de incidencia de mortalidad y prevalencia del CECC en mujeres de la Argentina, discriminada según las tres localizaciones principales de la ICD

<i>Mujeres</i> Sitio Anatómico	<i>Incidencia</i>			<i>Mortalidad</i>			<i>Prevalencia</i>		
	Casos	Tasa Cruda	Tasa Ajustada	Casos	Tasa Cruda	Tasa Ajustada	1-año	5-años	ICD-10
Cavidad Oral	324	1.7	1.3	142	0.7	0.6	234	790	C00-C06
Faringe	88	0.4	0.4	57	0.3	0.3	60	178	C09-C14
Laringe	92	0.5	0.4	97	0.5	0.4	68	213	C32
Total	504	2.6	2.1	296	1.5	1.3	362	1181	

Casos cada 100.000 habitantes, ajustado según la edad

Fuente: International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2002, <http://www-dep.iarc.fr/>

Tabla 4: Tasa de incidencia mortalidad y prevalencia del CECC en hombres de la Argentina, discriminada según las tres localizaciones principales de la ICD

<i>Hombres</i>	<i>Incidencia</i>			<i>Mortalidad</i>			<i>Prevalencia</i>		
	Casos	Tasa Cruda	Tasa Ajustada	Casos	Tasa Cruda	Tasa Ajustada	1-año	5-años	ICD-10
Cavidad Oral	1035	5.6	5.4	411	2.2	2.1	749	2524	C00-C06
Faringe	427	2.3	2.3	225	1.2	1.2	271	782	C09-C14
Laringe	1665	9.0	8.8	911	4.9	4.7	1181	3627	C32
Total	3127	16.9	16.5	1547	8.3	8	2201	6933	

Casos cada 100.000 habitantes, ajustado según la edad

Fuente: International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2002, <http://www-dep.iarc.fr/>

Tabla 5: Tasa de incidencia de CECC en la Argentina en ambos sexos, discriminada según las tres localizaciones principales de la ICD

<i>Sitio Anatómico</i>	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>
Cavidad Oral	8.38	2.51
Faringe	3.66	0.77
Laringe	11.45	1.16
Total	23.49	4.44

Casos cada 100.000 habitantes, ajustado según la edad

Fuente: International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2002, <http://www-dep.iarc.fr/>

Factores de Riesgo

Una abrumadora evidencia epidemiológica plantea la existencia de factores de riesgo que, en forma individual o asociada, incrementan la probabilidad de CECC; estos factores se relacionan con aspectos del comportamiento del individuo, su estilo de vida o el estrato social al que pertenece.

Tabaco y Alcohol

El consumo de tabaco y alcohol representan las principales causas previsibles de muerte por cáncer en el mundo moderno y durante el siglo pasado se ha acumulado gran cantidad de evidencia epidemiológica que sustenta esta afirmación. Trabajos realizados en la Unión Europea a partir de

grandes series de individuos determinaron que el 60% de los casos de cáncer de cavidad oral en la población de sexo masculino y un 30% entre las personas del sexo femenino pueden ser atribuidos al consumo de tabaco. Por otra parte, el consumo de tabaco combinado con alcohol genera incrementos de hasta 15 veces el riesgo observado en la población general. En otras partes del mundo, como la India y en los países del sudeste asiático, otras formas de consumo del tabaco o sustancias como el betel configuran un factor de riesgo tan importante como el hábito de fumar.

Estudios prospectivos a gran escala en individuos fumadores mayores de 35 años revelaron que el riesgo relativo de muerte debido a cáncer de cavidad oral y de faringe se incrementa 25,7 veces, en tanto que el incremento relacionado con el cáncer de laringe es de 10,5 veces.³

Estos datos epidemiológicos han ganado sustento en hallazgos recientes que relacionan en forma directa la exposición crónica a los agentes carcinogénicos del tabaco con el desarrollo de neoplasia en la mucosa de la cavidad oral, faringe y laringe. El antioncogen p53 ha generado especial interés debido a que es posible encontrar mutaciones puntuales de este gen en la mitad de los casos de CECC y a que los patrones de las mutaciones hallados se encuentran fuertemente relacionados con el consumo de tabaco (Brennan JA et al, 1995).

Otros hábitos personales

Otros factores de importancia son el estado de las piezas dentarias y las deficiencias o desequilibrios en la dieta. Existen trabajos que han descrito una correlación positiva entre el número de piezas dentarias en mal estado y la incidencia de CE de cavidad oral (Döbrossy L, 2005).

La infección por el virus del papiloma humano (HPV) pareciera estar relacionada con algunos de los casos de CE de la cavidad oral y de la orofaringe. La detección del DNA del HPV alcanza al 20% de la población estudiada, y en la mayoría de los casos es posible hallar el serotipo 16, una situación similar a la observada en el carcinoma de cervix uterino (Gillison ML et al, 2000).

³ http://www.cdc.gov/tobacco/sgr/sgr_1989/index.htm

El virus de Epstein-Barr (EBV) ha sido asociado a la presencia de carcinoma nasofaríngeo y su genoma pudo ser identificado en el plasma de numerosos pacientes, lográndose incluso establecer una correlación entre la carga viral y el estadio del desarrollo de la enfermedad (Chien YC et al, 2001 y Capone RB et al, 2000).

Factores hereditarios

La existencia de factores hereditarios que predispongan a la aparición de CECC en parientes de individuos portadores de la neoplasia ha sido pobremente estudiada. Una investigación reciente realizada en Brasil determinó que el riesgo relativo de CECC en esta población, teniendo en cuenta la presencia de hábitos tabáquico y alcohólico, fue de 3,65 veces; otro estudio similar desarrollado en Canadá demostró un riesgo relativo de 3,79 veces (Foulkes WD et al, 1995 y Foulkes WD et al, 1996).

Estadificación en el CECC

En el CECC la correcta estadificación del paciente continúa siendo la mejor manera de establecer el pronóstico de la enfermedad y la principal herramienta para lograr una acertada decisión terapéutica. En este trabajo de Tesis se empleará la estadificación propuesta por la sexta edición del “Manual de la Estadificación del Cáncer” de la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC Cancer Staging Manual, 2002), la cual se encuentra basada en el sistema TNM y se expone en la Tabla 6.

La estadificación propuesta por la AJCC integra los parámetros T, N y M en el parámetro E, el cual se dividió en cinco grupos I, II, III, IVA y IVB, en un intento de simplificar la aplicación del sistema TNM. Esta agrupación se realiza teniendo siempre en cuenta la utilidad pronóstica en relación con la sobrevida del paciente. Otros sistemas de agrupación utilizados con relativa frecuencia en el CECC es el Puntaje Integrado de T y N (en inglés *T and N Integrated Score* o

TANIS), este sistema de estadificación asume la equivalencia de los parámetros T y N aceptando que ambos poseen la misma importancia para la supervivencia del paciente.

Los criterios clínicos empleados para establecer el parámetro T dependen en gran medida del sitio en el cual asienta la neoplasia; por ejemplo, en un tumor localizado en la orofaringe es primordial el diámetro tumoral, en tanto que en un tumor laríngeo la afectación de la movilidad de las cuerdas vocales es de mayor relevancia que su tamaño. La determinación del parámetro N es homogénea para todas las localizaciones del CECC.

Tabla 6: Estadificación TNM del CECC según el manual de estadificación de la American Joint Cancer Committee

AJCC 6ta EDICION			
Tumores localizados en labio, cavidad oral, faringe y laringe			
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estadio IV-A	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
Estadio IV-B	T4a	N2	M0
	T4b	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	M0
Estadio IV-C	Cualquier T	Cualquier N	M1

AJCC Cancer Staging Manual, 2002

Biología tumoral

El CECC tiene su origen en una serie acumulativa de alteraciones genéticas en las células epiteliales en división, las cuales eventualmente las trasladan a las células hijas. El consumo de tabaco es la principal fuente de carcinógenos, los cuales en un individuo genéticamente susceptible, inducen el desarrollo de la enfermedad neoplásica. En un principio, las modificaciones epiteliales no presentan una expresión morfológica, aunque pueden involucrar grandes áreas del mismo. Con el tiempo es posible observar la presencia de alteraciones histológicas de distintos grados, las que pueden albergar en su interior la presencia de displasia o carcinoma in situ; finalmente la lesión penetra la membrana basal epitelial convirtiéndose en carcinoma invasor. La progresión del CECC se caracteriza por una extensa invasión local y la presencia de diseminación ganglionar, apareciendo las metástasis a distancia en etapas muy avanzadas de la enfermedad. Otra característica de relevancia es la elevada frecuencia de otros tumores sincrónicos o metacrónicos en el tracto aerodigestivo superior y una importante tendencia a presentar recidivas de la enfermedad.

A continuación presentaremos los principales cambios observados durante la evolución del CECC.

Lesiones preneoplásicas y cancerificación de campo

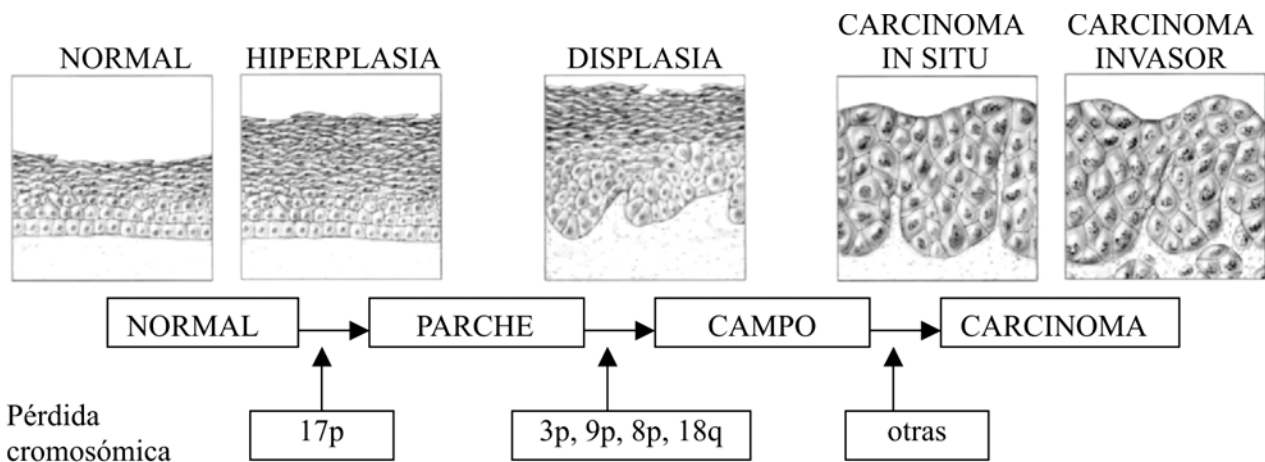
El término “cancerificación de campo” fue acuñado por DP Slaughter y colegas (1953) en referencia a la presencia de cambios en las células del epitelio oral aparentemente sano, expuestas a los mismos carcinógenos, que condicionan la aparición de tumores multicéntricos ya sean estos sincrónicos o metacrónicos. Estos autores determinaron que es posible encontrar “islas” de células de carcinoma invasor en la mucosa adyacente a tumores menores de 1 centímetro de diámetro y que la relación entre la extensión linear versus la extensión en profundidad es mayor de 10 a 1. El trabajo incluyó varias muestras histológicas pertenecientes a 783 pacientes con CECC y fue realizado con anterioridad al establecimiento de las bases moleculares del cáncer, de hecho como

bien señalan Ha PK y Califano JA (2003), fue realizado el mismo año en que Watson y Crick publicaron la estructura tridimensional del ADN. El trabajo de DP Slaughter y colegas permitió establecer las bases teóricas para explicar dos fenómenos importantes asociados a los CECC; primero, el hallazgo de alteraciones clonales en células epiteliales aparentemente normales, y segundo, la elevada frecuencia de otros tumores primarios o la presencia de numerosas recidivas tumorales en esta localización.

Los primeros estudios tendientes a demostrar el origen clonal de los CECC se valieron de técnicas elementales como el análisis del cariotipo de tumores o el patrón de inactivación del cromosoma X en los pacientes del sexo femenino. Si bien a través de estas dos aproximaciones se encontraron semejanzas en el patrón genético de distintos tumores primarios pertenecientes a un mismo paciente, no fue posible descartar la posibilidad de que esa similitud se originara en otros fenómenos que no fuese el origen clonal de los mismos.

Investigaciones recientes se han concentrado en alteraciones de regiones más específicas del genoma. El análisis de la pérdida de heterocigocidad de regiones repetitivas no codificantes del genoma (microsatélites) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitió en el año de 1996 a Califano y colegas la identificación de zonas frecuentemente perdidas del genoma tumoral, responsables de la inactivación de numerosos anti-oncogenes. Estas modificaciones resultaron ser características de lesiones en diferentes etapas evolutivas, conformando un modelo de progresión de malignidad que comienza con un epitelio normal hasta finalizar en el carcinoma invasor (Califano J et al, 1996). Este modelo (Figura 2) es similar al descrito por ER Fearon y B Vogelstein (1990) para el desarrollo del adenocarcinoma colorrectal.

Figura 2: Modelo de progresión del CECC adaptado al concepto de cancerización de campo.



Tomado y modificado de A Forastiere y colegas (2001)

Otra aproximación ha sido el estudio de mutaciones puntuales en determinados oncogenes. Como vimos la exposición al humo del tabaco se asocia con la aparición de un grupo característico de mutaciones del oncogen p53, sin embargo, la posibilidad de que dos tumores en el mismo paciente posean la misma mutación es muy poco probable, a no ser que esos tumores tengan un origen clonal. MP Tabor y colegas (2002) hallaron en una población de diez pacientes que presentaron recidivas o segundos primarios de CECC, evidencias contundentes del origen clonal en más de la mitad de los casos. Sin embargo U Ribeiro y colegas (1996) en un trabajo previo sobre 17 pacientes, los cuales en conjunto presentaron 41 tumores primarios sincrónicos y metacrónicos, no lograron encontrar una relación entre el patrón de mutaciones de p53 y la clonalidad tumoral. Esta discrepancia de resultados puede ser observada no sólo en el análisis de p53, sino también en otros oncogenes o antioncogenes y podría originarse en la falta de especificidad o sensibilidad de las técnicas, el escaso número de pacientes en estudio, o en el hecho de que muchas de estas alteraciones representan fenómenos tardíos de la progresión tumoral.

De todos modos, el fenómeno de “cancerización de campo” y el establecimiento de un modelo de progresión tumoral demuestran la existencia de alteraciones genéticas en el epitelio

aparentemente normal que llevarían a la futura aparición de un tumor maligno. Ubicadas entre estas modificaciones tempranas del epitelio y el surgimiento de un carcinoma invasor encontramos a una serie de condiciones precursoras que, a partir de investigaciones epidemiológicas, históricamente han sido asociadas al CECC. Muchas de estas lesiones aún hoy son difíciles de clasificar desde un punto de vista molecular y conservan una descripción clínica. En conjunto podrían ser definidas como la presencia alteraciones morfológicas del epitelio, en el cual la aparición de una lesión neoplásica es más frecuente que en su contraparte normal.

Una de las lesiones precancerosas más frecuentes es la leucoplaquia, la cual es definida según la Organización Mundial de la Salud como la presencia de una placa blanca que no puede ser caracterizada clínicamente o patológicamente como una enfermedad conocida (Kramer IR et al, 1978); por lo tanto, es importante destacar que lesiones tales como la candidiasis o el liquen plano no deben ser considerados como leucoplaquias. Una vez descartadas otros tipos de lesiones, las leucoplaquias se corresponden histológicamente con la presencia de hiperqueratosis (engrosamiento del estrato córneo), paraqueratosis (presencia de núcleos en el estrato córneo) o bien displasia (ver más adelante en esta página).

La presencia de leucoplaquia es poco frecuente en individuos menores de 30 años, sin embargo su incidencia en la población masculina mayor de 35 años puede ser superior al 8% (Bouquot JE y Gorlin RJ, 1986). Su localización preferencial es en la cavidad oral, particularmente en el epitelio gingival. En cuanto a la progresión de este tipo de lesiones, el 40% de los casos presentan una remisión espontánea, mientras que el 47% de las lesiones permanecen estables durante años, en tanto que la transformación maligna se observa en el 3 al 10% de los pacientes. Es interesante que la presencia de displasia y la progresión a carcinoma invasor podría ser mayor en las lesiones ubicadas en el piso de la boca (Waldron CA y Shafer WG, 1975).

Displasia es un término histológico que describe distintos grados de cambios anormales de un epitelio, observándose una alteración en la relación núcleo-citoplasma, un incremento en la

ocurrencia de figuras de mitosis, pleomorfismo celular e hiperchromatismo nuclear, siendo su máxima expresión el carcinoma *in situ*. Es posible hallar displasia en el 15 al 40% de las leucoplaquias y, si bien existe una relación entre el tamaño de la lesión leucopláquica y la presencia de displasia, aún lesiones pequeñas pueden albergar áreas de carcinoma *in situ* (Neville BW y Day TA, 2002). El riesgo de progresión de las lesiones displásicas a carcinoma es significativo y posee un rango que va desde el 10 al 14% de los casos.

La eritroplaquia es también una lesión precancerosa cuya definición es clínica y hace referencia a la presencia de placas rojas aterciopeladas que no pueden ser asociadas, clínica o patológicamente, a una enfermedad conocida. Su incidencia es mayor en hombres de edad avanzada, localizándose usualmente en el piso de la boca y, en ocasiones, puede observarse simultáneamente con áreas de leucoplaquia. La eritroplaquia tiene una asociación más fuerte con la presencia de displasia y carcinoma *in situ* que la leucoplaquia; por lo tanto posee un riesgo mayor de progresar hacia un carcinoma invasor.

El liquen plano es una lesión preneoplásica que reconoce en su patogenia la presencia de una respuesta inmune celular contra los propios queratinocitos basales; posee un escaso potencial de progresión a carcinoma invasor, el cual no supera el 4% de los casos.

Finalmente, mencionaremos a la fibrositis submucosa, una lesión del tejido conectivo subepitelial caracterizada por la transformación fibroelástica del mismo debido a la masticación de sustancias como la nuez de la areca. Si bien la progresión a enfermedad maligna no es muy elevada, a diferencia de las otras lesiones no presenta regresión aún siendo suprimido el estímulo que la produjo.

Alteraciones genéticas prematuras en el CECC

El modelo de progresión del CECC se basa en la acumulación de alteraciones genéticas en un proceso que comienza en el epitelio aparentemente normal y luego avanza por etapas hasta el

surgimiento del carcinoma invasor. Analizaremos a continuación cuales son las alteraciones genéticas más frecuentemente halladas.

Como vimos, el análisis de la pérdida de heterocigosidad permitió establecer el origen clonal de las neoplasias de cabeza y cuello así como determinar la pérdida de numerosos anti-oncogenes que tendrían como consecuencia la alteración del ciclo celular normal. La región que presenta más alteraciones en el CECC se localiza en el cromosoma 9p21 y su pérdida puede ser observada en el carcinoma *in situ* e incluso en la displasia (Nawroz H et al, 1994). En esta región se encuentra el gen CDKN2A que codifica la proteína p16, la cual es un inhibidor de las ciclinas dependientes de las quinasas 4 y 6, las cuales actúan a su vez sobre la ciclina D1. La inhibición de p16 sobre la ciclina D1 previene la fosforilación de Rb y por lo tanto la entrada de la célula a la fase S del ciclo de replicación. La acción inhibidora de proteína p16 no sólo se pierde a causa de deleciones cromosómicas; también la presencia de mutaciones puntuales pueden generar variantes no funcionales de la molécula, hecho que se ha observado en el 10% de los CECC (Reed AL et al, 1996). Numerosos trabajos han relacionado la presencia de alteraciones de p16 con una menor supervivencia de los pacientes (Bova RJ et al, 1999), un incremento en la aparición de recidivas (Danahey DG et al, 1999) e incluso con la presencia de metástasis ganglionares regionales (Jares et al, 1997).

Las moléculas moduladas por la acción de p16 también son asiento de numerosas alteraciones. Por medio de diversas metodologías se ha podido establecer un aumento de la expresión de ciclina D1 (cuyo gen CCND1 se halla localizado en la región 11q13) fenómeno que parece ser de importancia en la progresión de carcinoma *in situ* a carcinoma invasor (Braakhuis BJ et al, 2003) y, consecuentemente, se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad (Capaccio P et al, 1999). Finalmente, y como ocurre en numerosos tumores, también la expresión de Rb se encuentra alterada en una proporción importante de los casos (Tanaka N et al, 2001).

Otro conjunto de proteínas inhibidoras de ciclinas dependientes de quinasas son las proteínas p21 y p27, las cuales ejercen su efecto sobre las ciclinas A, D y E impidiendo la progresión del ciclo celular. Si bien existen resultados aparentemente contradictorios presentados por distintos investigadores estas moléculas han sido ampliamente estudiadas ya que son producto de los genes inducidos por p53 (Todd R et al, 2002).

La proteína nuclear p53 es codificada por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 17p13.1, su principal función es regular la progresión del ciclo celular y la diferenciación en función de mantener la estabilidad genética, induciendo la muerte celular programada. En el CECC la inactivación de p53 es uno de las principales causas de la ausencia de apoptosis y su expresión ha sido ampliamente estudiada debido a dos situaciones particulares: en primer lugar, este anti-oncogen se encuentra alterado con frecuencia en la mayoría de las neoplasias, y en segundo, se ha descrito una asociación entre determinadas mutaciones y el hábito del tabaquismo. Si bien hay consenso en la literatura acerca de la presencia de mutaciones que inducen la sobre-expresión de una molécula p53 no funcional en más de la mitad de los tumores de cabeza y cuello, la utilidad pronóstica de ésta ha sido muy controvertida, como lo sugieren Pruneri y colegas y Wilson y colegas (Pruneri G et al, 1998 y Wilson GD et al, 1995).

En el CECC también es posible observar alteraciones de oncogenes que inducen la proliferación celular. El receptor del factor de crecimiento epitelial (en inglés *epidermal growth factor receptor* o EGFR) es una proteína de transmembrana con actividad de tirosinquinasa que responde al estímulo de dos ligandos, el EGF y el factor de crecimiento transformante alfa (en inglés *transforming growth factor* o TGF α), iniciando una cascada de segundos mensajeros intracelulares, los cuales a su vez, favorecen la progresión del ciclo de replicación celular. En el CECC es frecuente observar la producción autocrina de EGF y TGF α (Grandis JR et al, 1993), así como la sobre-expresión del EGFR en casi la mitad de los tumores (Ulanovski D et al, 2004), la que ha sido asociado con un peor pronóstico para el paciente (Wen QH et al, 1996 y Krecicki T et al,

1999). El EGFR suscitó un interés especial ya que el desarrollo de anticuerpos monoclonales que bloquean su actividad ha demostrado verdadera utilidad terapéutica (van Gog FB et al, 1998).

Progresión del CECC

El CECC es un tipo único de neoplasia en cuanto a su progresión. Mientras que la mayoría de los carcinomas avanzan con frecuencia y rapidez a estadios que presentan diseminación sistémica, el CECC produce una importante invasión loco-regional surgiendo las metástasis viscerales en etapas muy avanzadas de la enfermedad.

A medida que la lesión neoplásica crece, gracias a los procesos empleados para inducir la replicación celular y la inhibición de la apoptosis, el tumor debe enfrentar nuevos desafíos para su supervivencia. Como se recordará la apoptosis es la muerte celular programada y usualmente los mecanismos que la regulan se hallan afectados en las neoplasias.

Hipoxia

El aumento de la masa tumoral genera áreas de hipoxia que exponen a las células tumorales alejadas de los vasos sanguíneos a la muerte por necrosis, sin embargo existen en la célula una serie de mecanismos capaces de revertir esta situación. En respuesta a la disminución de la tensión de O₂ HIF-1 actúa como factor de transcripción sobre numerosos elementos de respuesta a la hipoxia, induciendo la síntesis de proteínas como el factor de crecimiento vascular endotelial (en inglés *vascular endothelial growth factor* o VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (en inglés *basic fibroblast growth factor*, o FbFb), mitógenos, proteínas pro-apoptóticas, e incluso proteínas involucradas en la migración celular (Semenza GL, 2000). La activación del sistema HIF-1 es según J Tímár y colegas (2005) una espada de doble filo, ya que no sólo regula señales de proliferación celular sino también aquellas que inducen la muerte y, por otra parte, la presencia de alteraciones intrínsecas de los mecanismos efectores del sistema torna impredecible la respuesta de un tumor determinado a la corrección de la hipoxia.

De todos modos, el reconocimiento de células hipóxicas en el CECC continúa siendo de importancia, ya que estas células suelen ser resistentes a la terapia radiante y constituyen un marcador de mal pronóstico para los pacientes sometidos a ese tratamiento (Aebersold DM et al, 2001).

Otro fenómeno asociado a la hipoxia tumoral fue reconocido hace décadas como el “Efecto Warburg”, el cual describe cambios del metabolismo oxidativo a través de la glicólisis anaeróbica observada frecuentemente en el tejido tumoral, acompañado de un aumento en la expresión de moléculas transportadoras de glúcidos y enzimas glicolíticas. Asociado a estos cambios metabólicos R Kannagi y colegas (2004) hallaron un aumento en la expresión de carbohidratos mediadores de la adhesión celular como el sialil Lewis a y *sialil Lewis x*, responsables del establecimiento de metástasis a distancia.

Neoangiogénesis y linfangiogénesis

La vascularización en el CECC se logra exclusivamente por medio de la neoangiogénesis y, como es característico de otros carcinomas epidermoides, estos vasos sanguíneos transcurren por fuera del parénquima de células tumorales. Si bien la función principal de los vasos de neoangiogénesis es proveer de O₂ y nutrientes al tumor, también existe la posibilidad de que transformen en la puerta de acceso a la diseminación metastásica.

Para establecer el rol de la neoangiogénesis en la progresión del CECC se han utilizado diversas herramientas. Marcadores específicos de células endoteliales, como CD31, CD34 o CD105, permitieron la medición precisa de la densidad de vasos sanguíneos en los tumores sin lograr demostrar una relación entre esta densidad y el pronóstico del paciente (Martone T et al, 2005), confirmando que este tipo de neoplasias no utilizaría los vasos de neoangiogénesis para producir metástasis hematógenas.

Por otra parte, el CECC se caracteriza por la producción de dos variantes del VEGF (VEGF C/D) los cuales inducen la proliferación específica de vasos linfáticos (Lalla RV et al, 2003). La linfangiogénesis es un proceso aparentemente más sencillo que la neoangiogénesis, así como la invasión de los vasos linfáticos (los de menor diámetro desprovistos de membrana basal y pericitos) resultan favorables para la migración de las células tumorales (Timar J et al, 2005). Estos hallazgos realzan el rol de los vasos linfáticos en la diseminación tumoral.

Invasión local

La invasión de tejidos vecinos implica la adquisición de una nueva serie de habilidades por parte de las células tumorales que les permite degradar la matriz del tejido conectivo, moverse y adherirse a las estructuras que las rodean. Estas nuevas propiedades son el resultado de la expresión o represión de genes cuyo número se ha incrementado a medida que nuevas técnicas permiten el análisis simultáneo del genoma completo (Leethanakul C et al, 2003).

Tradicionalmente, la invasión local producida por el CECC ha sido descrita sobre la base de observaciones morfológicas. El “modo de invasión” fue utilizado por PA Jakobsson y colegas (1973) en el cáncer de laringe como una variable descriptiva de la relación huésped-tumor, la cual podría asumir cuatro valores arbitrarios relacionados con la presencia de límites más o menos discernibles entre el tumor y los tejidos vecinos. Esta variable resultó ser un importante factor pronóstico de la supervivencia de los pacientes a los cinco años de diagnosticada la enfermedad. (Jakobsson PA, 1975). Posteriormente esta clasificación fue adaptada por E Yamamoto y colegas (1983) a la descripción de tumores de la cavidad oral.

En el CECC es posible observar la sobre-expresión o activación de numerosas enzimas que degradan la matriz extracelular, en particular el grupo de las metaloproteinasas de matriz (en inglés *matrix metallo-proteinases* o MMP's). Estudios realizados sobre fracciones subcelulares de tumores de la cavidad oral permitieron establecer que la síntesis, excreción y activación de MMP2 se

encontraba elevada en los carcinomas en comparación con el tejido normal, y que esta expresión se relacionaba con la presencia en el paciente de metástasis ganglionares (Katayama A et al, 2004). Por otra parte, A Franchi y colegas (2002) demostraron una sobre-expresión de MMP9 en el CECC la cual estaba relacionada con la presencia de neoangiogénesis y alteraciones de p53, sugiriendo que las mutaciones de este anti-oncogen podrían favorecer la progresión tumoral a través de la degradación de la matriz extracelular.

Otro grupo importante de enzimas sobre-expresadas en el CECC son las catepsinas, sin embargo no se ha podido demostrar el valor pronóstico de este tipo de moléculas (Smid L et al, 1997).

Moléculas de adhesión

La arquitectura normal del epitelio plano estratificado se conserva por medio de la interacción célula-matriz (particularmente entre las células basales de reserva y la membrana basal epitelial) y la interacciones célula-célula, lo cual ejerce un control sobre la proliferación y el estado de diferenciación celular. Por lo tanto, alteraciones en los sistemas que regulan la adhesión celular podrían influir decisivamente en la progresión tumoral.

Las lamininas son glicoproteínas de gran tamaño presentes en la matriz extracelular y uno de los principales componentes de las membranas basales epiteliales. Sus moléculas receptoras son las integrinas, glicoproteínas heterodiméricas de la membrana plasmática celular capaces de transmitir señales al interior de la célula. En la membrana basal de los epitelios estratificados predomina la laminina 5 y esta misma molécula puede ser observada en el frente de invasión de los carcinomas (Pyke C et al, 1995); en el CECC su presencia se correlaciona con la existencia de un modo de invasión infiltrativo (en contraposición a uno “compresivo”), la escasa diferenciación tumoral y el pronóstico del paciente (Ono Y et al, 1999).

La integrina $\alpha 3\beta 1$ es el principal receptor de laminina 5 y la unión de estas moléculas desencadena la activación de vías de señalización intracelulares que promueven crecimiento y motilidad celular (Dyce OH et al, 2002). Una de estas vías esta compuesta por enzimas con actividad GTPasa de la familia Rho; estos segundos mensajeros controlan la formación de lamelipodios, adhesiones focales y la actividad de los filamentos de actina y miosina.

En cuanto a las interacciones célula-célula, el CECC tiene como característica principal la formación de nidos de células cohesivas, los cuales en la mayoría de los casos presentan un límite demarcado con el tejido conectivo circundante. La interacción entre las células presentes en el interior de estos nidos se ve influenciada por la presencia de las cadherinas, receptores homofílicos de transmembrana dependientes de Ca^{++} , presentes en abundancia en las uniones adherentes o en los desmosomas.

Si bien la unión entre cadherinas no es muy estable, estas moléculas logran formar uniones fuertes al reunirse en grupos o “clusters” en los cuales interactúan con proteínas del citoesqueleto. La función de las cadherinas es entonces regulada desde el citoplasma por otro grupo de proteínas intermediarias denominadas cateninas, las cuales incluyen a α , β y γ cateninas (Hirohashi S, 1998).

En el citoplasma, de no encontrarse unida a cadherinas, la β catenina es fosforilada y degradada a través del proteosoma citoplásmico lo cual puede ser inhibido en diversas situaciones. Como resultado se acumula β catenina en el citoplasma, favoreciéndose su translocación al núcleo celular donde actúa como factor de transcripción de genes que codifican proteínas relacionadas con el ciclo celular, entre las que se encuentran c-myc y ciclina D1 (Conacci-Sorrell M et al, 2002). Las consecuencias de las alteraciones producidas en la regulación de la interacción célula-célula en el CECC aún no han sido completamente aclaradas, sin embargo estudios recientes sugieren que la sobre-expresión de β catenina en tumores de la cavidad oral se encuentra estrechamente relacionada con la progresión tumoral (Odajima T et al, 2005).

Invasión Ganglionar

La presencia de diseminación metastática ganglionar es uno de los principales factores pronósticos establecidos para el CECC, comparable a la persistencia de restos tumorales de la lesión primaria luego de su tratamiento quirúrgico; en los pacientes en los que se ha podido determinar este tipo de diseminación la probabilidad de supervivencia a los cinco años de diagnosticada la enfermedad se reduce en un 50%, razón por la que ha sido siempre un área de intensa investigación.

El estudio de la anatomía del drenaje linfático ha descrito la existencia de numerosos pares de grupos ganglionares (cada par dispuesto bilateralmente), los cuales drenan en forma predecible un área del cuello, establecida principalmente por el origen de su irrigación sanguínea. Desde el punto de vista clínico estos grupos ganglionares son divididos en cinco niveles. El nivel I incluye los ganglios submentonianos y submandibulares; al nivel II corresponden a los ganglios superiores de la cadena yugular, el nivel III a los ganglios medios de la cadena y el IV a los ganglios inferiores. El nivel V representa a los ganglios cervicales posteriores. Finalmente, los ganglios del compartimiento cervical anterior son asignados a un nivel VI, de poca relevancia para el CECC.

De esta manera los tumores localizados en la cavidad oral se diseminarán más frecuentemente al nivel I, en tanto que los originados en la lengua podrán hacerlo tanto al nivel I como II; los tumores localizados en la faringe lo harán a los niveles II, III, IV o V, en tanto que los laríngeos al III, IV o V. Por otra parte, aquellos tumores localizados en la línea media pueden dar origen a metástasis a ambos lados del cuello. Sin embargo, estos patrones de diseminación no siempre se cumplen y la complejidad del drenaje linfático se demuestra con la no poco frecuente aparición de metástasis contralaterales o discontinuas en los niveles de drenaje (Byers RM et al, 1997).

La proporción de pacientes con metástasis ganglionares en el CECC se aproxima al 50% al momento de la búsqueda de atención médica, pudiendo observarse variaciones dependiendo la

localización tumoral y el grado o modo de invasión local. En un estudio reciente realizado en Korea sobre 843 casos, se determinó clínicamente la presencia de metástasis ganglionares en el 42% de los pacientes y se halló una mayor frecuencia de metástasis ganglionares en los tumores localizados en la hipofaringe (76%), en tanto que aquellos localizados en la nasofaringe mostraron la menor tasa de metástasis ganglionares.

En el CECC la diseminación linfática tiene su origen en la linfangiogénesis intratumoral, que como hemos visto previamente, provee al tumor de una conexión con el sistema linfático regional; sin embargo, aún no se ha aclarado completamente como es que las células tumorales logran ingresar a la circulación linfática.

Si bien algunos autores sugieren la posibilidad de una movilización pasiva de las células tumorales hacia la circulación linfática como resultado del desprendimiento de las células tumorales asociado a la destrucción de la matriz extracelular, la existencia de mecanismos activos no puede ser ignorada. En primer lugar, las células tumorales pueden reconocer, a través de receptores de la membrana plasmática, la presencia de quemoquinas producidas por las células de los vasos linfáticos. En un trabajo reciente publicado por D Uchida y colegas (2004) se destaca que la liberación del factor derivado de células estromales 1 (del inglés *Stromal Cell Derived Factor 1* o SDF-1) en las cercanías de los vasos linfáticos es reconocida por el receptor de quemoquinas CXC4 (CXCR4), presente en las células tumorales, lo que provoca la quimiotaxis de estas últimas y favorecería la diseminación linfática, pero no la diseminación hacia los órganos distantes.

Por otra parte, utilizando un modelo experimental de carcinoma de lengua murino, H Nakaya y colegas (2005) pudieron establecer que cuanto mayor era el grado de invasión tumoral, mayor era la linfangiogénesis intratumoral, en tanto que se observaba una disminución en la densidad de vasos sanguíneos. Estos datos, sumados a los anteriores, sugieren que en el fenómeno de diseminación linfática existe un proceso simultáneo de degradación de la matriz, migración, linfangiogénesis y adhesión celular.

Una vez alcanzada la circulación linfática la supervivencia de las células tumorales es desafiada principalmente por las células efectoras del sistema inmune, las cuales se encuentran en mayor cantidad en comparación con la circulación sanguínea. La baja presión hidrostática de los vasos linfáticos no ejerce un estrés importante sobre las células tumorales, las cuales eventualmente alcanzan los ganglios regionales y en su mayoría son atrapadas en el seno subcapsular.

El establecimiento de un foco metastático se ve favorecido por la presencia de un endotelio fenestrado y por lo tanto es probable que sea suficiente la presencia de las moléculas apropiadas que permitan la adhesión de las células tumorales. Dentro de estas moléculas se encuentran las selectinas y sus ligandos glicoproteicos, de quienes hemos hecho referencia previamente.

La adhesión celular mediada por selectinas puede establecerse por la presencia de estas moléculas tanto en el endotelio como en las células tumorales, ocurriendo lo mismo con sus ligandos. La glicoproteína CD44, inicialmente reconocida como una molécula leucocitaria capaz de reconocer ácido hialurónico, ha sido ampliamente estudiada en el CECC donde se ha determinado su valor pronóstico; variantes de splicing (como CD44v6) son altamente expresadas en el tumor y, a su vez, pueden ser halladas en la circulación sanguínea de los pacientes (Kawano T et al, 2004 y Kawano T et al, 2005). Recientemente, Y Katayama y colegas (2005) establecieron que CD44 es un ligando fisiológico de selectinas y modula la adhesión de polimorfonucleares sobre el endotelio venular, fenómeno que podría explicar la elevada frecuencia de diseminación ganglionar en los tumores CD44+.

La arquitectura de la matriz extracelular ganglionar está constituida principalmente por fibras reticulares y no opone resistencia al crecimiento de las metástasis. Por otra parte, las células del sistema inmune sí ejercen una presión selectiva sobre las células tumorales, logrando sobrevivir aquellas que expresen la menor cantidad de antígenos y moléculas de la maquinaria de presentación antigénica, en combinación con una elevada resistencia a la apoptosis y otros mecanismos de evasión de la respuesta inmune.

En el CECC es posible observar la presencia de micrometástasis, las cuales son definidas como depósitos no vascularizados de un tamaño inferior a 3 mm, ubicadas preferentemente en el área del seno cortical de los ganglios linfáticos formando agregados únicos o múltiples. Aproximadamente en el 15 al 20 % de los pacientes que han sido clasificados como estadios I o II es posible detectar, por medio de ensayos de biología molecular o inmunohistoquímica en cortes seriados de los ganglios, la presencia de micrometástasis (Shores CG et al, 2004 y Kwon SY et al, 2004).

El análisis histológico de tumores primarios localizados en la lengua permitió a A Sparano y colegas (2004) hallar una correlación entre el grado de diferenciación, el modo de invasión y el espesor tumoral, con la presencia de micrometástasis ganglionares. Si bien la utilidad clínica de la detección de micrometástasis aún no ha sido completamente resuelta, es un fenómeno de gran importancia para entender los mecanismos de diseminación tumoral.

Otro fenómeno que es posible observar en el CECC es la presencia de metástasis ganglionares “salteadas” o discontinuas, producto del pasaje directo de células tumorales a ganglios linfáticos de segundo o tercer orden debido a la abundante y compleja anatomía linfática. Este tipo de metástasis dificulta la aplicación de las técnicas que evalúan el estado del ganglio “centinela” (primer ganglio en la cadena de drenaje linfático) en pacientes pertenecientes a estadios I y II. En el mejor de los casos, la exéresis y análisis del ganglio centinela puede alcanzar una sensibilidad cercana al 90% (Ross GL et al, 2002), aunque algunos autores sugieren que ésto es posible únicamente si se incluyen en el estudio un segundo o tercer ganglio (Werner JA, et al. 2004).

Finalmente, el establecimiento de metástasis ganglionares representa la etapa previa al desarrollo de enfermedad sistémica (Genden EM, et al 2003); si bien regiones como la hipofaringe o la base de la lengua poseen una elevada frecuencia de metástasis a distancia debido a su abundante irrigación, la presencia de invasión extracapsular o neoangiogénesis en las metástasis

ganglionares parecen ser factores fundamentales en la diseminación tumoral a órganos distantes (Brasilino de Carvalho M, 1998 y Woolgar JA, 2003).

Inmunobiología del CECC

Fenómenos inmunológicos intratumorales

La mucosa del tracto aerodigestivo superior, ámbito en el que se desarrollan los tumores de cabeza y cuello, es un área del organismo rica en células del sistema inmune y en los factores solubles que ellas producen, lo que permite pensar en una interacción constante entre ambos desde el nacimiento mismo de la lesión neoplásica. Tal como sugieren P Delvenne y colegas (2004), es posible observar deficiencias en la vigilancia inmunológica en este tipo de epitelios incluso desde la aparición de lesiones preneoplásicas.

Como hemos comentado, el concepto de “evasión tumoral” surgió concomitantemente con el de “inmunovigilancia”, insinuando que la aparición de tumores inmunoresistentes es el resultado inevitable de la presión evolutiva ejercida por el sistema inmune sobre la neoplasia, concepto que actualmente se conoce como “inmunoedición”. Los mecanismos empleados por los tumores para lograr la evasión del sistema inmune son muy variados y, ya sea por factores producidos por ellos mismos o por las células del sistema inmune que los infiltran, suprimen la respuesta inmunológica tanto a nivel local como en forma sistémica.

Los cambios observados en las células tumorales incluyen la disminución o pérdida de la capacidad de presentar antígenos al sistema inmune. En estudios realizados sobre muestras tisulares de pacientes con cáncer laríngeo, varios autores demostraron la ausencia de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (en inglés *Mayor Histocompatibility Complex I* o MHC I) en aproximadamente el 25% de los tumores y una disminución más marcada en las células metastáticas, aunque esta disminución no pudo correlacionarse con el estadio tumoral o el pronóstico de los pacientes (Prime SS et al, 1987 y Esteban F et al, 1989).

Conjuntamente con las alteraciones del MHC, las células tumorales del CECC exhiben perturbaciones en las moléculas co-estimuladoras y en moléculas de adhesión, responsables de coordinar la interacción célula-célula (Vora AR et al, 1997), estudios funcionales *in vitro* demostraron que linfocitos de sangre periférica de pacientes con CECC recuperaron la capacidad de lisar células de la línea tumoral PCI-13 luego de que esta fuera transfectada con el gen de la proteína coestimuladora B7.1 (Lang S et al, 1999).

En el microambiente tumoral del CECC es frecuente hallar grandes cantidades de linfocitos infiltrantes los cuales presentan un fenotipo de linfocitos activados pero con numerosas alteraciones funcionales. En primer lugar se observa la disminución o ausencia completa de moléculas que conforman el receptor del linfocito T (en inglés *T Cell Receptor* o TCR). La cadena zeta de este receptor ha sido especialmente estudiada ya que su ausencia se correlaciona con la sobrevida a los 5 años de pacientes con carcinoma oral (Reichert TE et al, 1998a). Por otra parte, estos linfocitos evidencian un desbalance en la producción de citoquinas; es posible observar la ausencia de producción de interleuquina 2 (IL2) o interferón gamma (INF γ) y la respuesta proliferativa a la administración exógena de estas citoquinas también se encuentra alterada (Young MR et al, 1996 y Reichert TE et al, 1998b). Otras alteraciones observadas en los linfocitos infiltrantes de tumor nos muestran una disminución en la locomoción y citotoxicidad de las células efectoras así como un aumento en los índices apoptóticos.

Fenómenos sistémicos

En la circulación periférica de pacientes portadores de CECC es común observar la presencia de linfopenia aunque la composición de los linfocitos T (LT) CD4+, LT CD8+ y LT CD3+ se mantiene estable en sus valores proporcionales. La respuesta a la estimulación inespecífica *in vitro* de estos linfocitos se encuentra disminuida en forma dependiente del estadio tumoral

(Heimdal JH et al, 1998) e incluso los valores absolutos de LT CD4+ parecen estar relacionados con el pronóstico de los pacientes (Kuss I et al, 2005).

Con respecto a los LT CD8+ circulantes, Hoffman y colegas han detectado un incremento en los indicadores de apoptosis en pacientes con CECC (Hoffman TK et al, 2002); posteriormente, T Tsukishiro y colegas (2003) analizaron las distintas subpoblaciones de LTCD8+ y determinaron una disminución en las células naive (no activadas) acompañada de un aumento en el número de linfocitos de memoria y efectores. Los CD8+ naive no resultaron ser susceptibles a la apoptosis mientras que las otras dos poblaciones, sí lo fueron. Según los autores, estos hallazgos sugieren la existencia de una eliminación de CD8+ efectores con un recambio acelerado de células precursoras.

Finalmente, TL Whiteside y colegas (2005) lograron obtener evidencia que involucra a las células tumorales en la muerte de los CD8+. Comparando el conjunto de LT CD8+ efectores presentes en los pacientes con CECC con subpoblaciones capaces de reconocer secuencias peptídicas de antígenos tumorales derivados de estas neoplasias (péptidos de p53) determinaron que en este último grupo existían niveles significativamente elevados de marcadores de apoptosis. Por otra parte, estos mismos investigadores habían establecido en investigaciones previas que el mecanismo de apoptosis por expresión de Fas ligando constituía una de las formas de evasión tumoral en el CECC y que, en parte, era responsable de la muerte de los LT (Gastman BR et al, 1999).

Los linfocitos T supresores (LTs), involucrados normalmente en la desactivación fisiológica de la respuesta inmune, son otra población de alterada en el CECC. Schaefer y colegas (2005) compararon los niveles de LTs en pacientes portadores de tumor con sujetos normales y los encontraron significativamente elevados; estos linfocitos poseían una elevada velocidad de recambio, del mismo modo que sucedía con los LT CD8+.

Un fenómeno sumamente interesante es la persistencia de las alteraciones en los LT circulantes de los pacientes con CECC durante varios años, aún en aquellos pacientes que

recibieron tratamiento quirúrgico y no muestran evidencia de la enfermedad, lo que claramente revela los profundos cambios que los tumores pueden ejercer sobre el sistema inmune (Whiteside TL, 2005).

Citoquinas

El estudio de la producción de factores solubles es uno de los capítulos de la inmunidad en el CECC que más atención ha recibido; tanto los tumores por si mismos, como el abundante infiltrado linfocitario que usualmente poseen son capaces de producir grandes cantidades de citoquinas, las cuales tienen un rol destacado en la progresión tumoral y en la disfunción del sistema inmune.

Las células del CECC, ya sean del tumor *in vivo*, en cultivos primarios *in vitro* o líneas celulares tumorales, producen cantidades apreciables de interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 6 (IL-6) y factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (en inglés *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* o GM-CSF), si bien los niveles de expresión en las células en cultivos no son muy elevados, son sensibles a la administración exógena de interleuquina 1 (IL-1) (Mann EA et al, 1992), según CW Smith y colegas (1998) la producción de estas citoquinas representan el producto de la interacción del tumor con el huésped pero independientemente de la presencia de linfocitos.

Otra citoquina producida por el CECC es la interleuquina 8 (IL-8), la cual se encuentra relacionada con fenómenos pro-inflamatorios y angiogénicos. Los niveles de IL-8, al igual que las citoquinas mencionadas en el párrafo precedente, resultaron menores en las células en cultivo pero susceptibles a la estimulación exógena con IL-1 (Cohen RF et al, 1995). Por otra parte, la marcación histológica en tejido tumoral demostró una coincidencia en la distribución de IL-8 y el VEGF y los niveles de expresión de ambos se relacionaron con una mayor agresividad tumoral (Eisma RJ et al, 1999).

En un intento por unificar criterios, Z Chen y colegas (1999) condujeron un estudio sobre 16 pacientes de los cuales se obtuvieron: muestras serológicas, otra del tumor primario para análisis inmunohistoquímico, se realizaron cultivos primarios y se establecieron las líneas celulares en cultivo correspondientes; sobre este material se analizó la expresión de 14 citoquinas. En las células en cultivo las citoquinas pro-inflamatorias y pro-angiogénicas fueron detectadas más frecuentemente, incluyendo a IL-1 α , IL-6, IL-4, IL-8, GM-CSF, VEGF y FGFb. Otras citoquinas no fueron detectadas o mostraron niveles de expresión escasos, entre las que se contaban IL-1 β , el factor de necrosis tumoral alfa (en inglés, *Tumor Necrosis Factor α* o TNF α) y el factor de crecimiento transformante beta (en inglés, *Transforming Growth Factor β* o TGF β) y las citoquinas reguladoras IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 e interferon γ (INF γ). Por otra parte, la detección en el tumor fue similar a lo hallado en las líneas celulares, pero con niveles menores en el caso de IL-6 e IL-8; es interesante señalar que la expresión de la mayoría de las citoquinas se concentró en áreas tumorales con signos de diferenciación, a excepción del VEGF que se restringió a áreas indiferenciadas y el GM-CSF que se detectó también en el estroma. En el suero de los pacientes sólo pudo demostrarse la expresión de IL-6, IL-8 y VEGF, la cual fue significativamente mayor que en los controles. Los autores también demostraron una relación entre el volumen tumoral y los valores séricos de IL-8 y VEGF, sugiriendo que estas dos citoquinas contribuyen al crecimiento tumoral.

Posteriormente, estos mismos autores analizaron los probables factores que pudieran regular la expresión de IL-8 y VEGF, estableciendo una relación parácrina a través del factor de crecimiento hepatocítico (en inglés *Hepatocytic Growth Factor*, o HGF), entre el estroma y las células tumorales (Dong G et al, 2001); actualmente realizan un estudio prospectivo el cual demuestra una correlación entre los niveles séricos de IL-8, VEGF y HGF con la supervivencia de los pacientes (Druzgal CH et al, 2005).

Inmunidad Humoral

Los pacientes portadores de CECC pueden presentar alteraciones de la inmunidad humoral que acompañan a la disfunción general de la inmunidad celular, como un fenómeno secundario al efecto del tumor sobre el sistema inmune.

En los pacientes portadores de CECC puede observarse una elevación de los niveles de IgA e IgE por encima de los valores de control entre el 15 y el 40% de los pacientes, en tanto que los niveles de IgG e IgM se mantienen dentro del rango normal (Scully C, 1982). La evolución de estos pacientes también se relaciona con los niveles de IgA e IgE obtenidos previamente al tratamiento y, según K Vinzenz y colegas (1986), aquellos pacientes que sufrieron recidivas de la enfermedad presentan niveles aún más elevados de anticuerpos.

Un fenómeno reconocido en otras localizaciones tumorales y también observado en el CECC es la existencia de un cambio de expresión de la subclase IgG1 por IgG2. Este cambio puede detectarse en lesiones benignas de la cavidad oral pero es más acentuado en los pacientes que poseen diseminación metastásica o recurrencia de la enfermedad (Anderhuber W et al, 1999).

La presencia de abundantes complejos inmunes circulantes (CIC) es otra manifestación importante de la inmunidad humoral de pacientes con CECC. Estos complejos se hallan elevados tanto en pacientes portadores de enfermedades premalignas como portadores de carcinoma y se encuentran relacionados principalmente con el tamaño tumoral. Algunos autores han reportado que se presentan valores mayores de CIC en aquellos pacientes cuya enfermedad progresa o sufren una recidiva tumoral (Saranath D et al, 1985).

Al igual que ocurre con otras alteraciones inmunológicas, los niveles altos de CIC persisten durante años, aún en pacientes en que el tumor primario ha sido resecado sin evidencia de enfermedad remanente y, por otra parte, la evolución de los niveles de CIC demuestra una relación

inversa con la respuesta inmune celular inespecífica estudiada por ensayos *in vitro* (Veltri RW et al, 1986).

En el CECC ha sido posible establecer la naturaleza de algunos pocos antígenos, dentro de los cuales p53 ha resultado el más prominente. En el 20% de los pacientes e incluso en portadores de enfermedad premaligna o fumadores se han detectado anticuerpos dirigidos contra p53, siendo este un fenómeno verdaderamente prematuro en la progresión tumoral (Castelli M et al, 2001).

Por otra parte, los anticuerpos dirigidos contra p53 se encuentran relacionados con el pronóstico de la enfermedad. J Bourhis y colegas (1996) realizaron un estudio multivariado sobre una población de 80 pacientes con distintos tumores de cabeza y cuello, hallando que los anticuerpos anti p53 se encuentran significativamente asociados con la presencia de recidivas y la sobrevida de los pacientes.

Con el fin de determinar la presencia de anticuerpos antitumorales, E Calenoff y colegas (1995) aislaron y fraccionaron una mezcla de proteínas provenientes de 25 líneas celulares de CECC, las cuales conjugaron con discos de papel activados por bromuro de cianógeno. Posteriormente evaluaron la reactividad de los sueros de 65 pacientes y lograron demostrar una diferencia significativa en los niveles de IgA, aunque, tanto controles como pacientes evidenciaron niveles apreciables de IgE e IgG. Un dato fundamental de este trabajo fue la presencia de una relación inversa de los niveles de IgG e IgA versus los niveles de IgE, lo que permitió a los autores especular sobre la existencia de un predominio de respuesta Th2 que produciría el cambio de expresión de IgM a IgE en desmedro de IgG o IgA. Los antígenos hallados resultaron ser en general moléculas nucleares o citoplasmáticas de pesos moleculares variados, las cuales no fueron identificadas.

Antígenos tumorales en el CECC

Los pacientes portadores de tumores son capaces de establecer una respuesta inmune como si fueran antígenos no propios y acompañando al proceso neoplásico es posible observar el surgimiento de antígenos asociados a tumores; en el CECC se han identificado varios antígenos asociados a tumor y técnicas modernas como el análisis serológico de antígenos tumorales a través de librerías de cDNA recombinante (SEREX) continúan expandiendo la lista (Vaughan HA et al, 2004).

Los mecanismos involucrados en la generación de antígenos asociados a tumores son diversos. En primer lugar, los tumores suelen expresar grandes cantidades de algunas moléculas que normalmente se encuentran en una concentración tan baja o poseen una vida media tan corta que no son detectadas por el sistema inmune. Si estas moléculas no generaron tolerancia durante la educación linfocitaria su acumulación conducirá a la activación del sistema inmune, tal como sucede en el CECC con la proteína p53. Otro mecanismo por el cual se generan antígenos asociados a tumor tiene su origen en la presencia de mutaciones que modifican sensiblemente la secuencia peptídica de determinadas moléculas, lo suficiente como para que sean reconocidas por el sistema inmune.

La expresión de moléculas propias de las etapas del desarrollo embrionario o fetal es otro mecanismo relevante. Muchos antígenos oncofetales (tal es como se denomina a esta categoría de antígenos asociados a tumor) fueron descritos inicialmente en melanoma pero también en el CECC.

MUC1 y antígenos carbohidratos en el CECC

Un mecanismo particular por el cual se generan antígenos asociados a tumores se relaciona con la presencia de alteraciones de la expresión de mucinas y/o modificaciones de la glicosilación de proteínas y lípidos.

El CECC y particularmente el cáncer de la cavidad oral se caracterizan por una reducción o pérdida completa de la expresión de los antígenos del grupo sanguíneo ABO. Este fenómeno se puede observar aún en lesiones precursoras como la leucoplaquia, sugiriendo que se trata de un evento temprano en el desarrollo del proceso neoplásico (Gao S et al, 2004).

La síntesis de los antígenos A y B es llevada a cabo por la acción coordinada de las glicosiltransferasas presentes en el aparato de Golgi. Debido a la ausencia de las enzimas responsables de su síntesis, originada en la pérdida de la región cromosómica codificante o a modificaciones en su metilación, se observa una acumulación de sustancias precursoras, tales como el antígeno H o antígenos del grupo Lewis (Dabelsteen E, 2002). Por medio de ensayos realizados sobre líneas celulares de colon, Ichikawa y colegas fueron capaces de demostrar que la expresión del antígeno A conjugado a $\alpha 3\beta 1$ integrina detenía la migración de las células tumorales, en tanto que la expresión de los precursores H/Lewis y la favorecían (Ichikawa D et al, 1997). Según Dabelsteen y colegas, la presencia de distintos patrones de glicosilación modula la actividad de las glicoproteínas de membrana plasmática involucradas en la señalización celular, tanto en aquellas relacionadas con la motilidad como en la proliferación celular y, por lo tanto, representan elementos fundamentales de la progresión tumoral (Dabelsteen E y Gao S, 2005). Sin embargo, aún existen muchas dudas en relación con la expresión de estos antígenos en el CECC, ya que la ausencia de los antígenos A y B también se observa en el epitelio plano estratificado queratinizado, probablemente como un evento normal del programa de diferenciación celular.

Particular interés suscita la expresión de *sialil Lewis x* el cual ha sido asociado a la presencia de diseminación ganglionar en el CECC. CT Wenzel y colegas (1995) analizaron la expresión de este antígeno en líneas celulares tumorales y su capacidad para favorecer la metástasis; a partir de entonces otros investigadores intentaron demostrar esta asociación a través del estudio de material proveniente de pacientes con resultados heterogéneos.

La expresión de mucinas en el CECC es un fenómeno de gran relevancia en el sentido de que ofrece la posibilidad de estudiar un marcador de tumor asociado a fenómenos tempranos del surgimiento de la neoplasia. Su presencia y alteraciones han sido confirmadas por varios autores empleando diferentes metodologías; MV Croce y colegas (2000) lograron aislar MUC1 a partir de fracciones subcelulares de CECC lo que representa una evidencia concluyente de su expresión en este tipo de neoplasias.

A medida que se adquieren nuevos conocimientos sobre el rol de MUC1 en el proceso mismo de la carcinogénesis y se esclarecen los mecanismos que provocan una respuesta inmune antitumoral específica y efectiva contra MUC1, su importancia como antígeno asociado a tumor se realza y nos incita a su estudio exhaustivo.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar la utilidad de MUC1 y antígenos asociados como marcadores tumorales en neoplasias de cabeza y cuello.

Objetivos específicos

- Detectar la presencia de células malignas primitivas y secundarias mediante el estudio de la expresión de mucinas y epitopes asociados en tumores epiteliales localizados en cabeza y cuello.
- Comparar la expresión de mucinas con otros antígenos asociados a tumores epiteliales.
- Establecer cultivos primarios de tumores malignos de cabeza y cuello.
- Relacionar la expresión de mucinas con los procesos de invasión y metástasis.
- Relacionar la expresión de mucinas con parámetros clínicos.
- Estudiar la respuesta inmune humoral inducida por antígenos asociados a tumor.
- Analizar el rol de los anticuerpos inducidos por antígenos asociados a tumor con la evolución de la enfermedad.

MATERIALES

Se incluyeron en este trabajo 141 pacientes portadores de neoplasias malignas y lesiones benignas de cabeza y cuello, en el momento del diagnóstico de su enfermedad provenientes de diversos hospitales públicos del partido de La Plata durante el período de 1999 hasta 2004. Así mismo se obtuvo material de individuos utilizados como controles.

Los controles incluyeron 8 muestras de tejido de la cavidad oral de individuos sanos, 2 de ellos del sexo femenino y 6 del sexo masculino. Para los ensayos serológicos se obtuvo una muestra de sangre periférica de 18 individuos sanos empleadas como controles negativos y 10 pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoidea, como controles positivos.

Caracterización de los pacientes estudiados de acuerdo a los aspectos clínicos.

Se presentan a continuación las características anatómo-clínicas de los pacientes portadores de CECC que formaron parte del presente trabajo de tesis, así como el estudio de su distribución por medio del Análisis de Componente Principal. Se incluyeron un total de 131 pacientes portadores de tumores primarios y 5 pacientes que presentaron recidiva de la enfermedad. Por otra parte se obtuvo material histológico de ganglios metastáticos a partir de 20 pacientes.

Género y edad

La muestra de tumores primarios incluyó a 29 (22%) mujeres con un rango de edad de 29 a 84 años con un promedio de 58,17 años y un desvío estándar de 12,34 años. Así mismo se estudiaron 102 (78%) hombres cuyo rango de edad fue de 38 a 98 años, con un promedio de 60,5 años y un desvío estándar de 10,26 años. (Tabla 7 y Figura 3)

Tabla 7: Número y distribución porcentual del género en pacientes con CECC primario

	n	Porcentaje
Masculinos	102	77.86
Femeninos	29	22.13

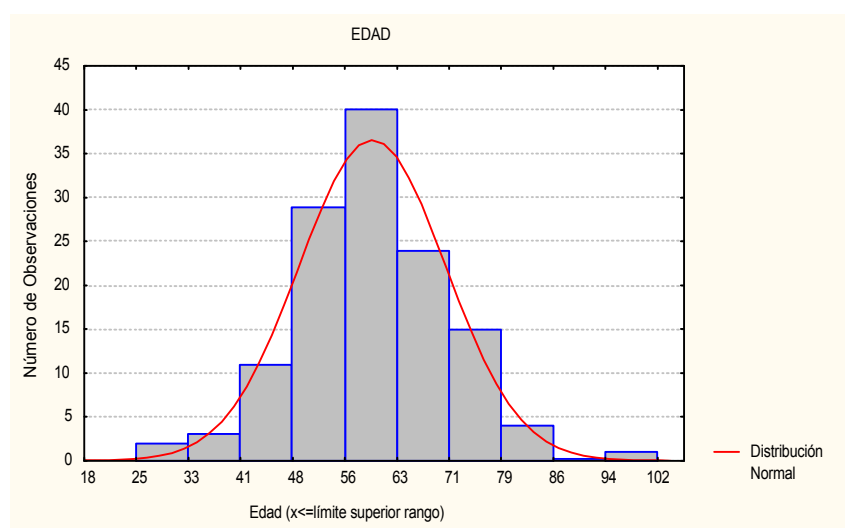


Figura 3: Distribución de edad de los pacientes; histograma de frecuencias absolutas

Estadificación clínica

Siguiendo la clasificación de la sexta edición del manual de la AJCC del año 2002, la distribución de los estadios mostró un predominio de pacientes en el estadio IV (48%) y sólo se lograron estudiar 19 pacientes en los estadios I y II. (Tabla 8)

Tabla 8: Tabla de frecuencias totales y relativas porcentuales del estadio clínico de pacientes con CECC primario

Estadio	n	Porcentaje
I	6	4.58
II	13	9.92
III	49	37.40
IV-A	50	38.17
IV-B	11	8.40
IV-C	2	1.53

De la comparación de los parámetros T y N surge que existe un predominio marcado de tumores de elevado grado T sin invasión ganglionar, lo cual se destaca en la figura 4.

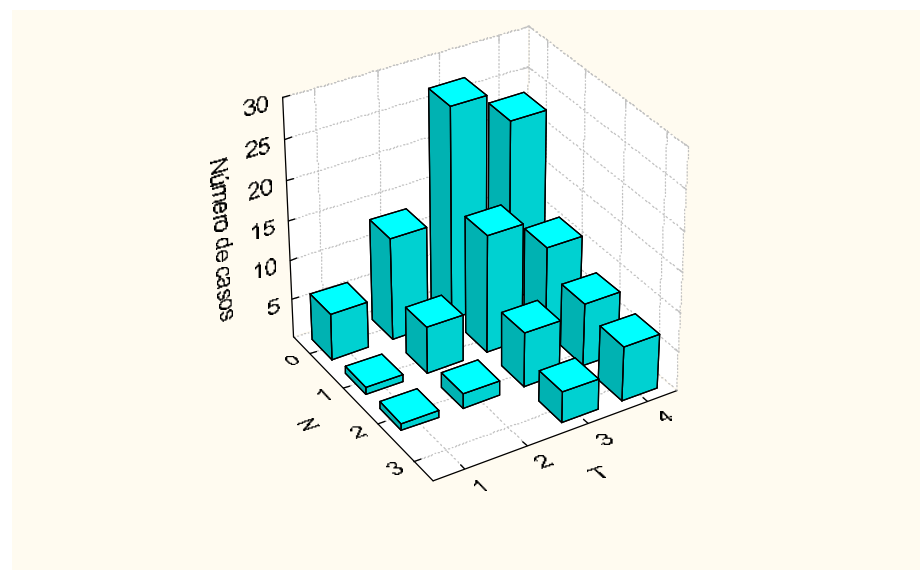


Figura 4: Gráfico de frecuencias totales comparando los parámetros T y N en pacientes portadores de CECC primario

Localización tumoral

En los pacientes estudiados con CECC se observó que aproximadamente la mitad de los tumores fueron originarios de la cavidad oral, mientras que un tercio provenía de la laringe y el resto de distintas localizaciones de la faringe. (Tabla 9)

Es importante destacar que se detectaron diferencias importantes en la localización de los tumores teniendo en cuenta el sexo de los pacientes. Se observó un predominio de tumores localizados en la cavidad oral en mujeres, en tanto que en los hombres la proporción de tumores de la cavidad oral y la laringe fue casi idéntica.

Tabla 9: frecuencias totales de pacientes portadores de CECC primario y sus frecuencias porcentuales según su localización y género.

	Total de pacientes	Porcentaje	Masculinos	Femeninos
Cavidad Oral	62	47.33 %	41.18 %	68.97 %
Laringe	44	33.59 %	40.20 %	10.34 %
Faringe	22	16.79 %	15.69 %	20.69 %
Macizo Facial	3	2.29 %	2.94 %	0.00 %

Pacientes que presentaron recidivas y muestras histológicas de metástasis

ganglionares

Este grupo de 5 pacientes masculinos de diversas edades resultó compuesto por tumores en estadio IV, localizados en la laringe (4) o faringe (1).

Las muestras de ganglios regionales con presencia de metástasis fueron obtenidas a partir de 10 pacientes con carcinoma oral, 8 laríngeo y 2 faríngeo. Dieciséis de estos pacientes fueron hombres y las restantes 4 mujeres; las edades de los pacientes mostraron un promedio de 60,38 años con un desvío estándar de 10,91 años y un rango de 38 a 82 años.

Tejido histológico proveniente de pacientes portadores de CECC

De cada paciente se obtuvo una muestra de material histológico del tumor primario una vez finalizado el acto quirúrgico. Dicha muestra consistió en material fresco de no menos de 1 centímetro cúbico de volumen, representativa del proceso neoplásico. Así mismo, en los casos que fue posible, se obtuvieron muestras de los ganglios linfáticos regionales infiltrados.

En los casos que fue necesario se incluyó material histológico fijado, proveniente de los archivos de los servicios de patología de los respectivos hospitales.

Sangre periférica

A partir de cada paciente se obtuvo por punción venosa una muestra de 10 mililitros de sangre periférica al momento del acto quirúrgico.

Otras fuentes de antígenos

Para ser utilizados como controles se emplearon líneas celulares establecidas en cultivo en el CINIBA, Facultad de ciencias Médicas, UNLP.

Anticuerpos Monoclonales

Para los estudios realizados en la presente tesis se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales.

AcMo	Epitope	Clase Ig	Referencia
C595	MUC1 (centro proteico)	IgG3	Price M et al, 1985 ⁴
CT33	MUC1 (cola citoplásmica)	Policlonal	Provisto por Kim KC
KM93	Sialil Lewis ^x	IgM	Hanai N et al, 1986 ⁵
KM380	Lewis ^x	IgM	Hanai N et al, 1986 ⁵
C14	Lewis ^y	IgM	Brown et al, 1983 ⁶
Tn	Antígeno Tn	IgM	Dako (USA) ⁷
STn	Antígeno sTn	IgG	Dako (USA) ⁸

⁴ Price MR; Pugh JA, Hudecz F; Griffiths W; Jacobs E; Symonds IM; Clarke AJ; WC Chan and Baldwin RW. C595 - a monoclonal antibody against the protein core of human urinary epithelial mucin commonly expressed in breast carcinomas. Br J Cancer. 1990; 61: 681-686.

⁵ Hanai N; Shitara K and 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; 46: 4438-4443

⁶ Brown A; Feizi T; and Gooi HC. A monoclonal against human colonic adenoma recognizes a difucosylated type-2 blood group chain. Biosc Rep. 1983; 3: 163-169.

⁷ Hirohashi S, Clausen H, Yamada T, Shimosato Y, Hakomori S. Blood group A cross-reacting epitope defined by monoclonal antibodies NCC-LU-35 and -81 expressed in cancer of blood group O or B individuals: its identification as Tn antigen. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Oct;82(20):7039-43.

⁸ Kjeldsen T, Clausen H, Hirohashi S, Ogawa T, Iijima H, Hakomori S. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl-2 6-N-acetylgalactosaminyl (sialosyl-Tn) epitope. Cancer Res 1988;48:2214-20.

ÍNDICE DE LOS MÉTODOS

Técnicas de procesamiento de muestras	89
Recepción de material histológico.....	89
Recepción de sangre periférica.....	89
Fijación, inclusión y cortes histológicos	89
Inmunohistoquímica	90
Protocolo de Inmunohistoquímica.....	91
Homogenización de tejidos tumorales y separación de fracciones subcelulares	92
Protocolo de homogenización tisular.....	93
Medición de concentración de proteínas (Método de Lowry)	94
Centrifugación en gradientes de Cloruro de Cesio	95
SDS-PAGE.....	96
Protocolo de SDS-PAGE	98
Western-Blot	98
Protocolo de Western Blott	99
Tratamiento con neuraminidasa	100
Enzyme Link Immunosorbent Assay (ELISA)	100
Cancer Associated Serum Antigen (CASA)	101
Precipitación de CIC en PEG 3,5%.....	102
Protocolo de Precipitación de CIC en PEG 3,5%.....	102
Cromatografía de afinidad en columna de Sefarosa CL-4B y proteína A.	103
Protocolo de cromatografía en columna de Proteína A – Sefarosa CL-4B	103
Cultivo de Tejidos.....	104
Recolección de muestras de tejido tumoral.....	104
Cultivo primario	104
Pasajes y mantenimiento de líneas	105
Congelamiento.....	105
Análisis estadístico	105

MÉTODOS

Técnicas de procesamiento de muestras

La recolección, transporte y evaluación de las muestras para su estudio es de crucial importancia ya que debe asegurarse la obtención de un material de alta calidad y representativo del proceso patológico que sufre el paciente.

Recepción de material histológico

Las muestras de material histológico fueron obtenidas al momento de finalizado el procedimiento quirúrgico. Se obtuvo un fragmento de la lesión o tejido normal, los que fueron transportados en buffer fosfato salino (PBS), medio de cultivo estéril o en solución de formol al 10 % en PBS, según los procedimientos que fueran a realizarse. Las muestras fueron transportadas a 4 °C hasta el lugar de trabajo donde su aptitud fue evaluada.

Recepción de sangre periférica

Durante el procedimiento quirúrgico de cada paciente se obtuvieron 10 mililitros de sangre periférica por punción venosa, sin anticoagulantes. La sangre fue transportada a 4 °C hasta el lugar de trabajo donde se dejó a temperatura ambiente para permitir la retracción del coágulo. Luego la sangre fue centrifugada durante 10 minutos a 1000 rpm. El suero obtenido fue fraccionado, rotulado y almacenado a -20 °C hasta su utilización.

Fijación, inclusión y cortes histológicos

Las muestras histológicas, una vez recibidas fueron ampliamente lavadas y en todos los casos se separó una porción representativa del total que fue colocada en formol al 10% v/v en PBS, o si la muestra fue obtenida en fresco, en methacarn (metanol 60% v/v, cloroformo 30% v/v y ácido acético 10% v/v) durante 2 horas para luego ser almacenada en alcohol 70% v/v.

A continuación las muestras fueron incluidas en tacos de parafina por medio de técnicas convencionales y se realizaron cortes seriados de 5 micrones de espesor, los que fueron montados sobre portaobjetos previamente recubiertos con albúmina sérica bovina (ABS).

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica que permite ver en forma directa la distribución celular de una molécula, utilizando anticuerpos u otros ligandos marcados. Entre los diversos tipos de marcación se encuentran la radioactiva, la fluorescente y la enzimática. Esta última es preferida sobre las anteriores debido a su sencillez y al menor riesgo que implica la no utilización de material radioactivo.

Las enzimas más frecuentemente utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina que, al reaccionar con un sustrato no visible generan un producto insoluble y visible. Una vez establecida esta marca puede ser detectada por medio de la microscopía de luz convencional.

Por lo general se emplea un sistema de detección en “sandwich” en el que un primer anticuerpo específico (generalmente un anticuerpo monoclonal) reconoce al antígeno buscado y es a su vez reconocido por un segundo anticuerpo conjugado que transporta la enzima. La ventaja de este sistema reside en la practicidad de no tener que marcar cada uno de los anticuerpos específicos y, por otra parte, existe la posibilidad de que se amplifique la señal lográndose una mayor sensibilidad.

La principal desventaja radica en que muchas células pueden presentar actividad enzimática endógena, generándose falsas reacciones positivas. Sin embargo esta actividad puede ser inhibida y conjuntamente se pueden establecer controles rigurosos en los que pueden omitirse el anticuerpo específico o el conjugado a la enzima. Por otra parte, la conformación de los epitopes puede ser modificada por el procedimiento empleado en la fijación por lo que es deseable aplicar métodos de “recuperación antigénica” a fin de lograr una conformación natural de los mismos. El empleo de

temperaturas extremas, variaciones de pH y soluciones capaces de secuestrar iones de calcio son ampliamente utilizadas con tal fin.

Protocolo de Inmunohistoquímica

Los cortes incluidos en parafina, seccionados y montados sobre portaobjetos, fueron hidratados en una serie de alcoholes: xileno durante 10 min., seguido de alcohol al 100%, alcohol al 75%, alcohol al 50% y alcohol al 20% durante 10 min. cada uno. Finalmente se dispusieron en un frasco de Koplín en PBS durante otros 10 min.

Seguidamente se procedió a descartar el PBS y se agregó 100 ml de metanol con H₂O₂ al 0,3% durante 15 min. para inactivar la actividad endógena de la enzima peroxidasa. Se descartó el metanol y realizaron 3 baños en PBS de 5 min. cada uno.

A continuación se retiraron y secaron las muestras para sembrar 50 µl de suero equino al 10% en PBS/ABS 1% en cada muestra y se las almacenaron durante 15 min. en cámara húmeda. Luego se descartó el suero y realizaron 3 baños con PBS de 5 min cada uno.

En este momento las muestras fueron colocadas en buffer citrato 0,2 g % p/v a 100 °C, durante 5 min. para lograr la recuperación antigénica. Una vez concluida la recuperación se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y se realizaron 3 baños con PBS de 5 min cada uno.

A continuación se retiraron y secaron las muestras para sembrar 50 µl del AcMo sobre cada una y se almacenaron en cámara húmeda. Las muestras se dejaron incubar durante la noche a 4 °C.

Al día siguiente se descartaron los AcMo y se realizaron 3 baños en PBS de 5 min cada uno. Se retiraron las muestras y se secaron para sembra 50 µl del segundo Ac conjugado con peroxidasa y específico para el isotipo del AcMo y se almacenaron en cámara húmeda durante 60 min. El segundo Ac fue descartado y se realizaron 3 baños en PBS de 5 min. cada uno.

La reacción fue revelada aplicando 50 µl de la siguiente preparación sobre cada preparado: 5 ml de PBS, 5 mg de Diaminobencidina (DAB) y 20 µl de H₂O₂ al 30 %. Luego de 15 a 20 min. se descartó la solución de revelado, se lavó en PBS durante 5 min, se coloreó con hematoxilina durante 90 seg y luego se lavó varias veces con agua corriente. A continuación se procedió a la deshidratación en la secuencia de alcoholes: se emplearon alcohol 20%, alcohol 50%, alcohol 75%, alcohol 95%, alcohol 100% y finalmente xilol, cada uno de los pasos de 5 min. de duración.

Finalmente, las muestras fueron montadas en un medio sintético y recubiertas por un cubreobjeto. En la evaluación mediante microscopio óptico se consideró positiva la reacción de más del 5% de las células tumorales del corte histológico. El control negativo se realizó omitiendo el segundo anticuerpo.

Homogenización de tejidos tumorales y separación de fracciones subcelulares

El tejido tumoral, como cualquier otro tejido, se halla compuesto de células parenquimatosas y cantidades variables de tejido conectivo. Para caracterizar una glicoproteína, esta debe ser aislada del resto de los componentes tisulares y celulares indeseados; sin embargo, tratándose de una caracterización inmunológica, no es necesaria una preparación estrictamente pura de la molécula estudiada. Como primer paso se procede al aislamiento de la fracción subcelular que contenga a la molécula en cuestión y para lograr este objetivo se utiliza de forma rutinaria la centrifugación diferencial, separando de forma secuencial todos los componentes celulares, a partir de tejidos previamente homogeneizados.

La homogenización de un tejido consiste en dismantelar la arquitectura tisular que brinda la matriz del tejido conectivo y en provocar la disrupción de la membrana plasmática de la célula neoplásica, obteniéndose una suspensión de restos de matriz, membranas plasmáticas, organelas y citoplasma. Por lo tanto, es de suma importancia eliminar previamente todo material necrótico o de tejido no neoplásico de la pieza histológica que será tratada. Por otra parte, la homogenización se

debe realizar en una solución tamponada, con una relación de cuatro volúmenes por el volumen de la pieza; además es preferible que contenga alguna sustancia inhibidora de las enzimas digestivas que contienen las células, ya que estas enzimas pueden dañar a las moléculas que se intenta aislar.

Existen diferentes formas de lograr la homogenización de un tejido. La elección del método dependerá del volumen de tejido a homogeneizar, la cantidad de tejido conectivo que presenta la pieza histológica y la resistencia de la molécula que se busca aislar. La utilización de la fuerza mecánica es un método sencillo, de bajo costo y que, sobretodo, no daña en demasía a las moléculas estudiadas. Otros métodos como la sonicación o la digestión enzimática presentan la desventaja de no lograr una homogenización completa de este tipo de tejido y, particularmente con el uso de enzimas, se produce cierto grado de digestión de las moléculas de la membrana plasmática. Por último, el producto de la homogenización puede filtrarse o dejarse reposar para que sedimenten los trozos que no han sido degradados completamente.

Luego, en una primera centrifugación, se separan los restos de tejidos no degradados y los núcleos celulares. A partir de la fracción obtenida en el sobrenadante se realiza una segunda centrifugación de alta velocidad en la cual se logra sedimentar las membranas plasmáticas y microsomas, separándolas del citoplasma celular. A continuación se describe el protocolo utilizado:

Protocolo de homogenización tisular

Las muestras de tejido tumoral se seccionaron en trozos de no más de 1 mm³ y fueron colocadas en buffer de lisis (fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM en TRIS 10 mM, pH 7,4). A continuación se realizó la homogeneización mecánica a 4 °C utilizando un homogenizador Politron PT1200 (Kinematica) efectuando 3 o 4 ciclos de 1 minuto cada uno, según la composición del tumor. Se filtró el homogenado obtenido a través de una malla metálica para remover restos de tejido.

Los homogenados fueron centrifugados a 1500 rpm durante 15' y se almacenó el pellet obtenido a -20° C como "fracción nuclear". Se centrifugó el sobrenadante a 45000 rpm durante 30' a 4° C y se almacenó el pellet obtenido a -20° C como "fracción de membranas extranucleares" y el sobrenadante como "fracción citoplasmática".

Medición de concentración de proteínas (Método de Lowry)

En una mezcla de proteínas se puede estimar la concentración de las mismas empleando la técnica de Lowry, la cual por medio de una reacción química permite detectar la unión de átomos de Cu^{++} al esqueleto de enlaces peptídicos que estas presentan. La intensidad del color azul que toma la muestra en estudio se mide por medio de un espectrómetro a 750 nm y empleando soluciones con diferentes concentraciones conocidas de albúmina es posible construir una curva estándar contra la cual comparar los valores obtenidos con las muestras.

Protocolo de medición de concentración de proteínas (Método de Lowry)

1. Se preparó una solución de 0,5mg/ml de albúmina en agua destilada, empleada como estándar de referencia y una solución de NaOH 0,1M empleada como buffer.
2. En un tubo de ensayo se mezclaron 1 ml de sulfato de cobre 2% p/v, 1 ml de tartrato de sodio potásico 4% p/v y 48 ml de carbonato de sodio 0,2 M en NaOH 0,1M.
3. Se prepararon tubos de vidrio con 100 ul de muestra problema por duplicado, más seis tubos con diluciones de la solución estándar y un blanco (0,5 – 0,4 – 0,3 – 0,2 – 0,1 y 0) por duplicado. Se agregaron 100 ul de solución buffer de NaOH y 500 ul de la solución obtenida en el punto 2. Se agitó e incubó durante 30 minutos.
4. A los tubos anteriores se agregaron 50 ul de reactivo de Folin y Ciocalteau, se agitó nuevamente e incubó durante 30 minutos.
5. Finalmente se leyó en un espectrofotómetro la absorbancia a 750 nm, se restó la hallada en el blanco y se calculó la concentración a partir de la curva de concentraciones conocidas

Centrifugación en gradientes de Cloruro de Cesio

Otro método más complejo para aislar glicoproteínas para su estudio es la centrifugación en gradientes de densidad; consiste en una columna de fluido que sirve de soporte y cuya densidad aumenta hacia el fondo del tubo; el fluido es una solución que posee un solvente de bajo peso molecular (como son el cloruro de Cesio y la guanidina clorhídrico) donde la muestra que se pretende centrifugar puede ser disuelta con facilidad.

Existen dos variantes del método de centrifugación en gradientes de densidad; en la primera, denominada técnica de fraccionamiento zonal, la muestra problema se aplica sobre un gradiente preestablecido y mediante la fuerza de centrifugación las distintas moléculas migran según su tamaño. Otra es la técnica “isopícnica”, la que se logra generando un gradiente de densidades en una columna de fluido que abarque todas las densidades que posean las moléculas de la muestra, o bien, a partir de una solución de densidad uniforme la que, sometida con la muestra a la fuerza centrífuga, se distribuye formando gradientes. De una u otra forma, se logran gradientes de densidad en los cuales la molécula sedimenta o flota hasta su posición isopícnica.

La separación puede llevarse a cabo en centrífugas con rotores tanto de ángulo fijo como móviles. Los primeros tienen la ventaja de presentar una mejor resolución al poseer una sección de corte mayor y, por otra parte, pueden procesar volúmenes mayores.

Protocolo de centrifugación en gradientes de CsCl

- 1) Se diluyeron las alícuotas obtenidas por medio de la centrifugación diferencial de las muestras tumorales, con una solución de guanidina HCl 4M y NP40 0.1%
- 2) Se preparó la cantidad necesaria de tubos de elevada transparencia (Beckman Instruments, USA) con 12 ml de una solución de CsCl 42% p/p y guanidina HCl 6M con una densidad inicial de 1.498 mg/ml.
- 3) Se dispuso una capa de 200 μ l de las muestras sobre la columna de CsCl y Guanidina HCl.

- 4) Se centrifugaron a 40000 rpm durante 66 hs. a 10° C.
- 5) Finalmente se fraccionó con pipeta el gradiente de densidad obtenido y se calculó la densidad de cada una de ellas.

SDS-PAGE

La separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) ha sido desde su creación un método sencillo, de muy alta resolución, capaz de procesar varias muestras al mismo tiempo y que ha sufrido muy pocas variaciones en sus protocolos básicos. Este método se basa en el hecho de que un grupo cargado eléctricamente migrará al ser expuesto a una corriente eléctrica. Una proteína en solución con un pH distinto a su punto isoeléctrico posee una carga determinada y migrará en el campo eléctrico dependiendo de la densidad de su carga, es decir, la relación entre el número de cargas y su peso.

El medio que empleamos sirve de soporte para la electroforesis es un gel inerte de poliacrilamida que confiere las propiedades particulares de este tipo de separación. Los geles de poliacrilamida presentan en su estructura poros cuyo tamaño interfiere con la migración de las proteínas en el campo eléctrico, así la separación pasa a depender en gran medida del tamaño de los mismos. El tamaño de estos poros depende de las concentraciones de las moléculas que forman el gel durante la polimerización: los monómeros de acrilamida, que forman largas cadenas no ramificadas, y la bisacrilamida que tiende puentes entre las cadenas mencionadas. Por lo tanto al variar las concentraciones de sus componentes se pueden obtener geles con poros de distintos tamaños e incluso gradientes en el tamaño de los poros.

El sistema de electroforesis se dispone de la siguiente manera. En reservorios separados se colocan un ánodo y un cátodo inmersos en un buffer de TRIS y glicina, entre los reservorios se coloca el gel, de manera que la corriente eléctrica lo atraviese de un extremo hasta el otro,

realizando en el borde próximo al ánodo una serie de pequeños pozos que permitan cargar las muestras.

El sistema de electroforesis puede operarse en condiciones “disociantes” o “no disociantes”. Previo a la electroforesis las muestras proteicas son expuestas a concentraciones elevadas de un detergente iónico como el dodecil sulfato sódico (SDS) y calentadas a una temperatura de 100 °C durante unos minutos. En estas condiciones desnaturalizamos las proteínas las que se unen a las moléculas de SDS en un radio constante de 1,4 gramos de SDS por gramo de proteína. La ventaja de este procedimiento radica en que las moléculas recubiertas con SDS presentan una carga eléctrica negativa tan elevada que tornan insignificantes las presentes en la proteína sin tratar, por lo tanto al ser sometidas a la electroforesis migran según su peso molecular casi con exclusividad. Entonces es posible determinar el peso molecular relativo de una proteína al comparar las distancias de migración de una molécula de peso desconocido con otra cuyo peso molecular ya ha sido determinado. Si se desea, puede sumarse al tratamiento con SDS un agente tiol reductor que rompa los enlaces de puente de disulfuro para obtener una separación completa de las subunidades proteicas, si éstas las tuvieran.

Para mejorar la resolución en la separación de las proteínas preparamos los geles en forma “discontinua”, presentando en la primera porción de los mismos una baja concentración de acrilamida lo que genera poros de gran tamaño. Esta región de “*stacking*” no permite una separación fehaciente, pero logra un reordenamiento de los componentes de la muestra de manera tal que al enfrentar la zona de resolución la composición de las moléculas vecinas es homogénea.

La separación electroforética en geles de poliacrilamida de glicoproteínas de alto peso molecular, como son las mucinas, presenta diversas dificultades. Primero, tanto las formas maduras como inmaduras de las mucinas poseen un muy alto peso molecular, obteniéndose una muy escasa migración que afecta la capacidad de definición del sistema. Segundo, las mucinas se hallan densamente glicosiladas pudiendo presentar en sus cadenas laterales de carbohidratos grupos con

cargas eléctricas negativas, las que representan una carga intrínseca tan importante que impiden realizar con precisión el cálculo de su peso molecular relativo. Sin embargo, siempre que se mantengan las mismas condiciones, la distancia de migración de estas moléculas es aproximadamente constante.

Finalmente el carácter altamente polimórfico de las mucinas provoca pequeñas diferencias de peso entre una molécula y otra, fenómeno que se expresa como un ensanchamiento o una falta de definición de las bandas obtenidas.

Protocolo de SDS-PAGE

Las fracciones subcelulares obtenidas por homogenización y centrifugación diferencial, las obtenidas por centrifugación en gradientes de cloruro de cesio, así como las fracciones eluidas de la cromatografía en sefarosa CL-4B se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida. Las muestras fueron preparadas según procedimientos estándares, siendo desnaturalizadas en presencia de SDS 2% v/v y de un agente tiol (2-mercapto etanol 5% v/v) que reduce los puentes disulfuro. Para establecer el peso molecular de las bandas se aplicaron estándares que cubrieron un amplio espectro de los mismos (Sigma prestained high molecular weight standard “7B”).

Se prepararon mini geles discontinuos con una concentración de 4 y 10% de acrilamida para los segmentos de “stacking” y “resolving” de 1,5 mm de espesor y se sembraron entre 50 y 100 μ g de la mezcla de proteínas en el volumen necesario. La corrida electroforética se realizó en un equipo Gibco V8.0 (Life Technologies, USA) a 100 voltios constantes, durante el tiempo necesario para que el frente de la corrida alcance el extremo inferior del gel (90 minutos aproximadamente).

Western-Blot

Una vez separadas las moléculas por medio de SDS-PAGE se transfirieron a un soporte adecuado para proceder a la inmunodetección de los antígenos buscados. La técnica de Western

Blot (WB) que empleamos consiste en la electro transferencia (blotting) de proteínas resueltas en geles hacia membranas con una gran capacidad de adsorción, tales como las membranas de nitrocelulosa (NC).

El método consiste en enfrentar el gel y la membrana separando dos reservorios, en cada uno de los cuales se inserta un cátodo o un ánodo. Para facilitar la transferencia se utiliza un buffer que contiene metanol el cual, además de facilitar la adsorción de las proteínas a las membranas de nitrocelulosa, elimina las moléculas de SDS permitiendo de esta manera la renaturalización de las proteínas conservando los epitopes conformacionales. Por otra parte, el metanol impide el hinchamiento de los geles evitando artefactos inconvenientes.

La corriente eléctrica genera un campo por el cual las proteínas migran del gel a la membrana en la que quedan fijas. Una vez transferidas se procede a bloquear los espacios de membrana de NC que no hallan adsorbido material; se utilizan diversas proteínas antigénicamente no relacionadas con las proteínas en estudio, como puede ser la albúmina sérica bovina.

La detección inmunológica de las proteínas transferidas se realiza por medio de anticuerpos y se utilizan diversos sistemas para generar una señal que revele la presencia del antígeno, similares a los descriptos para la técnica de inmunohistoquímica. En los estudios realizados en este trabajo de Tesis hemos utilizado anticuerpos monoclonales dirigidos contra diversos epitopes y un segundo anticuerpo unido de forma covalente a peroxidasa, de manera tal que actúen sobre un sustrato cromógeno el cual se torna visible (diaminobencidina). Se describe a continuación el protocolo empleado durante los experimentos realizados.

Protocolo de Western Blot

Las corridas obtenidas por medio de SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente desde el gel hacia membranas de NC utilizando el mismo equipo de electroforesis. Debido al elevado peso molecular de las moléculas estudiadas la transferencia se realizó a 150 mili Amp constantes durante

2 horas. A continuación procedimos al bloqueo de uniones inespecíficas de los anticuerpos con TRIS – ABS 3% p/v durante 3 horas en agitación a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C.

Luego de ser lavadas con TRIS – Na⁺ Cl⁻ las membranas de nitrocelulosa se incubaron con el panel de anticuerpos monoclonales detallado en la Tabla 1 durante 16 hs. A continuación las membranas fueron incubadas con el segundo Ac Mo conjugado a peroxidasa y dirigido contra el primero. Después de ser lavadas con TRIS – Na⁺ Cl⁻ la reacción fue revelada con una solución de diaminobencidina 0,05% en TRIS 10 mM y peróxido de hidrógeno hasta completar la reacción. Finalmente las imágenes de las membranas fueron digitalizadas para su posterior evaluación.

Tratamiento con neuraminidasa

La neuraminidasa de *Clostridium perfringens* es una enzima de 64 a 66 kD de peso molecular capaz de cortar los enlaces α 2-3, α 2-6 y α 2-8 del ácido siálico con otros azúcares presentes en glicoproteínas o glicolípidos y puede ser utilizada para el estudio del reconocimiento antigénico por parte de AcMo.

Una selección de muestras estudiadas por inmunohistoquímica así como las fracciones subcelulares obtenidas por homogenización y centrifugación diferencial fueron sometidas al tratamiento con neuraminidasa tipo V de *Clostridium perfringens* (SIGMA, USA) en buffer acetato 0.1 U/ml, pH 5.5 durante 2 horas y a 37 °C.

En el caso de la inmunohistoquímica el tratamiento con neuraminidasa precedió a la incubación con el AcMo, mientras que las fracciones subcelulares la incubación se realizó previamente a la desnaturalización de las muestras y con agitación suave.

Enzyme Link Immunosorbent Assay (ELISA)

La técnica de ELISA consiste en un ensayo inmunológico realizado sobre fase sólida ampliamente utilizado para determinar la presencia de antígenos o anticuerpos en muestras de los

más variados orígenes. Por su versatilidad, robustez y bajo costo ha sido ampliamente utilizado tanto en el laboratorio de investigación como en el laboratorio clínico. La técnica se basa en la obtención de una señal de color originada en la actividad de distintas enzimas unidas a anticuerpos sobre sus sustratos; dicha señal es proporcional a la cantidad de anticuerpo unido a su antígeno. Resumidamente podemos mencionar dos tipos de ELISA, aquellos en que la enzima se encuentra conjugada al anticuerpo trazador (directos) y en los que la enzima se encuentra conjugada en un segundo anticuerpo, dirigido contra el trazador (indirectos).

Cancer Associated Serum Antigen (CASA)

CASA es un kit comercial diseñado para la detección de MUC1 circulante en suero de pacientes portadores de cáncer. Consiste en un ensayo de ELISA de doble determinante o en “sandwich”, donde el suero problema es incubado en placas de 96 pozos cubiertas con el AcMo BC2 (IgG). Si MUC1 se encuentra presente en el suero se unirá al BC2 y posteriormente se detectará su presencia por medio del AcMo BC3 (IgM). Ambos AcMo reconocen la secuencia peptídica APDTR presente en el centro proteico de MUC1 y aprovechan la presencia de repeticiones en tandem para generar una señal detectable. Cada kit posee sus propios controles positivos y negativos, con una capacidad para 40 determinaciones.

Protocolo de CASA

- 1) Se agregaron 75 uL de solución “diluyente” a las microplacas y luego 25 ul de suero problemas, por duplicado. Las muestras se incubaron 60 min. a temperatura ambiente
- 2) Se lavaron las placas 3 veces con solución de “lavado” y se agregaron 100 ul del AcMo BC3 en cada pozo y se incubaron 30 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- 3) Se lavaron las placas 3 veces con solución de “lavado” y se agregaron 100 ul del Ac conjugado anti-ratón en cada pozo; luego se incubaron 30 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda.

- 4) Se lavaron las placas 3 veces con solución de “lavado” y se agregaron 100 ul de “substrato” anti-ratón por pozo y se incubaron 15 min. a temperatura ambiente.
- 5) La reacción se detuvo agregando 100 ul de la solución de “stop” a cada pozo y a continuación se procedió a la lectura de la microplaca a 405 nm.
- 6) Se construyó una curva con los valores de referencia y a partir de ellos se calcularon los valores de los controles y las muestras.

Precipitación de CIC en PEG 3,5%

Existen diversos métodos útiles para la detección de complejos inmunes circulantes. La mayoría de ellos se basan en las características fisicoquímicas particulares que presentan los complejos o en las propiedades especiales de la fracción constante de la inmunoglobulina.

La precipitación de complejos inmunes en polietilenglicol es un método sencillo y económico que logra el aislamiento de grandes cantidades de material para realizar otro tipo de estudios, ya sea sobre la fracción antigénica o la fracción de inmunoglobulina. Por otra parte, utilizando un espectrofotómetro, puede calcularse el valor de la absorbancia a 280 nm, lo que permite obtener una medida semi-cuantitativa de los niveles de complejos inmunes circulantes.

Protocolo de Precipitación de CIC en PEG 3,5%

En tubos de ultra centrífuga se diluyó 100µl de suero en la siguiente solución: Buffer Borato (BB) 900µl y PEG 6000 (Fluka) 7% (en BB) 1000µl. Se agitó en vortex y se colocó a 4°C durante 18 hs.

A continuación se centrifugó a 8000 rpm durante 30 min. a 4°C. y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en PEG 6000 3,5 % w/v (2000µl por cada 100µl de suero) y se centrifugó a 8000 rpm durante 30 min. a 4°C. Se descartó el sobrenadante, dejando secar en forma invertida.

El pellet obtenido fue resuspendido en PBS 1000 μ l (para análisis por WB, almacenado a 4°C para su uso inmediato o a -20°C para uso posterior) o en Na OH 0,1 % w/v (para lectura en espectrofotómetro, absorvancia a 280 nm).

Cromatografía de afinidad en columna de Sefarosa CL-4B y proteína A.

La proteína A derivada del *Staphylococcus aureus* tiene la propiedad de unir de forma específica la fracción Fc de diversas inmunoglobulinas humanas. Posee una alta afinidad por las subclases 1,2 y 4 del isotipo IgG y el sistema formado con la sefarosa CL-4B posee una capacidad de unión de 20 mg/ml, aproximadamente.

La unión de la fracción Fc a la proteína A es sensible a variaciones en el pH del medio, fenómeno que puede ser utilizado para separar al complejo en el momento que sea adecuado. Inmovilizada sobre el soporte de sefarosa CL-4B, la proteína A puede ser utilizada para el aislamiento de las inmunoglobulinas y, a su vez, los antígenos que se encuentren formando complejos inmunes.

Protocolo de cromatografía en columna de Proteína A – Sefarosa CL-4B

Previamente a la cromatografía se lavó la columna con PBS (10 volúmenes de columna [VC]). Una vez acondicionada la misma se agregaron las proteínas obtenidas por precipitación en PEG 3,5% y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la columna con PBS (10 VC) y se fraccionó el eluido (Fracción PBS). Seguidamente se agregó buffer glicina HCl, pH 2,8, se incubó durante 30 min y se eluyó y fraccionó con glicina HCl (10 VC) (Fracción glicina HCl).

Finalmente las fracciones obtenidas fueron leídas en un espectrofotómetro (absorbancia a 280 nm) para constatar la presencia de proteínas. Las fracciones obtenidas fueron dializadas contra PBS, concentradas y guardadas a -20°C hasta su utilización.

Cultivo de Tejidos

Recolección de muestras de tejido tumoral

Se realizó preservando las condiciones de temperatura y en medio de transporte adecuado, suplementado con antibióticos, antifúngicos y agentes detoxificantes para aumentar la viabilidad de las muestras.

Cultivo primario

Técnica de explantos: Una vez obtenida la muestra se colocó en una cápsula de Petri, eliminando el material necrótico, contenido sanguíneo y grasa. A continuación se cortaron trozos de no más de 1 mm³, los cuales fueron transferidos a un tubo de centrifuga y lavados con solución salina. Sobre la superficie de un frasco de cultivo previamente humedecida con medio de cultivo completo se colocaron unos 20 trozos por cada 25 cm²; se invirtió el frasco y se lo colocó en una estufa de cultivo a 37° C, con una concentración de CO₂ de 5%, durante 3 hs. Luego se eliminó el medio de cultivo con los trozos no adheridos, se volvió a invertir el frasco y se agregó nuevo medio de cultivo. Después se examinó el frasco cada 24 horas y cuando los explantos se adhirieron se completó con medio de cultivo fresco. Finalmente cuando las células comenzaron a migrar en abundancia del explanto, éste se eliminó y se consideró que el cultivo estuvo listo para ser transferido a otros frascos al alcanzar el 75% de la superficie cubierta.

Disgregación enzimática: Se cortó el tejido de forma similar a la utilizada en la técnica de explantos y se colocaron los trozos en una solución de medio de cultivo completo a la que se agregó distintas enzimas: colagenasa, ADNasa, elastasa, tripsina, etc. Los trozos se colocaron en agitación leve a intervalos de 2 horas y a distintos tiempos de incubación se obtuvieron poblaciones celulares que fueron centrifugadas y lavadas.

Cultivo in vivo: Fragmentos de tejidos de no más de 1 mm³ o suspensiones de células obtenidas por disgregación enzimática fueron inyectados por distintas vías en ratones atímicos. Esta

forma de mantenimiento de líneas tumorales provee una fuente in vivo de células y por otra parte, facilita los cultivos in vitro posteriores al discriminar y seleccionar células. Otra consecuencia es la posibilidad de estudiar antígenos tumorales en el líquido ascítico. El desarrollo tumoral en ratones atómicos permite determinar la tumorigenicidad de cada implanto.

Pasajes y mantenimiento de líneas

Utilizando el medio de cultivo adecuado para cada línea celular y una vez alcanzado el grado de confluencia, los cultivos en monocapa luego de ser lavados se desprendieron con 5 ml de una solución de tripsina 0,25% v/v y ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 0,5 mM. Las células desprendidas fueron lavadas y se procedió a realizar un recuento con azul trypan; finalmente se colocaron en frascos nuevos con medio de cultivo fresco.

La línea celular MCF7 se cultivó utilizando *minimum essential medium (Eagle)* con L-glutamina 2 mM y bicarbonato de sodio 1.5 g/L, suplementado con amino ácidos no-esenciales 0.1 mM, piruvato de sodio 1 mM, insulina bovina y suero fetal bovino al 10% v/v. La temperatura de incubación fue a 37°C en una atmósfera de aire 95% y CO₂ 5%. La fracción para subcultivos utilizada fue de 1:3, realizando pasajes 2 veces por semana.

Congelamiento

Para almacenar células por períodos prolongados de tiempo se las suspendió en un medio de congelamiento suplementado con suero fetal bovino y glicerina. Así, un número mínimo de 5×10^6 células por ml pudo ser almacenado en tanques de nitrógeno líquido a -197° C.

Análisis estadístico

Los datos clínicos y los resultados obtenidos los presentamos en tablas resumen.

Se calcularon datos estadísticos descriptivos de tendencia central y dispersión (media aritmética y desvíos estándares) que se muestran en gráficos e informamos en el texto.

Los datos fueron tratados con test paramétricos y no paramétricos según correspondía. Se realizó una estandarización de aquellos datos que fueron sometidos a análisis multivariado.

Entre los test utilizados se incluyen: ANOVA con contrastes de t de Student, Kruskal Wallis para hallar diferencias significativas entre grupos, correlaciones múltiples con el objetivo de verificar interrelación entre variables, Análisis de Componentes Principales para hallar las variables más significativas para la distribución de los casos y análisis discriminante para verificar la correcta agrupación de los casos de acuerdo a las distintas variables. En todos los casos se consideró un riesgo aceptado de $p < 0,05$. (Zar JH, 1996)⁹ Se emplearon los programas estadísticos de Excel (Microsoft) y Statistica (StatSoft). El análisis utilizado en cada caso se especifica en cada sección de esta tesis junto con los resultados.

⁹ Zar JH, *Biostatistical Análisis*, 3rd Ed. Prentice Hall, New Jersey; pags. 662.

INDICE DE LOS RESULTADOS

Distribución de los pacientes de acuerdo a la edad, sexo y estadio de la enfermedad.	108
Expresión antigénica.....	110
Aislamiento de MUC1 en homogenizados de tumor.....	126
Análisis por SDS-PAGE y Western Blot de fracciones subcelulares de tejido tumoral de pacientes con CECC	128
Análisis del efecto del tratamiento con neuraminidasa sobre la expresión de MUC1 y los antígenos Tn y sTn en el CECC.	130
Medición de MUC1 sérica en pacientes con CECC	131
Respuesta inmune humoral en pacientes con CECC.....	134
Medición de niveles de complejos inmunes circulantes (CIC)	134
Comparación de los niveles de CIC en pacientes portadores de CECC según la localización y diferenciación tumoral.	136
Comparación de los niveles de CIC en pacientes portadores de CECC según el estadio clínico tumoral.....	136
Aislamiento de complejos inmunes circulantes y análisis de la fracción antigénica	138
Cultivo primario de tejidos de CECC	140

RESULTADOS

Distribución de los pacientes de acuerdo a la edad, sexo y estadio de la enfermedad.

Con el fin de analizar las características clínicas de los pacientes se realizó un Análisis de Componentes Principales el cual incluyó las variables clínicas de los pacientes como independientes (sexo, edad y estadio clínico) diferenciando a los pacientes según su localización (Figura 5). En el gráfico puede apreciarse la distribución de las distintas variables (las cuales se representan como vectores) y la dispersión de las observaciones, es decir los pacientes (los cuales se representan por puntos y se diferencian según su localización; LA=laringe, FA=faringe y CO= cavidad oral).

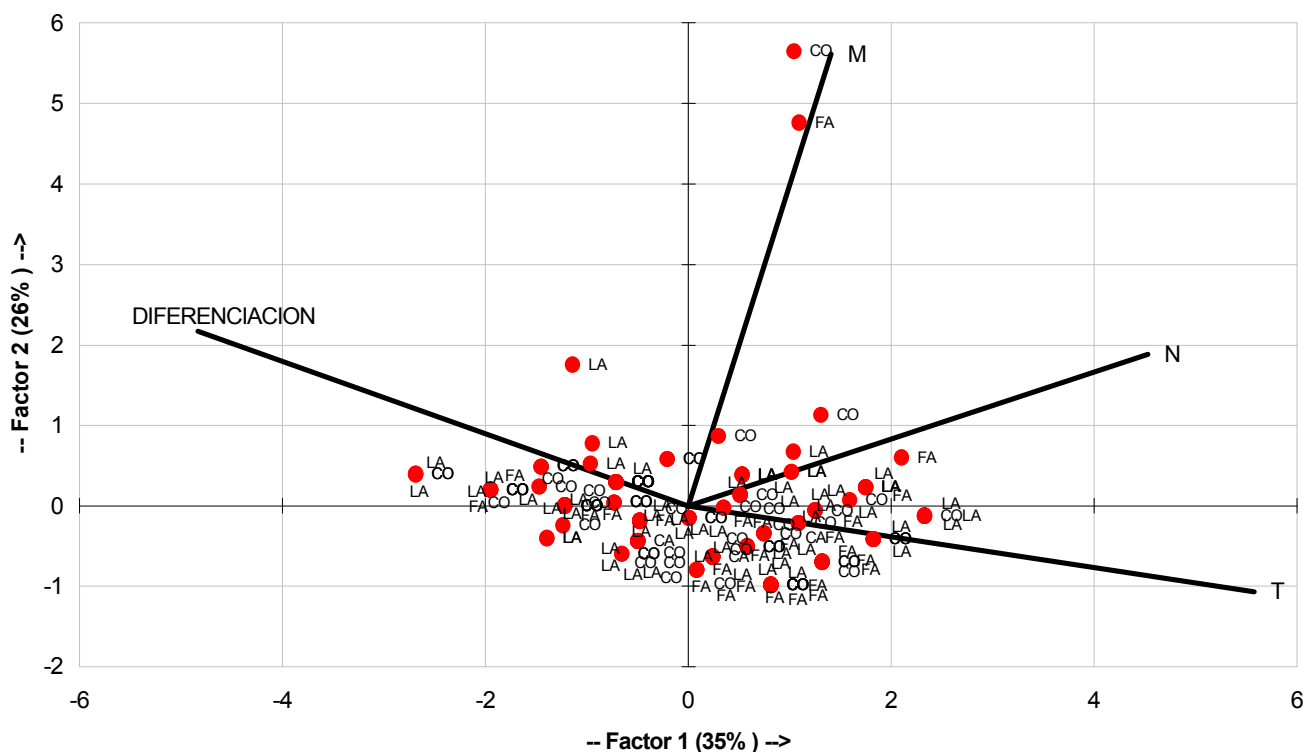
Empleando el Análisis de Componentes Principales se obtienen una serie de factores que resumen y explican las variaciones entre las observaciones (en este caso los pacientes) y son tantos como variables se emplean en el modelo. A partir de los dos factores principales (Factor 1 y Factor 2) hemos construido un gráfico de coordenadas donde el *eje x* representa al Factor 1 y el *eje y* representa al Factor 2. Los cuadrantes obtenidos por la intersección de los factores se denominan según el signos de los mismos, así se obtienen 4 cuadrantes (+/+), (+/-), (-/+ y (-/-). El porcentaje incluido con cada factor representa la proporción de las variaciones observadas en el modelo que dicho factor es capaz de explicar.

Una vez incorporado al gráfico, la longitud de cada vector representa la importancia de esa variable para el modelo, es decir cuanto mayor es la longitud del vector, mayor será la proporción de las variaciones que el mismo explique, en tanto que vectores de escasa longitud representan variables de menor importancia. La proximidad del vector al *eje x* (Factor 1) o *eje y* (Factor 2) representa a su vez la correlación que los mismos presentan con los factores, así como la proyección de los mismos sobre estos ejes demuestra el peso de la variable sobre cada factor.

En este caso podemos observar una escasa dispersión de los pacientes al clasificarlos según su localización. Dicha dispersión se orienta principalmente sobre el eje formado por los vectores

que representan la diferenciación tumoral y el estadio T, los cuales por otra parte, presentan una clara correlación negativa ($r=-0,262$; $p<0,05$), es decir que a menor diferenciación tumoral mayor es el estadio T. Por otra parte, una proporción importante de los pacientes portadores de tumores localizados en la faringe se localizan en el cuadrante inferior derecho (+/-) demostrando que se trata de tumores de gran tamaño e indiferenciados. No se observan diferencias respecto de las otras dos localizaciones. Finalmente, se observa una correlación positiva entre las variables de los estadios tumorales T y N ($r=0,212$; $p<0,05$), cuyos vectores se proyectan sobre el factor 1, siendo el estadio T de mayor peso.

Figura 5: Análisis de Componentes principales de la contribución relativa de los parámetros clínicos de los pacientes portadores de CECC representados por los ejes X (Factor 1) e Y (Factor 2). Las muestras de los pacientes se encuentran identificadas según la localización tumoral y representadas por puntos.



CO=Cavidad Oral; LA=Laringe; FA=Faringe

Expresión antigénica

Análisis por inmunohistoquímica de la expresión antigénica en el CECC

Con el objetivo de estudiar la expresión de los antígenos asociados a tumores en el CECC se emplearon los anticuerpos que reconocen distintos epitopes de MUC1 y de los antígenos carbohidratos del Grupo Lewis o asociados a mucinas.

AcMo C595

El análisis por inmunohistoquímica de los tumores primarios de cabeza y cuello con el anticuerpo C595 (dirigido contra el centro proteico de MUC1) mostró 38 muestras positivas sobre 131 totales (29,0%). La reacción con dicho anticuerpo se localizó principalmente en la membrana plasmática de las células que presentaban mayor grado de diferenciación. En los tumores que presentaron un patrón de crecimiento en islas o nódulos la reacción con C595 se localizó hacia el centro de estructuras estratificadas es decir áreas delimitadas con signos de queratinización. En 8 de las 38 muestras positivas (21%) pudo observarse además de la reacción en la membrana plasmática, la tinción del citoplasma celular, generalmente en forma de pequeñas vesículas. (Figura 6)

La expresión del AcMo C595 mostró las siguientes diferencias en cuanto a la localización tumoral. Se registraron 19 casos positivos (30,6%) sobre 62 muestras provenientes de tumores de la cavidad oral. Dentro de los tumores de la cavidad oral los ubicados en el borde o base de la lengua mostraron niveles superiores (55%) a los pertenecientes a tumores de labio, mucosa yugal, seno maxilar, piso de boca o trígono retromalar (15%).

Los tumores ubicados en la laringe fueron positivos en 13 (29,5%) sobre 44 casos. No fue posible definir las diferencias entre los tumores pertenecientes a la glotis, supraglotis o subglotis ya que la mayoría de los tumores se encontraban en estadios avanzados y ocupaban más de una región.

Las regiones de orofaringe y nasofaringe mostraron niveles inferiores en la expresión de C595 con 6 casos positivos (27,3%) sobre 22 totales. Sin embargo, en líneas generales no se observan diferencias en cuanto a la localización y la expresión de MUC1 evaluada a través de C595.

Ac CT33

El tipo de expresión de la cola citoplasmática de MUC1 resultó más heterogéneo que el hallado con C595; en principio, fue posible observar marcación con predominio en la membrana plasmática (lineal), patrones de expresión mixtos en membrana y citoplasma (mixto) y finalmente en el núcleo (nuclear).

Sobre 131 muestras totales, 103 mostraron algún tipo de reacción, es decir el 78,6%. La expresión más frecuente resultó de la combinación de señales positivas en membrana y citoplasma (78,8%), observándose tinción del citoplasma o nuclear exclusiva sólo en 12 muestras (11,7%). La tinción con CT33 pudo ser advertida tanto en áreas con presencia de queratinización, así como áreas de células de aspecto semejante a las basales.

Los niveles de positividad con CT33 fueron superiores a los de C595 en todas las localizaciones manteniendo las escasas diferencias observadas; en la cavidad oral 52 sobre 62 casos fueron positivos (83,9%), en la laringe 34/44 (77,3%) y en la faringe la proporción fue menor 15/22 (68,2%).

AcMo KM93

La detección del epítopo sialil Lewis x con el AcMo KM93 se observó en 30 sobre 131 casos (22,9%). El patrón de reacción con este anticuerpo también se caracterizó por la presencia de reacción intensa a nivel de la membrana plasmática y muy rara vez en el citoplasma celular.

La expresión de KM93 en las diferentes localizaciones sigue una distribución muy semejante a la presentada por C595 con niveles mayores en la cavidad oral (24,2%) y la laringe

(25%) que en la faringe (18,2%). A diferencia de C595, no se observaron diferencias entre los tumores ubicados en la lengua y las otras sub-localizaciones de la cavidad oral.

AcMo KM380

El epítoto Lewis x fue, junto al Lewis y, el de mayor detección en los tumores de cabeza y cuello. Se hallaron 58 muestras positivas sobre 131 totales (44,3%). Las reacciones positivas fueron por lo general muy intensas, abarcando amplias áreas del tejido tumoral. El patrón de tinción fue predominante en la membrana plasmática, pero también pudo observarse una tinción citoplasmática con características vesiculosas. (Figuras 7 y 8)

La expresión de KM380 con respecto a la localización tumoral comparte los mismos patrones observados con los anticuerpos anteriores, con niveles superiores en la cavidad oral (53,2%) y laringe (38,6%) que en la faringe (36,4%). Los tumores localizados en la lengua mostraron niveles levemente superiores (56%) al resto de la cavidad oral (43%).

AcMo C14

El epítoto Lewis y fue detectado en 51 muestras sobre 131 (38,9%) coincidiendo en más del 70% de las veces con la expresión de Lewis x. La membrana plasmática fue el sitio que presentó mayor reacción, aunque también pudieron observarse numerosas muestras con tinción citoplasmática. (Figura 9)

En cuanto a la localización tumoral, se hallaron niveles elevados de expresión en cavidad oral (41,9%) y laringe (38,6%) y niveles inferiores en faringe (31,8%). Los tumores de lengua mostraron niveles superiores (50%) a los evidenciados en el resto de la cavidad oral (34%).

AcMo Tn

Se hallaron tan sólo cinco casos positivos (3,8%) con el AcMo anti-Tn. Los tumores que expresaron el epítoto Tn se localizaron en la cavidad oral (4) y en la laringe (1). En general la expresión se redujo a grupos aislados de células. (Figura 10)

AcMo sTn

Utilizando el AcMo anti- sialil Tn se hallaron 8 casos positivos sobre 131 totales. La forma de expresión fue variable, presentándose casos con expresión restringida a la membrana plasmática y otros con expresión predominante en el citoplasma celular, pero siempre en grupos aislados de células. Seis de los 8 tumores positivos para sTn se localizaron en diversos sitios de la cavidad oral y los restantes uno en la laringe y el otro en la faringe. Los resultados resumidos pueden apreciarse en la tabla 10.

Tabla 10: Tabla de frecuencias totales y relativas porcentuales de la detección de la expresión antigénica evaluada por medio de IHQ en pacientes portadores de CECC primario (n=131)

Antígenos	Anticuerpo	Positivos	Porcentaje
MUC1-CT (total)	CT33	103	78,6
MUC1-CT (mixto)	CT33	77	58,8
MUC1-CT (lineal)	CT33	91	69,5
MUC1-CT (citoplásmico)	CT33	87	66,4
MUC1-CT (nuclear)	CT33	18	13,7
MUC1-extracelular	C595	38	29,0
Sialil Lewis x	KM93	30	22,9
Lewis x	KM380	58	44,3
Lewis y	C14	51	38,9
GalNAc	a-Tn	5	3,8
Sialil GalNAc	a-STn	8	6,1

Expresión antigénica en muestras obtenidas de recidivas tumorales o metástasis ganglionares

Tanto en las recidivas como en el tejido tumoral metastásico la forma de expresión de los antígenos estudiados no presentaron variaciones (Figuras 7 y 8) pero sí fue posible observar un menor nivel de expresión en cuanto al número de muestras positivas, particularmente respecto de los anticuerpos que reconocen a MUC1, tanto su porción extracelular como la cola citoplásmica. Estas diferencias no resultaron significativas en los ganglios linfáticos metastasicos comparados con el tumor primario, sin embargo sí resultaron significativas al analizar las diferencias de expresión de

CT33 lineal (cola citoplasmática de MUC1 en la membrana plasmática) entre tumores primarios y tumores recidivantes ($p=0,001$).

Expresión antigénica en muestras de epitelio normal y lesiones preneoplásicas

Se observó reacción positiva con el AcMo C595, dirigido contra el centro proteico de MUC1, en 5 de 8 muestras controles empleadas (62%). La reacción consistió en la presencia de marcación en las capas superficiales de los epitelios y en dos ocasiones, se observó una reacción leve en las células basales. La cola citoplasmática de MUC1 también fue hallada en 5/8 (62%) muestras y mostró un patrón de expresión lineal en membrana plasmática pero con una distribución heterogénea que abarcó tanto al estrato basal, espinoso y superficial (Figura 11A). No se observó en ningún caso marcación del citoplasma celular o a nivel nuclear.

Por otra parte, los antígenos del grupo Lewis mostraron una marcación más heterogénea, abarcando áreas más amplias del epitelio, particularmente en el estrato espinoso y en las capas superficiales. Los antígenos Tn y sialil Tn fueron demostrados en 3 de 8 pacientes (37%), siempre restringidos a las capas basales y parabasales del epitelio.

Las lesiones preneoplásicas fueron obtenidas de biopsias clínicamente identificadas como leucoplasias y resultaron en su mayoría displasias. La expresión de los anticuerpos que reconocen MUC1 fue similar a la observada en las muestras normales, predominando la marcación a nivel superficial. Los antígenos del grupo Lewis no mostraron diferencias con las muestras de epitelio normal, a excepción de *Lewis* y el cual tan sólo fue hallado en 1 de 5 muestras. Los antígenos Tn y sialil Tn no fueron hallados en este tipo de lesiones.

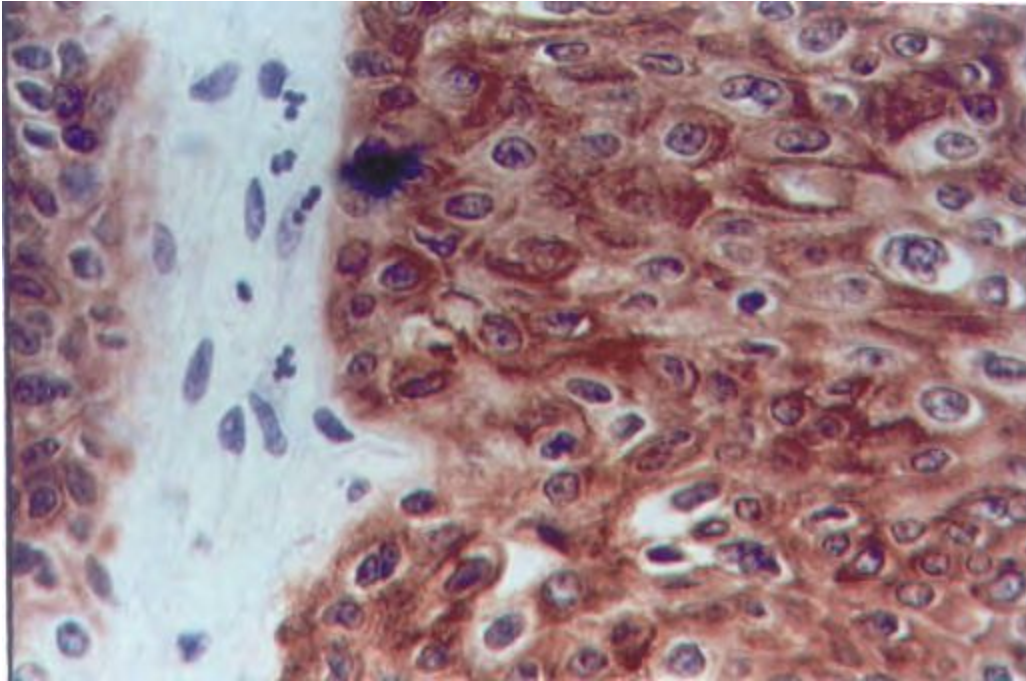


Figura 6: Microfotografía de un cáncer de laringe bien diferenciado en el cual se determinó la expresión de MUC1 a través de la incubación con el AcMo C595. Se observa una marcada tinción a nivel de la membrana plasmática y en el citoplasma. (X400)

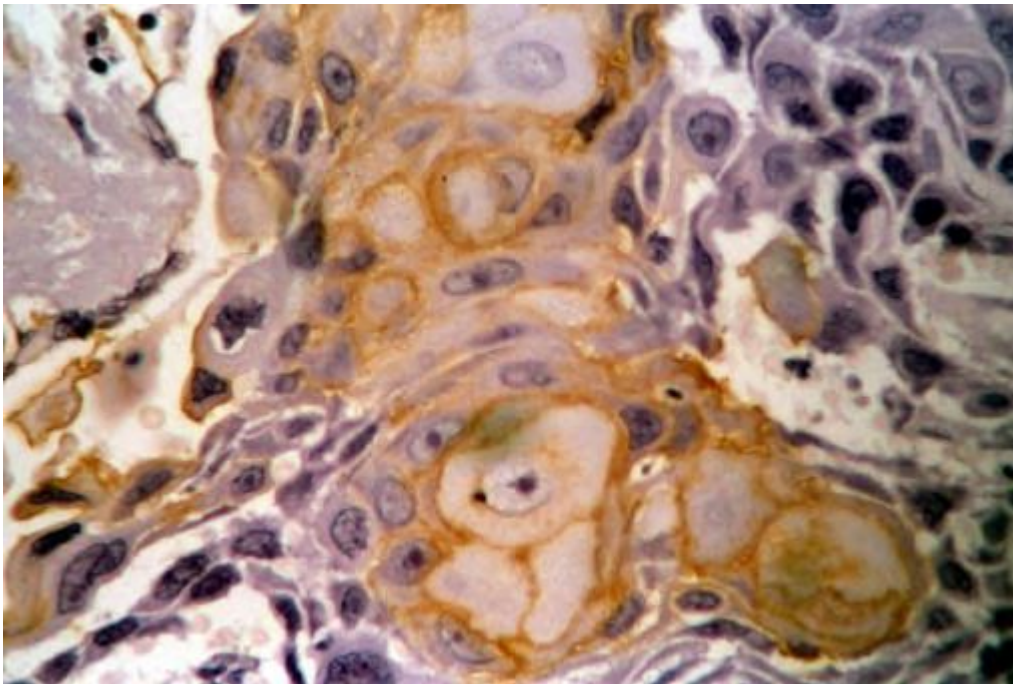


Figura 7: Microfotografía de un cáncer de cavidad oral bien diferenciado en el cual se determinó la expresión de *Lewis x* a través de la incubación con el AcMo KM380. Se observa una marcada tinción a nivel de la membrana plasmática de algunas células. (X400)

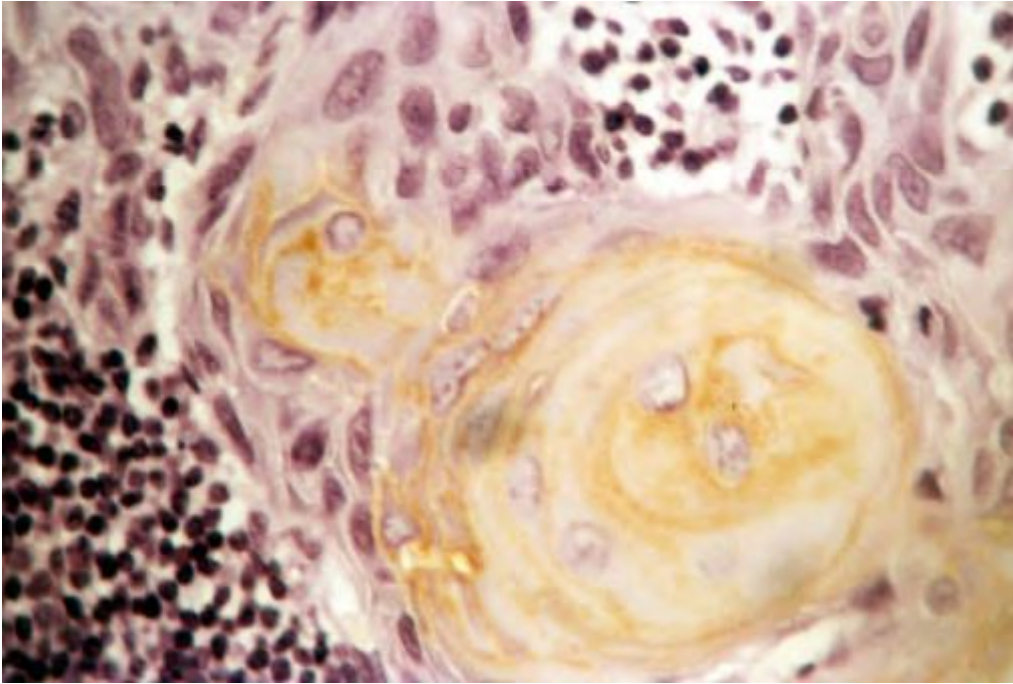


Figura 8: Microfotografía de una metástasis ganglionar hallada en el mismo paciente de la Figura 7 en el cual se determinó la expresión de *Lewis x* a través de la incubación con el AcMo KM380. Se observa una marcada tinción a nivel de la membrana plasmática celular de algunas células tumorales rodeadas de linfocitos. (X400)

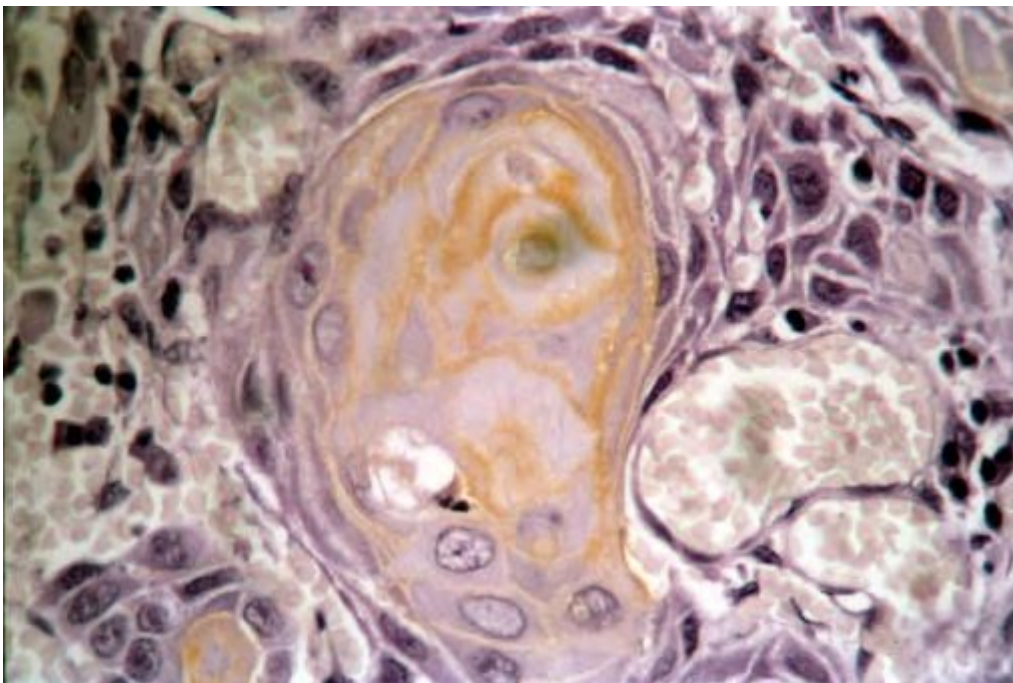


Figura 9: Microfotografía perteneciente al mismo paciente de la Figura 7 en el cual se determinó la expresión de *Lewis y* a través de la incubación con el AcMo C14. Se observa una marcada tinción a nivel de la membrana plasmática de algunas células tumorales. (X400)

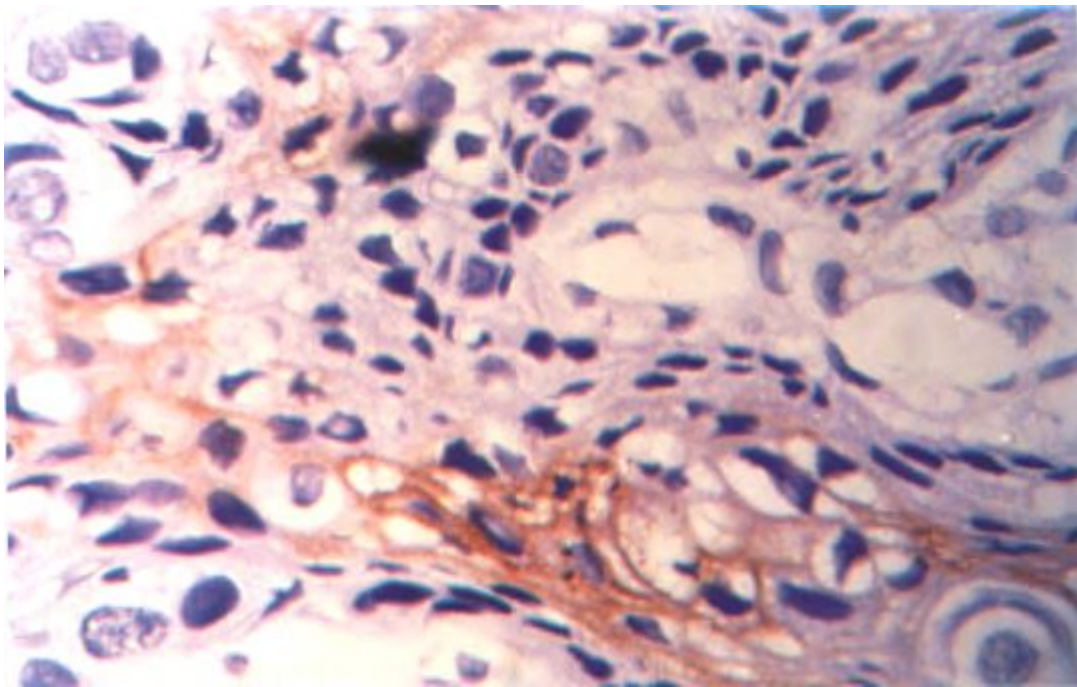


Figura 10: Microfotografía perteneciente a un CECC escasamente diferenciado en el cual se determinó la expresión del antígeno Tn. Se observa una tinción lineal a nivel de la membrana plasmática en un grupo aislado de células tumorales. (X400)

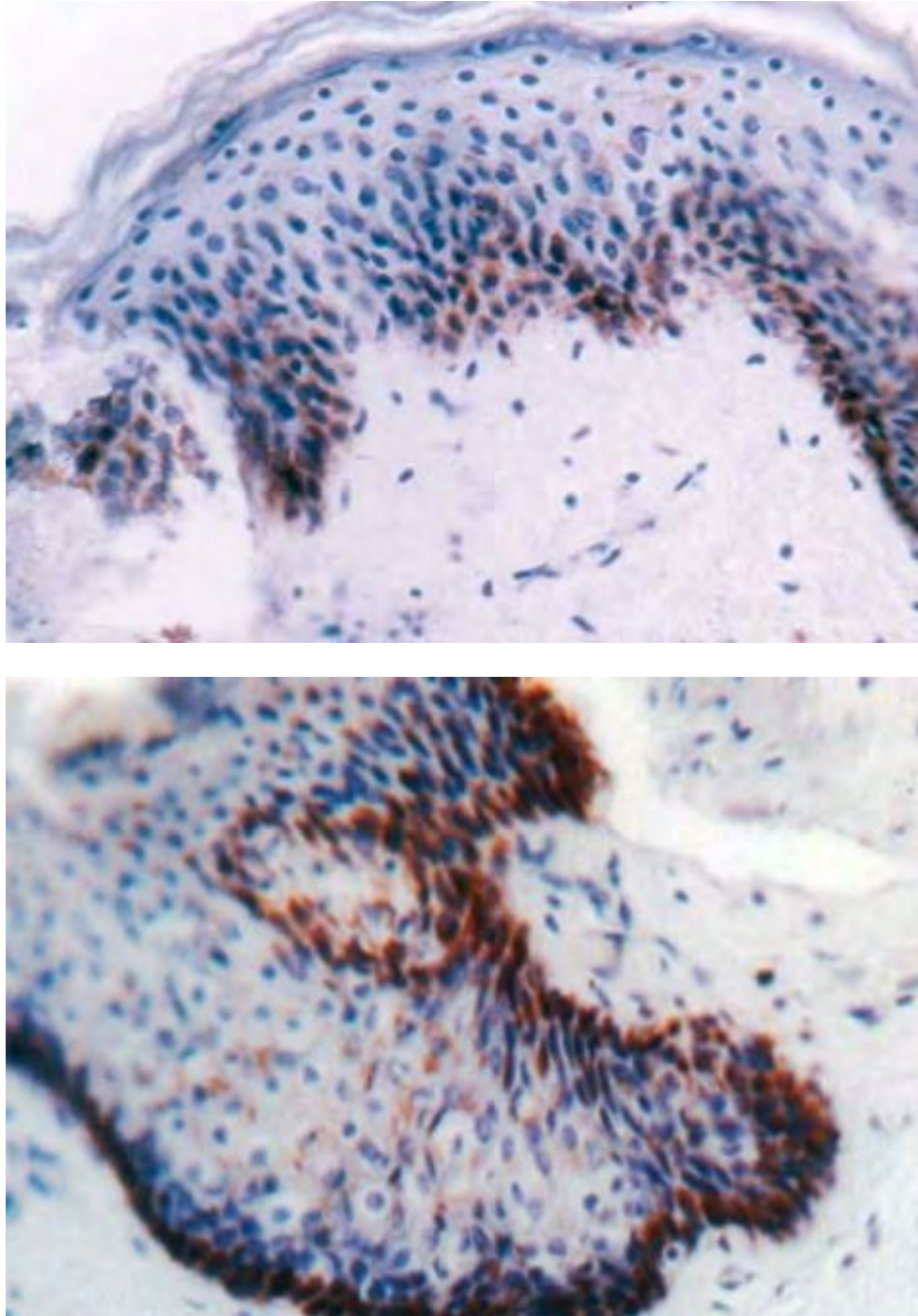


Figura 11: A) Microfotografía de un corte histológico de mucosa oral normal incubada con el AcMo C595 (anti-MUC1); se observa una reacción positiva en las células basales. B) mismo corte histológico tratado previamente con neuraminidasa e incubado con el AcMo C595 en el cual se puede observar un incremento de la reactividad de las células basales y en algunas células de los estratos superiores. (X40)

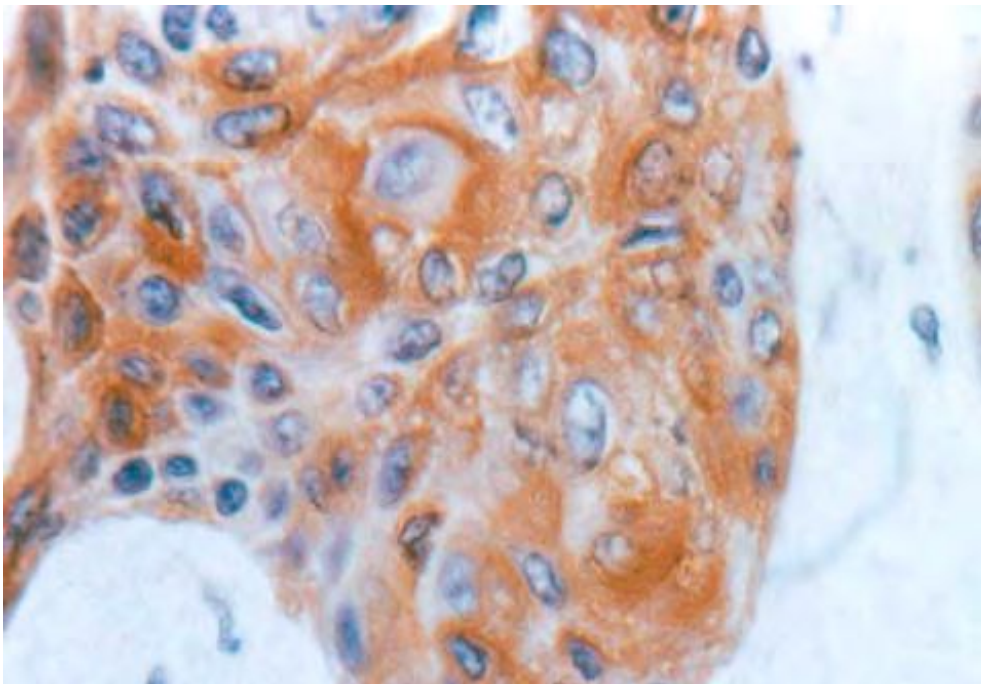
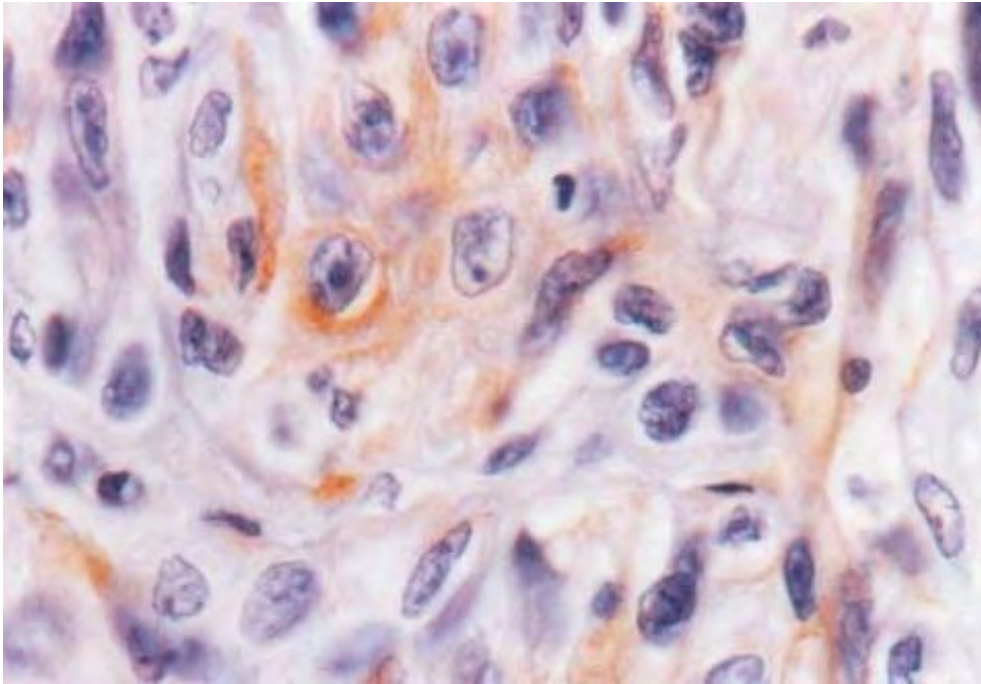


Figura 12: A) Microfotografía de un corte histológico de un cáncer de laringe incubado con el AcMo C595 en el cual se puede observar una marcación leve en el citoplasma de algunas células tumorales. B) El mismo corte histológico tratado previamente con neuraminidasa e incubado con el AcMo C595. Se observa un aumento marcado de la intensidad de la reacción y en algunas células la inmunomarcación de la membrana plasmática.

Interrelación de la expresión de los diversos epitopes en tejido normal, lesiones pre-neoplásicas y tumores.

La relación entre los distintos epitopes estudiados fue analizada utilizando Análisis de Componente Principales. Como fuera descrito en la página 107 y en la Figura 5, en este tipo de análisis a partir de las variables en estudio se generan factores que las resumen y explican las variaciones observadas. Tomando los dos primeros factores construimos un gráfico de coordenadas donde se representaron las variables como vectores y los pacientes o controles como puntos, teniendo en cuenta para este análisis el grado de diferenciación tumoral (P=escasamente diferenciado, S= semidiferenciado y B= bien diferenciado).

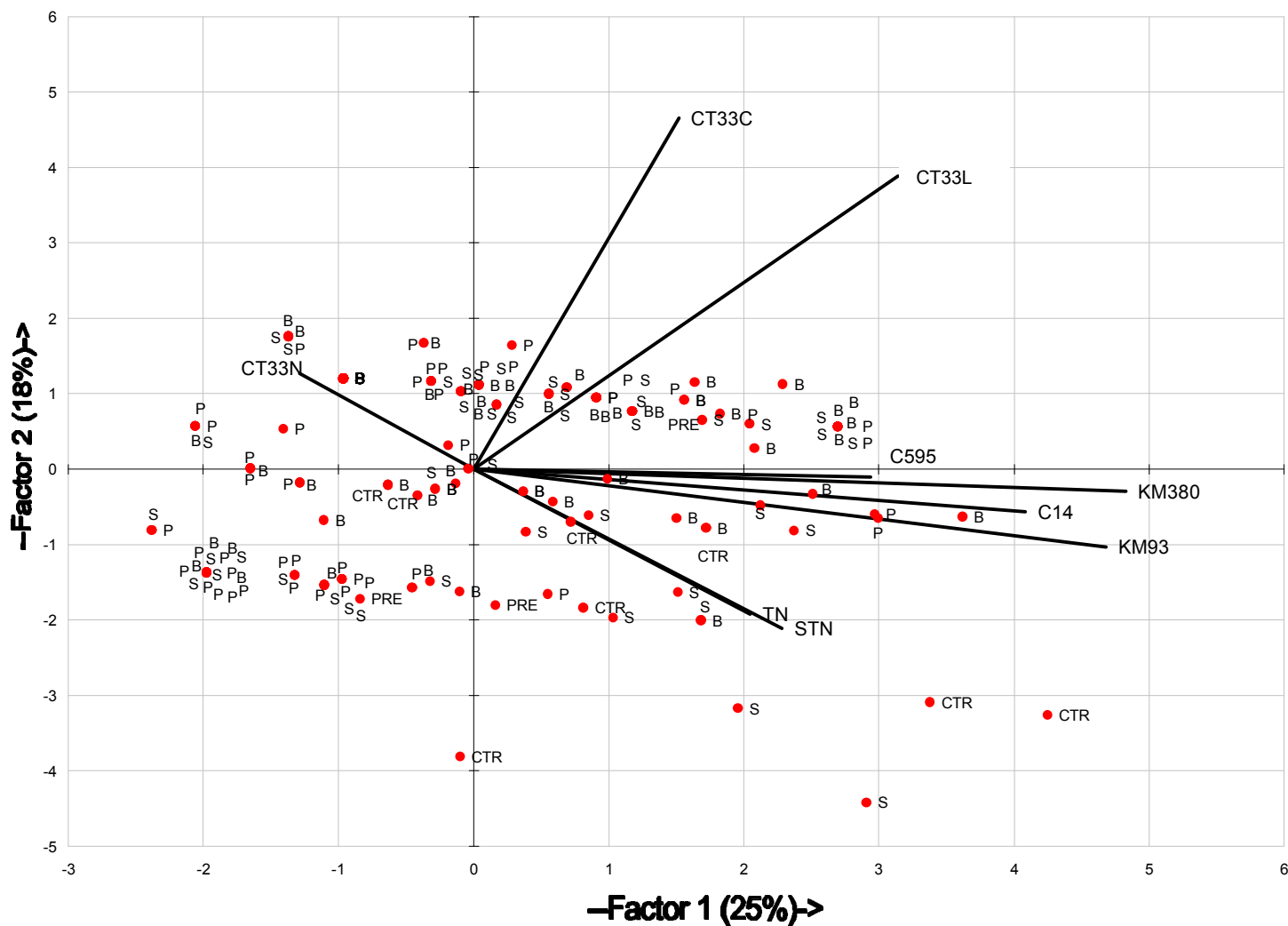
Empleando este sistema se observó que los dos primeros factores lograron explicar las variaciones observadas en el 42 % de los datos, mientras que con el tercer factor (no representado) se explicaría hasta un 56% de los datos. Las variables que presentaron mayor peso para el Factor 1 (*eje x*) fueron KM380 (el AcMo que reconoce *Lewis x*) y KM93 (que reconoce *sialil Lewis x*), en tanto que para el componente principal 2 (*eje y*) fueron CT33L (expresión de la cola citoplasmática de MUC1 en la membrana plasmática) y CT33C (expresión de la cola citoplasmática de MUC1 en el citoplasma), que a su vez se hallaban repartidas entre ambos factores.

Se observó una zona clara de separación entre los controles y las muestras provenientes de tumores más diferenciados (Factor 2(-) vs. Factor 2(+), respectivamente) mientras que el gradiente de diferenciación de poca a buena diferenciación tumoral (P, S y B) se localizó en un eje diagonal desde el cuadrante inferior izquierdo (Factor 1(-) y Factor 2(-)) hacia el cuadrante superior derecho (Factor 1(+) y Factor 2 (+)), tal como se representa en la Figura 12, en la próxima página.

Se observa una estrecha relación entre la expresión del AcMo C595 (porción extracelular de MUC1) y los antígenos carbohidratos que reconocen los AcMo KM93 (*sialil Lewis x*), KM380 (*Lewis x*) y C14 (*Lewis y*). Por el contrario se observa una ausencia de correlación entre la expresión

nuclear de CT33 (la cola citoplásmica de MUC1) y la expresión de los epitopes Tn y sTn. La distribución de las muestras demostró un predominio de tumores escasamente diferenciados en el cuadrante inferior izquierdo en oposición a la mayoría de las variables en estudio, demostrando una escasa expresión de los antígenos ensayados en este tipo de tumores. Así mismo, la mayoría de las muestras de tejido normal o provenientes de lesiones pre-neoplásicas también se ubicaron en los cuadrantes inferiores.

Figura 12: Análisis de Componentes principales de la contribución relativa de la expresión antigénica representados por los ejes x (Factor 1) e y (Factor 2). Las muestras de los pacientes se encuentran identificadas según la diferenciación tumoral o su origen y representadas por puntos.



CT33L= expresión lineal; CT33N=expresión citoplásmica; CT33N= expresión nuclear; CTR=muestra control; PRE=lesión preneoplásica; B=tumor bien diferenciado; S=tumor semi diferenciado; P= tumor poco diferenciado.

Continuando con el análisis de la expresión antigénica, pueden observarse en la tabla 11 los coeficientes de correlación clásica hallados con los datos estandarizados de la expresión de los distintos epitopes estudiados; en negrita se destacan las correlaciones que fueron significativas ($p < 0,05$). En primer lugar se observa una buena correlación que resulta significativa entre *Lewis x* y *sialil Lewis x*, donde prácticamente todos los tumores positivos para *sialil Lewis x* lo fueron para *Lewis x*, con la excepción de tres casos. En segundo lugar se halló una correlación positiva significativa entre *Lewis x* y *Lewis y*; ambos epitopes se detectan conjuntamente en el 26,7% de los casos y en el 57,2% por lo menos uno fue positivo. Igualmente, se encontró una correlación positiva entre la expresión de *sialil Lewis x* y *Lewis y*.

Con respecto a la expresión de MUC1, evaluada con el AcMo C595, mostró una correlación positiva con los epitopes *Lewis y*, *Lewis x* y *sialil Lewis x*. Cabe destacar que 21 casos fueron positivos para los tres antígenos carbohidratos mencionados en forma conjunta, 12 de los cuales también lo fueron para C595. La expresión de MUC1, evaluada por CT33, mostró una correlación positiva y significativa entre aquellos tumores que demostraron marcación positiva en membrana y citoplasma, pero no hubo correlación entre la expresión en membrana y núcleo. Comparados las distintas localizaciones de expresión de CT33 con los demás antígenos se halló una correlación positiva y significativa con *sialil Lewis x* y *Lewis x* con la expresión del antígeno en membrana, en tanto que se halló una correlación negativa entre *Lewis y* y *sialil Lewis x*, con la expresión de CT33 nuclear.

Los epitopes Tn y sTn en ocasiones fueron detectados en forma conjunta y presentan una correlación significativa en su expresión, pero no se observó relación alguna con la expresión de MUC1. Se halló una correlación positiva significativa entre sTn y la expresión de los antígenos del Grupo Lewis.

Tabla 11: Coeficientes de correlación clásica de la respuesta a la detección antigénica en tejidos normales, lesiones preneoplásicas y CECC. (n=144, p<0,05).

	CT3L	CT3C	CT3N	C595	KM93	KM380	C14	TN	STN
CT3L	1	0.567	-0.182	0.109	0.195	0.276	0.140	-0.046	-0.045
CT3C	0.567	1	0.184	0.111	0.069	-0.004	0.054	0.054	-0.027
CT3N	-0.182	0.184	1	-0.057	-0.169	-0.139	-0.188	0.035	0.082
C595	0.109	0.111	-0.057	1	0.219	0.219	0.329	-0.039	0.050
KM93	0.195	0.069	-0.169	0.219	1	0.498	0.381	0.080	0.163
KM380	0.276	-0.004	-0.139	0.219	0.498	1	0.385	0.141	0.155
C14	0.140	0.054	-0.188	0.329	0.381	0.385	1	0.084	0.252
TN	-0.046	0.054	0.035	-0.039	0.0796	0.141	0.084	1	0.115
STN	-0.045	-0.027	0.082	0.050	0.163	0.155	0.252	0.115	1

Las correlaciones significativas se indican en negrita

Relación entre la expresión antigénica en tumores primarios de cabeza y cuello y los parámetros T y N de la enfermedad.

Con el objetivo de comparar la diferencia en la expresión antigénica de tumores con distinto tamaño y grado de invasión local o metástasis ganglionar se realizaron correlaciones no paramétricas entre las variables T y N de los tumores primarios de cabeza y cuello y la expresión antigénica (Tabla 12) empleando un nivel de significación de $p < 0,05$.

Se observó una correlación negativa significativa entre el parámetro T y la expresiones de la cola citoplasmática de MUC1, *Lewis x* y el antígeno Tn. Por otra parte la invasión ganglionar, estudiada por medio del parámetro N muestra una correlación positiva y significativa con la expresión del antígeno *sialil Lewis x*; la expresión de MUC1 estudiada por el AcMo C595 también mostró una correlación positiva con el parámetro N, pero en este caso no fue significativa.

Tabla 12: Correlaciones no paramétricas (Kendall) entre los parámetros T y N de la estadificación clínica de pacientes con CECC y la expresión antigénica en el tumor primario.

(n=131)	Kendall Tau	Z	Significación (p)
T vs. CT33	-0.129	-2.190	0.028
T vs. CT33M	-0.081	-1.373	0.169
T vs. CT33C	-0.009	-0.168	0.866
T vs. CT33N	-0.023	-0.405	0.685
T vs. C595	0.015	0.262	0.793
T vs. KM93	-0.075	-1.267	0.204
T vs. KM380	-0.161	-2.732	0.006
T vs. C14	-0.106	-1.794	0.072
T vs. TN	-0.129	-2.183	0.028
T vs. STN	-0.085	-1.445	0.148
N vs. CT33	0.001	0.025	0.979
N vs. CT33M	0.030	0.520	0.602
N vs. CT33C	0.016	0.271	0.785
N vs. CT33N	-0.011	-0.198	0.842
N vs. C595	0.115	1.947	0.051
N vs. KM93	0.154	2.610	0.009
N vs. KM380	0.027	0.452	0.650
N vs. C14	-0.057	-0.954	0.340
N vs. TN	-0.004	-0.064	0.949
N vs. STN	0.071	1.194	0.232

Las correlaciones significativas ($p < 0,05$) se indican en negrita.

Relación de la expresión antigénica con la localización tumoral

Con el fin de demostrar la existencia de diferencias en la expresión de los antígenos en estudio respecto de la localización del tumor primario se elaboraron tablas de doble entrada y se realizó un análisis de independencia de χ^2 ($p < 0,05$). Se concluyó que no existía interdependencia entre la expresión antigénica de los tumores y la localización tumoral.

Relación de la expresión antigénica con la diferenciación tumoral

Con el fin de demostrar la existencia de diferencias en la expresión de los antígenos en estudio respecto del grado de diferenciación del tumor primario se elaboraron tablas de doble entrada y se realizó una prueba de independencia de χ^2 ($p < 0,05$). Se constató una relación entre la expresión antigénica de *Lewis x* y la cola citoplasmática de MUC1 en membrana y la diferenciación tumoral. Se concluyó que la expresión antigénica está significativamente relacionada con el grado de diferenciación que presentan los tumores (Tablas 13 y 14).

Tabla 13: Tabla de frecuencias totales y relativas porcentuales de la detección de la expresión antigénica de *Lewis x* con KM380 en tumores con distinto grado de diferenciación.

KM380	Negativos	Positivos	Totales
Bien diferenciado	16 (36.36%)	28 (63.64%)	44
Semi diferenciado	30 (63.83%)	17 (36.17%)	47
Poco diferenciado	26 (66.67%)	13 (33.33%)	39
Total	72	58	130

$$\chi^2_{\text{calc}}=9.808, p=.007$$

Tabla 14: Tabla de frecuencias totales y relativas porcentuales de la detección de la expresión antigénica de MUC1 en membrana con CT33 en tumores con distinto grado de diferenciación.

CT33	Negativos	Positivos	Totales
Bien diferenciado	7 (15.91%)	37 (84.09%)	44
Semi diferenciado	14 (29.79%)	33 (70.21%)	47
Poco diferenciado	17 (44.74%)	21 (55.26%)	38
Total	38	91	129

$$\chi^2_{\text{calc}}=8.158, p=.017$$

El análisis estadístico de los resultados coincide con la observación de una mayor expresión de los antígenos estudiados en los tumores con buena diferenciación, restringiéndose en ocasiones exclusivamente a la marcación de áreas de queratinización.

Efecto del tratamiento con neuraminidasa sobre la expresión antigénica de MUC1 y carbohidratos asociados

Sobre 24 muestras de CECC se emplearon técnicas básicas de Inmunohistoquímica previo tratamiento del corte histológico con 0,1 U/ml de Neuraminidasa tipo V. Se emplearon los anticuerpos anti-MUC1 (C595), anti Tn y sialil Tn. En general las muestras mostraron un incremento de la reactividad del epítopo proteico de MUC1 y el antígeno Tn. Además, fue posible observar el cambio de negativo a positivo en 4 muestras empleando C595 y en 10 muestras empleando el AcMo anti Tn. El tratamiento con neuraminidasa aumento la reactividad tanto a nivel de la membrana plasmática como del citoplasma celular (Figura 11). Por otra parte, sólo una de las

muestras resultó positiva para el AcMo anti sialil Tn, la cual luego de tratamiento mostró una disminución en la intensidad de la reacción (Figura 12).

El tratamiento con neuraminidasa de muestras de epitelio normal de la cavidad oral mostró un incremento de la reactividad de los epitopes de MUC1 y sialil Tn, los cuales se restringieron a zonas superficiales o basales del epitelio, respectivamente.

Aislamiento de MUC1 en homogenizados de tumor

Homogenización de tejidos

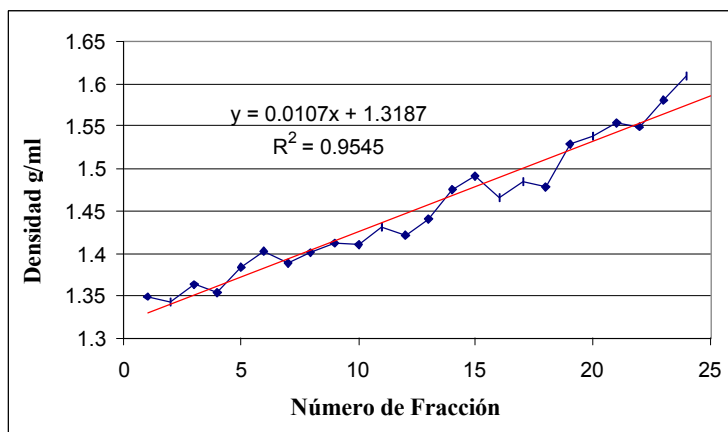
A partir de muestras frescas de distintos tumores de cabeza y cuello se obtuvieron por homogenización mecánica y centrifugación diferencial, las fracciones correspondientes a las membranas extranucleares, el citoplasma y el núcleo de 31 tumores. A través de la técnica de Lowry se determinó el contenido de proteínas, que para las fracciones de membranas extranucleares resultó en un promedio 1,87 g/ml, y luego se procedió a realizar la separación por SDS-PAGE y análisis de la expresión antigénica por Western Blot.

Por otra parte, a partir de las fracciones de membranas extranucleares y citoplásmicas de 5 tumores se realizó la centrifugación en gradientes de CsCl.

Centrifugación en gradientes de CsCl

De cada una de las 24 fracciones obtenidas luego de la centrifugación en gradiente de CsCl se calculó el valor de la densidad por medio de un método gravimétrico. El siguiente gráfico muestra el resultado del análisis de la densidad en 6 ensayos diferentes. (Figura 13)

Figura 13: Representación de la tendencia lineal de la densidad de las fracciones obtenidas por centrifugación en gradientes de CsCl.

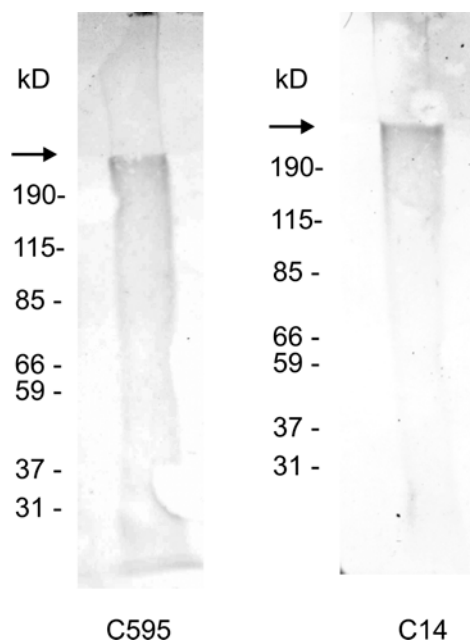


A continuación se procedió al análisis por SDS-PAGE y Western Blot de cada fracción de las 10 muestras utilizando los AcMo C595, KM93, C14 y Tn.

Se observó una marcación positiva para los antígenos *Sialil Lewis x*, MUC1 y *Lewis y* en la fracción número 13 (densidad 1,45 g/ml) obtenida a partir de un tumor originario de la cavidad oral de un paciente de 63 años, el cual se presentaba clínicamente como un estadio II (T2-N0-M0); la muestra histológica presentaba al corte características de diferenciación parcial.

Por otra parte, se halló reacción positiva para los antígenos MUC1 y *Lewis y* en un tumor primario de laringe obtenido de un paciente de 56 años, el cual se presentó con un estadio IVB (T4-N3-M0). Con el AcMo C595 (MUC1) se observó la presencia de una reacción difusa (en inglés, *smear*) en las fracciones 11 (densidad 1,42 g/ml) y 14 (1,44 g/ml), la primera resultó muy débil en tanto que la segunda fue intensa y se extendió desde el punto de siembra hasta el frente de la corrida, con predominio en los pesos moleculares superiores a 200 kD (Figura 14). Una reacción similar se constató con el AcMo C14 (*Lewis y*) pero de menor intensidad. Ambas reacciones tuvieron lugar en fracciones citoplasmáticas, es decir que el momento de la centrifugación diferencial el antígeno detectado no se encontraba asociado a membranas.

Figura 14: Ensayo de Western Blot que demuestra el aislamiento de MUC1 por medio de centrifugación en gradientes de CsCl. Detección de una reacción difusa con AcMo C595 y C14 en una fracción cuya densidad fue de 1,44 g/L. La flechas señalan la unión del “stacking” con el “resolving”.



Análisis por SDS-PAGE y Western Blot de fracciones subcelulares de tejido

tumoral de pacientes con CECC

Con el objetivo de corroborar la identidad antigénica y caracterizar las moléculas portadoras de los epitopes en estudio se procedió al análisis por medio de SDS-PAGE y WB de las fracciones subcelulares obtenidas por homogeneización y centrifugación. Con tal propósito se emplearon los AcMo C595, KM380, KM93, C14, Tn y sTn.

Se detectó la presencia del centro proteico de MUC1 mediante el Ac Mo C595 en 28 de 30 tumores (93.3%) observándose una reacción difusa, donde en ocasiones pudieron advertirse múltiples bandas de más de 180 kD en las fracciones de membranas extranucleares y otras bandas de menor peso molecular en las fracciones citoplasmáticas.

Entre los antígenos hidrocarbonados, *sialil Lewis x* fue positivo en 11 de 17 tumores (64.7%) y generalmente se observó un patrón de expresión difuso en pesos moleculares superiores a los 110 kD. Se observó reacción contra el antígeno *Lewis x* en 26 de 27 tumores (96.3%). Dicha

reacción se localizó principalmente en las fracciones de membranas extranucleares. El antígeno *Lewis y* fue hallado en 16 de 20 tumores (80%) y presentó un patrón de expresión similar a *Lewis x*.

Por otra parte, el hapteno Tn fue positivo en 20 de 24 tumores (83,3%) y el hapteno sTn en 19 de 24 tumores (79.2%). En ambos casos se observaron bandas de pesos moleculares de entre 60 y 110 kD y en el caso de sTn predominó la expresión a nivel de las fracciones citoplasmáticas.

En la figura 15 podemos observar cuatro ejemplos de tumores primarios de cabeza y cuello. En A se muestra un ensayo con el AcMo C595, el cual reconoce en la fracción nuclear (N) y de membranas extranucleares (M) moléculas de alto peso molecular dispuestas sobre el “*stacking*” y al comienzo del “*resolving*”, así como bandas de menor peso en la fracción citoplásmica (C). Esta muestra fue obtenida a partir de un carcinoma indiferenciado de laringe de un paciente de 58 años que presentó un estadio clínico IV-A.

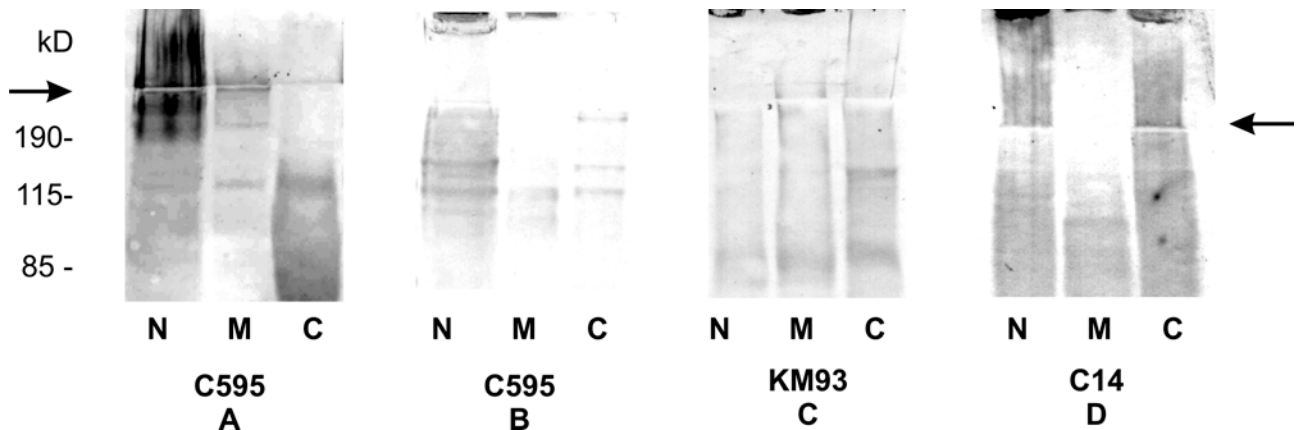
En B se observa otra marcación con el AcMo C595 en la cual se puede apreciar la presencia de numerosas bandas de pesos moleculares distribuidos entre 110 kD y más de 200 kD, tanto en las fracciones nucleares, como de membrana o citoplásmica. En este caso se obtuvo la muestra a partir de un hombre de 57 años que presentaba un carcinoma de cavidad oral indiferenciado.

En C se muestra la tinción con el AcMo KM93, que reconoce el antígeno *sialil Lewis x*. Se observa una reacción predominantemente difusa en las tres fracciones estudiadas la cual presenta un refuerzo en la región próxima a los 85 kD y una banda nítida en la fracción citoplásmica de aproximadamente 140kD. El tejido procedía de una paciente de 54 años que presentaba un carcinoma de faringe indiferenciado.

Finalmente en D se observa el reconocimiento del antígeno *Lewis y*, utilizando el AcMo C14. Se observan claramente una reacción difusa en las tres fracciones que en la fracción nuclear y citoplásmica abarcan toda la calle de la electroforesis. La fracción de membrana presenta tinción

por debajo de los 115 kD. Esta muestra pertenece a un paciente de 46 años, portador de un carcinoma epidermoide semi-diferenciado de laringe con extensas metástasis ganglionares.

Figura 15: Ejemplos de ensayos por Western Blot de fracciones subcelulares de distintos CECC.



kD (kilo Dalton) N=Fracción nuclear M=Fracción de membranas extra nucleares C= Fracción citoplásmica
 Flechas: unión de los segmentos “stacking” y “resolving” del gel de poliacrilamida
 A) Cáncer de laringe, AcMo C595; B) Cáncer de cavidad oral, AcMo C595; C) Cáncer de faringe, AcMo KM93;
 D) Cáncer de laringe, AcMo C14.

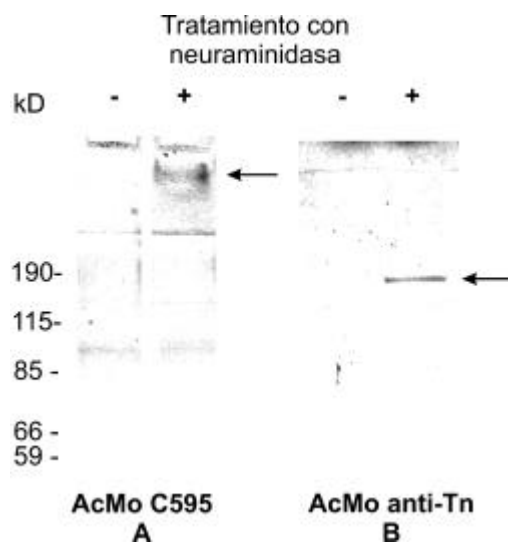
Análisis del efecto del tratamiento con neuraminidasa sobre la expresión de MUC1 y los antígenos Tn y sTn en el CECC.

Con el objetivo de evaluar del efecto del tratamiento con neuraminidasa sobre la expresión de MUC1 y los antígenos Tn y sTn en el CECC se procedió a la incubación con dicha enzima de las fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial de homogenatos de tejido tumoral.

No fue posible establecer diferencias en la expresión antigénicas por SDS-PAGE y WB luego de la desialilación, a excepción de algunos pocos casos en los que se pudo evidenciar la aparición de bandas de alto peso molecular las cuales reaccionaron con el AcMo C595 o la desaparición de bandas que previamente fueron reactivas al AcMo sTn. En la figura 16 se puede apreciar dos ejemplos de ensayos con (+) o sin (-) tratamiento previo con neuraminidasa sobre fracciones de membranas extracelulares de dos CECC; en A, luego del tratamiento se observa la expresión de una banda de muy alto peso molecular correspondiente a MUC1; en B se observa la

aparición de una banda nítida reconocida por el AcMo anti Tn la cual posee aproximadamente 180kD.

Figura 16: Ensayo de Western Blot que demuestra el efecto del tratamiento con neuraminidasa sobre la expresión de MUC1 y el antígeno Tn en dos fracciones de membranas extranucleares de CECC.



kD=kilo Dalton; A)Cáncer de laringe; B)Cáncer de laringe; Las flechas denotan las bandas.

Medición de MUC1 sérica en pacientes con CECC

Con el objetivo de determinar los niveles de MUC1 en el suero de pacientes portadores de CECC se procedió al análisis de 52 pacientes por medio del kit comercial CASA. A partir de este test de ELISA se determinaron los valores de MUC1 en U/ml, empleando como valor máximo de referencia 4U/ml. Se hallaron niveles elevados de MUC1 circulante en 9 sobre 52 pacientes estudiados (17,3%) de los cuales 1 perteneció al estadio I, ninguno al estadio II, 4 al estadio III y 4 al estadio IV.

Se procedió al análisis estadístico para el cual dos valores fueron eliminados por presentar valores extremos muy elevados. Dichas muestras correspondieron a un paciente masculino de 65 años de edad, portador de un carcinoma de cavidad oral bien diferenciado en estadio IV (T3 N1) en el cual el valor de MUC1 circulante fue de 24,8 U/ml y a un paciente masculino de 62 años de edad,

portador de un carcinoma de laringe semidiferenciado en estadio III (T3 N0) en el cual el valor de MUC1 circulante fue de 10,6.

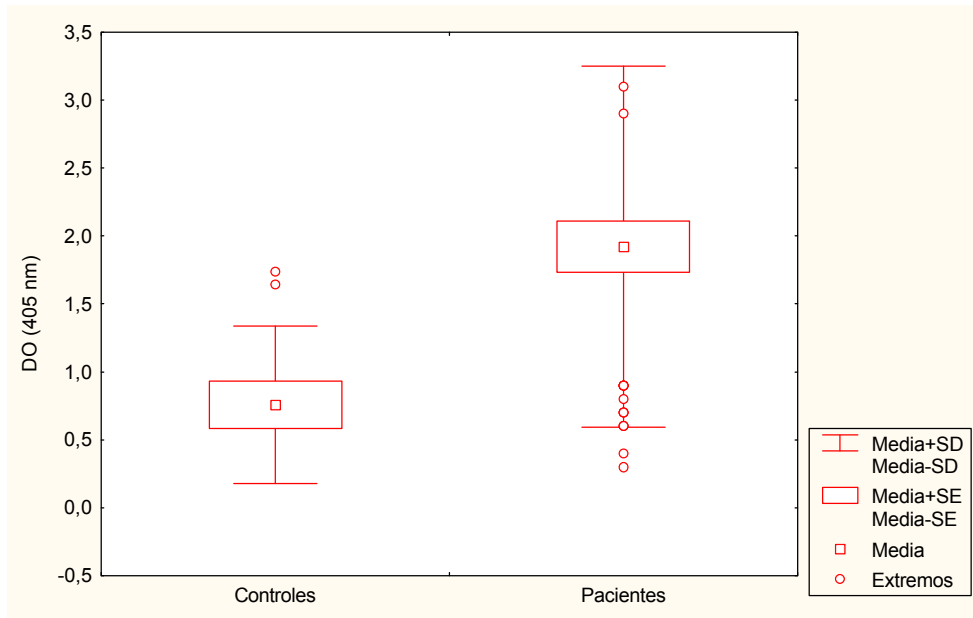
Los valores de MUC1 circulante hallados mostraron un promedio de 1,9 U/ml con un mínimo de 0,3 U/ml, un máximo de 5,6 U/ml y un desvío estándar de 1,3 U/ml.

Al comparar los valores de MUC1 sérica en los pacientes portadores de CECC con 10 sueros controles normales pertenecientes a hombres adultos se encontró una diferencia significativa por medio del test de ANOVA ($p=0,002$), la cual se representa en la figura 17.

Teniendo en cuenta la posible relación de la edad de los pacientes con los niveles de MUC1 sérica se estudió la correlación de los datos obtenidos por medio del método no paramétrico de Kendall hallándose un valor de tau de 0,063 el cual no resulta significativo ($p=0,520$). Por otra parte se analizó la relación de los niveles de MUC1 sérica con los demás parámetros clínicos (estadio tumoral, diferenciación tumoral y localización) por medio de un test de ANOVA.

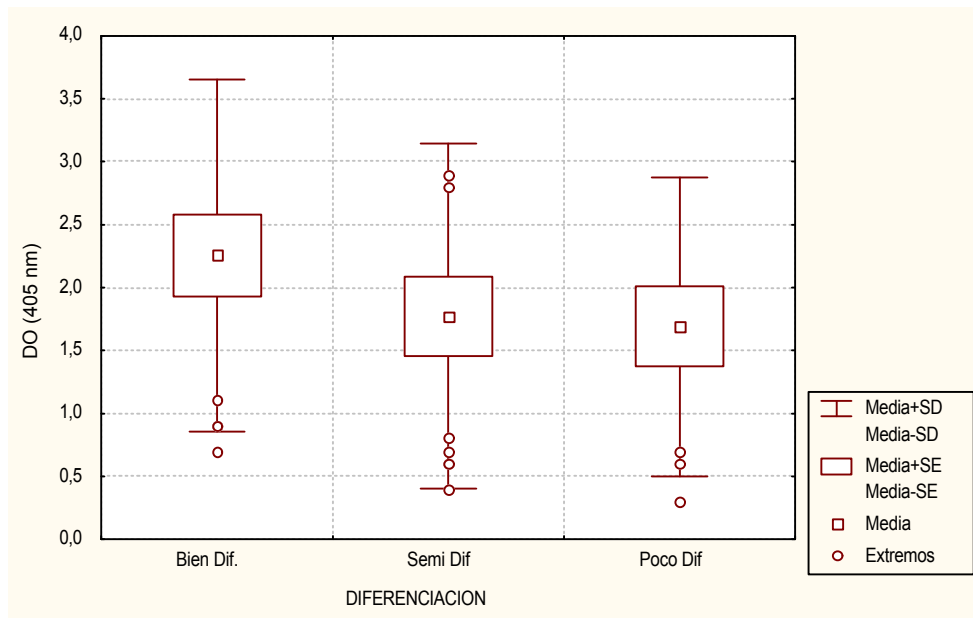
No fue posible hallar diferencias significativas entre las variables en estudio y los niveles de MUC1 sérica, aunque se observó una tendencia clara a la menor expresión de MUC1 sérica en tumores menos diferenciados tal como se observa en la figura 18. Con respecto al parámetro T del estadio tumoral se observaron valores mayores en los estadios I y IV (Estadio I: 3,00 U/ml; Estadio II: 1,93 U/ml; Estadio III: 1,61 U/ml; Estadio IV: 2,00 U/ml) cuya distribución se puede apreciar en la figura 19.

Figura 17: Representación de la dispersión de los datos al analizar los niveles de MUC1 circulante de individuos controles y pacientes portadores de CECC.



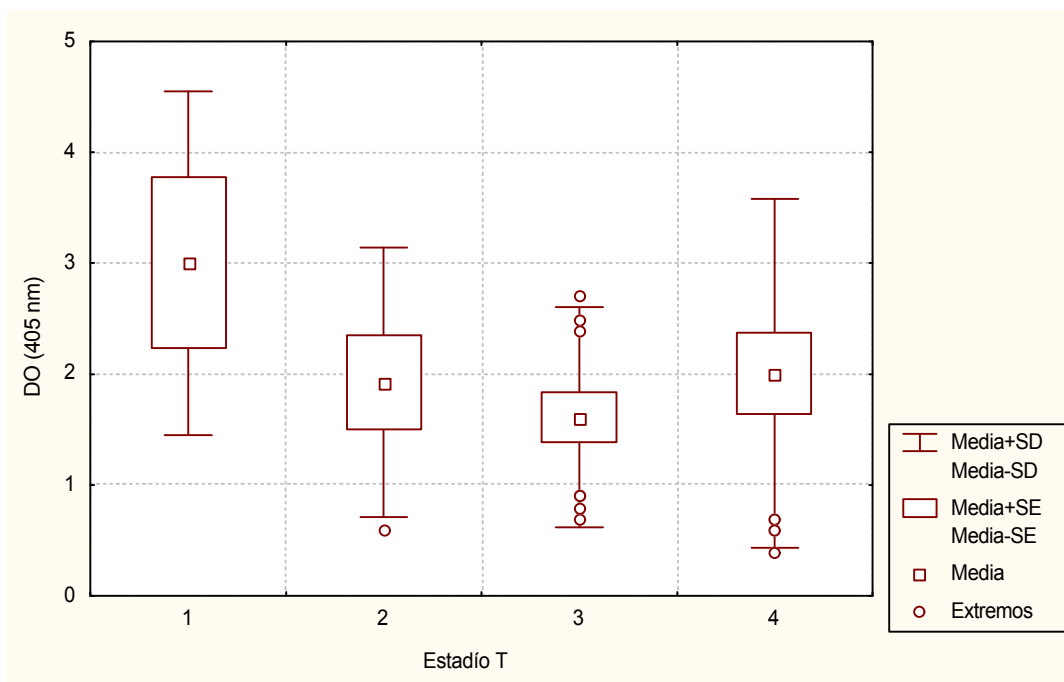
DO=Densidad óptica; SD=Desvío Estándar; SE=Error Estándar.

Figura 18: Representación de la dispersión de los datos al analizar los niveles de MUC1 circulante pacientes portadores de CECC, esto últimos agrupados según la diferenciación tumoral.



DO=Desidad óptica; SD=Desvío Estándar; SE=Error Estándar.

Figura 19: Representación de la dispersión de los datos al analizar los niveles de MUC1 circulante pacientes portadores de CECC, esto últimos agrupados según el estadio T.



DOI= Densidad óptica; SD=Desvío Estándar; SE=Error Estándar.

Respuesta inmune humoral en pacientes con CECC

Medición de niveles de complejos inmunes circulantes (CIC)

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune humoral en pacientes portadores de CECC se estudiaron los complejos inmunes circulantes (CIC) mediante la técnica de precipitación en PEG 3,5% en 94 pacientes portadores de tumores primarios o recidiva de la enfermedad. Se establecieron dos grupos controles; en primer lugar, un grupo control negativo (n=18) de individuos adultos con una distribución en edad y género similar al grupo de estudio y, en segundo lugar, un grupo control positivo (n=10) conformado por pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoidea. El valor máximo de referencia se estableció en 0,216 de densidad óptica que representa la media más un desvío de los valores hallados en los individuos controles.

De los pacientes estudiados, 34 sobre 94 (36,2%) mostraron niveles elevados de CIC, los cuales correspondieron 1 al estadio I, ninguno al estadio II, 11 al estadio III y 22 al estadio IV.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos en los distintos grupos se realizó un análisis de la varianza de los grupos en estudio (ANOVA, representado en la Tabla 15) con contrastes de hipótesis de Bonferroni (Tabla 16). El nivel de significación se estableció en $p < 0.01$.

Por medio de este análisis se observaron diferencias significativas entre el grupo de individuos de control negativo frente a todos los demás grupos. Los pacientes portadores de tumores primarios no mostraron diferencias significativas con los que presentaron recidiva de la enfermedad. Con respecto a los controles positivos, los pacientes portadores de tumores primarios mostraron diferencias significativas, en tanto que estas últimas no se observaron en los pacientes que sufrieron recidivas.

Tabla 15: Análisis de varianza de los niveles de CIC en pacientes portadores de tumores primarios, recidivas, controles negativos y controles positivos.

Categorías	Diferencias	t de Student	Pr. > t'	Significación
Tumores primarios vs. Recidivas	-0,134	-2,065	0,040	NO
Tumores primarios vs. Controles negativos	0,116	5,072	0,001	SI
Tumores primarios vs. Controles positivos	-0,240	-6,496	0,001	SI
Recidivas vs. Controles negativos	0,250	3,739	0,001	SI
Recidivas vs. Controles positivos	-0,106	-1,450	0,149	NO
Controles negativos vs. Controles positivos	-0,355	-8,866	0,001	SI

A partir de las diferencias observadas se procedió a la agrupación de las variables empleando el método de Benferroni, a través del cual se obtuvieron tres grupos distintos. En el primer grupo (A) se incluyeron a los controles negativos, en el segundo grupo (B) se incluyeron a los pacientes portadores de tumores primarios o recidivas y, en el tercer grupo (C), se incluyeron a los pacientes portadores de recidivas de CECC junto a los controles positivos. Como se puede observar el grupo de pacientes que presentaron recidivas se incluyen tanto en el grupo B, como el C, es decir que presentan niveles muy elevados de CIC medidos por PEG 3,5% pero no logran diferenciarse de los hallados en los tumores primarios.

Tabla 16: Categorías de agrupación de las variables en estudio según el método de Benferroni.

Categorías	Media	Agrupación		
Controles negativos	0,101	A		
Tumores primarios	0,217	B		
Recidivas	0,351	B		C
Controles positivos	0,456	C		

Comparación de los niveles de CIC en pacientes portadores de CECC según la localización y diferenciación tumoral.

Se analizaron las diferencias en los niveles de CIC observados en pacientes con CECC según la localización tumoral y diferenciación celular que presentó el mismo, empleando un análisis de ANOVA. El nivel de significación se estableció en $p < 0.05$. Se observaron diferencias significativas ($p = 0,0004$) al analizar la suma de los dos factores, en tanto que individualmente sólo el grado de diferenciación mostró diferencias. Particularmente, la media de los valores de CIC de los pacientes con tumores semidiferenciados (0,278 DO) resultó mayor que la observada en pacientes con tumores bien diferenciados (0,202 DO) o indiferenciados (0,198 DO), los cuales mostraron medias similares.

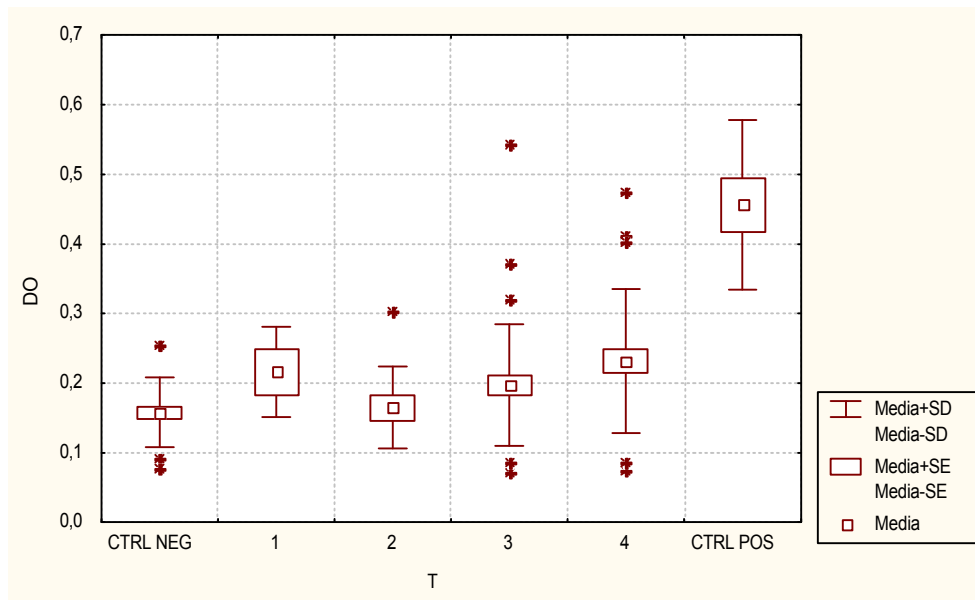
Comparación de los niveles de CIC en pacientes portadores de CECC según el estadio clínico tumoral

Se estudiaron las diferencias en los niveles de CIC observados en pacientes con CECC según el grado de invasión local y regional que presentó el mismo (T y N) y se realizó un análisis de ANOVA; sólo se evaluaron efectos específicos ya que para la combinación de T vs. N el diseño resulta incompleto por características inherentes a la clasificación. El nivel de significación se estableció en $p < 0.05$.

Al comparar los niveles de CIC en pacientes con distintos grados de T o N no se constataron diferencias significativas, sin embargo se observa una tendencia que muestra mayores niveles de

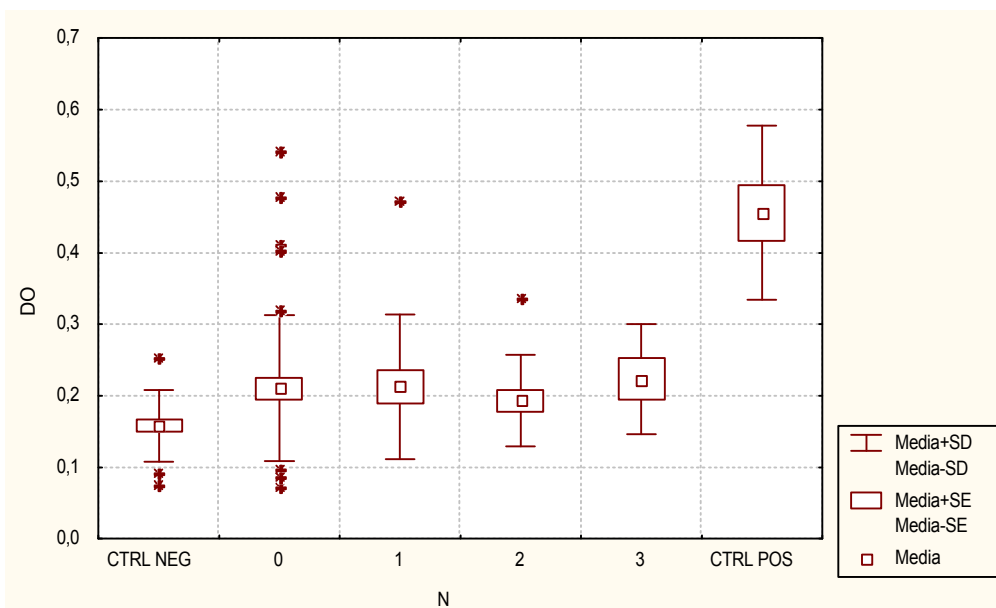
CIC en pacientes con estadios T elevados. A continuación se presentan los gráficos que representan la dispersión de los datos. (Figuras 20 y 21)

Figura 20: Representación de la dispersión de los datos al analizar los niveles de CIC en controles negativos, controles positivos y pacientes portadores de CECC, esto últimos agrupados según el estadio T.



CTRL NEG= Controles Negativos; CTRL POS= Controles positivos SD= desvio estándar; SE= error estándar; *datos extremos; DO Densidad óptica.

Figura 21: Representación de la dispersión de los datos al analizar los niveles de CIC en controles negativos, controles positivos y pacientes portadores de CECC, esto últimos agrupados según el estadio N.



CTRL NEG= Controles Negativos; CTRL POS= Controles positivos SD= desvio estándar; SE= error estándar; *datos extremos; DO Densidad óptica.

Aislamiento de complejos inmunes circulantes y análisis de la fracción

antigénica

Con el objetivo de investigar la presencia de MUC1 y los antígenos carbohidratos *sialil Lewis x*, *Lewis x* y *Lewis y* en la porción antigénica de los CIC de pacientes con CECC, se analizaron los sueros de 18 pacientes que contenían niveles elevados de CIC precipitados con PEG 3,5%.

Los CIC obtenidos fueron sometidos a cromatografía de afinidad en columna de Sefarosa CL4B y proteína A. Las fracciones obtenidas (eluidas con PBS o glicina HCl), así como el precipitado de PEG 3,5%, fueron posteriormente analizadas por medio de SDS-PAGE y Western Blot empleando como marcación los AcMo C595, KM93, KM380 y C14. Los resultados se expresan en la tabla 17

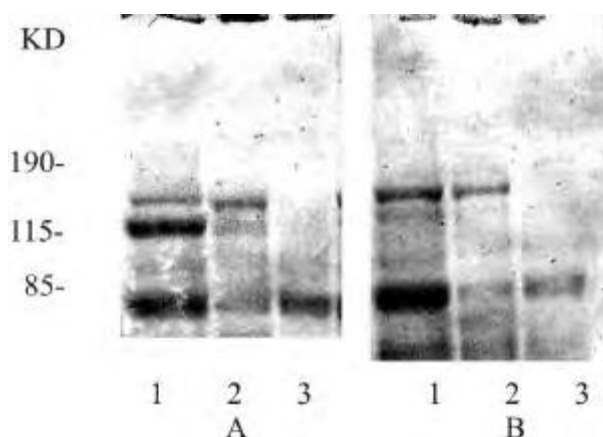
Tabla 17: Datos clínicos de los pacientes portadores de CECC y análisis de la fracción antigénica de CIC mediante SDS-PAGE y Western Blot.

Paciente	Sexo	Edad	Estadío	Localización	C595	KM93	KM380	C14
1	M	52	I	Laringe	+	+	-	+
2	M	63	III	Laringe	-	+	+	+
3	M	64	III	Laringe	+	+	-	+
4	F	69	III	Cavidad Oral	+	+	-	+
5	M	56	III	Laringe	+	+	+	+
6	M	70	III	Laringe	+	+	-	+
7	M	56	IVA	Faringe	-	-	-	-
8	M	55	IVA	Cavidad Oral	-	-	-	-
9	M	65	IVA	Faringe	+	-	-	-
10	M	58	IVA	Laringe	-	+	-	-
11	M	53	IVA	Laringe	-	+	+	-
12	M	38	IVA	Faringe	-	-	+	+
13	M	68	IVA	Cavidad Oral	+	+	+	+
14	M	55	IVA	Cavidad Oral	-	+	+	+
15	M	49	IVA	Laringe	-	+	-	+
16	M	72	IVA	Faringe	-	+	-	+
17	M	72	IVA	Faringe	-	+	-	+
18	M	61	IVB	Faringe	+	+	+	+

En 16 de los 18 pacientes con niveles elevados de CIC se detectó reacción positiva con al menos uno de los anticuerpos empleados. Los antígenos fueron detectados en el precipitado de PEG

3,5% así como en las fracciones eluidas con PBS (pH 7,4) o glicina HCl (pH 2,8). El centro proteico de MUC1 (AcMo C595) fue detectado en 8/18 muestras las cuales se correspondieron a un paciente en estadio I, ninguno en estadio II, 3 en estadio III y 4 en estadio IV. En 6 ocasiones se observó la presencia de bandas de alto peso molecular y la característica doble banda de MUC1 presente en el precipitado de PEG 3,5% y en la fracción PBS. También se observaron numerosas bandas de menor peso molecular en las tres fracciones. En la figura 22 se observan dos ejemplos de CIC aislados a través del método de precipitación con PEG 3,5% y cromatografía de afinidad de Proteína A Sefarosa CL-4B. (A) Un paciente portador de cáncer de laringe en estadio III (T3 N0) y (B) un paciente con carcinoma oral en estadio IV (T4 N1). Se observa en ambos casos bandas dobles de alto peso molecular de aproximadamente 130 y 150 kD presentes en el precipitado de PEG 3,5% y en la fracción eluída con PBS.

Figura 22: Dos ejemplos de CIC analizados por Western Blot empleando el AcMo C595 (anti MUC1).



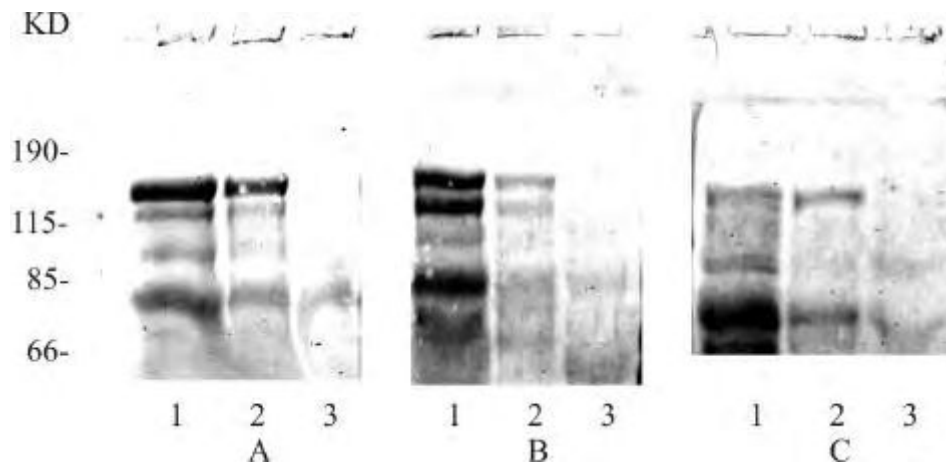
kD=kilo Dalton; 1) precipitado de PEG 3,5%; 2) fracción eluída con PBS; 3)fracción eluída con Glicina HCl.
Referencias en el texto

El antígeno *sialil Lewis x* (AcMo KM93) fue detectado en 14/18 muestras y, si bien el patrón de expresión de las bandas coincidió con el observado para MUC1, más de la mitad de los pacientes en que se logró identificar este antígeno no presentaron MUC1 en los CIC.

El antígeno *Lewis x* fue detectado en 7/18 muestras. Fue posible observar una reacción difusa en pesos moleculares inferiores a 100 kD mientras que no hubo reacción en los pesos

moleculares mayores. El antígeno *Lewis y* fue hallado en 13/18 muestras, observándose una reacción difusa que abarcó todos los pesos moleculares y, en ocasiones, se advirtieron bandas de alto peso molecular. En la figura 18 se muestran tres ejemplos de ensayos de Western Blot en los cuales se empleó el AcMo C14 (anti *Lewis y*) en CIC aislados del suero de: (A) un paciente con un tumor escasamente diferenciado de laringe en estadio I (T1 N0), (B) de un paciente portador de un tumor diferenciado de laringe en estadio IV (T3 N1) y (C) de un paciente con carcinoma oral en estadio III (T3 N0) bien diferenciado. En los dos primeros casos se observa la presencia de bandas de alto peso molecular (130-150 kD aproximadamente) en las fracciones de precipitados de PEG y en el eluido de PBS. Así mismo se advierten bandas de menor peso molecular acompañadas de una reacción difusa, particularmente una banda de 75-80 kD se repite en las tres muestras y en las tres fracciones estudiadas.

Figura 18: Tres ejemplos de CIC analizados por Western Blot empleando el AcMo C14 (anti *Lewis y*).



kD=kilo Dalton; 1) precipitado de PEG 3,5%; 2) fracción eluida con PBS; 3) fracción eluida con Glicina HCl. Referencias en el texto

Cultivo primario de tejidos de CECC

A partir del tejido obtenido en condiciones de esterilidad se procedió al establecimiento de cultivos primarios empleando la técnica de explantos. Se emplearon muestras provenientes de 6 tumores de laringe y dos de cavidad oral, de los cuales se obtuvo cultivos a corto plazo (hasta 2

meses) que desarrollaron colonias de células de aspecto epitelial. Ninguno de éstos pudo ser continuado para el establecimiento de líneas celulares debido a la presencia de contaminación o sobrecrecimiento de fibroblastos. Por otra parte, por cada uno de los tumores se inyectaron suspensiones celulares en dos ratones *nude* (atímicos) hembras empleando la vía subcutánea. En ningún caso se comprobó el desarrollo de tumor dentro de los seis meses mínimos de observación.

INDICE DE LA DISCUSIÓN

Análisis de las variables clínicopatológicas de los pacientes con CECC	143
Expresión antigénica de MUC1 en el CECC	144
Expresión histológica del centro peptídico extracelular de MUC1	144
Expresión histológica de la cola citoplásmica de MUC1	148
Expresión de MUC1 en fracciones subcelulares	149
Efecto del tratamiento con neuraminidasa	150
Aislamiento de MUC1	152
Expresión antigénica de antígenos del grupo Lewis en el CECC	152
Antígenos Lewis x/y	153
Antígeno Sialil Lewis x	155
Expresión antigénica de carbohidratos Tn y sialil Tn asociados a mucinas	156
Medición de niveles de MUC1 sérica	157
Respuesta inmune humoral en el CECC	159
Niveles de CIC en pacientes con CECC	159
Aislamiento e identificación de antígenos asociados a CIC en pacientes con CECC	160

DISCUSIÓN

El CECC tradicionalmente era considerado una neoplasia que presentaba una escasa expresión antigénica y que estaba asociada a la existencia de una importante inmunosupresión, lo que generaba reservas en cuanto a la posibilidad de desarrollar algún tipo de tratamiento inmunológico adecuado. El estudio de nuevos antígenos asociados a tumor y su evaluación como marcadores o blancos terapéuticos resultará en nuevas oportunidades de sobrevida para los pacientes con CECC.

Tradicionalmente se caracteriza a las mucinas como glicoproteínas expresadas exclusivamente en epitelios glandulares o en las neoplasias derivadas de estos, es decir adenocarcinomas. Sin embargo, hemos demostrado que existe una amplia expresión de la MUC1 en epitelios escamosos normales y en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

Análisis de las variables clínicopatológicas de los pacientes con CECC

Al efectuar el análisis de los componentes principales de estas variables, nosotros demostramos una relación positiva entre los estadios tumorales T y N, es decir que a mayor tamaño tumoral mayor es la posibilidad de que el paciente se presente con diseminación ganglionar. Esta relación ya ha sido muy estudiada. Recientemente, Y Okada y colegas (2003) estudiaron la diseminación ganglionar en 38 pacientes portadores de tumores de la cavidad oral y demostraron un aumento en la incidencia de metástasis regionales del 31%, en el estadio T1, al 60 % en el estadio T4.

La correlación negativa que nosotros observamos entre las variables de estadio tumoral T y N y la diferenciación tumoral es un fenómeno reconocido desde el trabajo de AC Broders (1920) sobre el carcinoma epidermoide de labio, y que ha sido revisado sucesivamente por PA Jakobsson y colegas (1973) y G Anneroth y colegas (1987). En este sentido, nuestras observaciones sobre

tumores indiferenciados localizados en la faringe de mayor tamaño y con un mayor porcentaje de diseminación ganglionar coinciden con las de estos autores.

Expresión antigénica de MUC1 en el CECC

Los estudios de la expresión antigénica por medio de experimentos de Inmunohistoquímica o Western Blot que integran este trabajo de Tesis han demostrado una amplia expresión de MUC1 y de sus carbohidratos asociados en tumores de cabeza y cuello. Los resultados alcanzados permitieron no sólo establecer diferencias de expresión entre los distintos grupos en estudio sino que además permitieron analizar aquellas situaciones que las afectan.

Expresión histológica del centro peptídico extracelular de MUC1

Los resultados obtenidos por inmunohistoquímica mostraron una moderada expresión del centro proteico extracelular de MUC1 tanto al nivel de la membrana plasmática como del citoplasma de las células tumorales. El patrón de expresión más frecuente para los tumores que presentaron algún grado de diferenciación era heterogéneo, y su distribución se restringía a las capas medias y centrales de los nidos epiteliales. Las mucinas se expresaron en las membranas plasmáticas de los estratos epiteliales superiores, en tanto que en las capas basales se pudo observar la misma a nivel citoplásmico. En los tumores con un menor grado de diferenciación el cuadro histológico era más homogéneo, mientras que en las muestras histológicas de tejido normal se observó una reacción de escasa intensidad limitada a las células próximas a la zona superficial.

Las diferencias en la expresión de MUC1 observadas entre los tejidos normales y tumorales se deben a diversas situaciones. En primer lugar, hay una pérdida de polaridad en la localización celular de la mucina inducida por alteraciones propias de la célula tumoral, lo cual afecta la normal interacción de su cola citoplasmática con componentes del citoesqueleto, siendo la consecuencia de ello la presencia de MUC1 en todo el perímetro de la célula y no sólo en el sector apical (Gendler S J, 2000). En segundo lugar, a medida que se altera la arquitectura epitelial y la producción de

MUC1, su expresión ya no se limita a las capas específicas del epitelio, sino que se extiende a otras zonas de la célula y del tejido tumoral. Estas alteraciones se asocian con otras modificaciones en la capacidad adhesiva de la célula y por lo tanto le permiten a la célula tumoral liberarse del tejido tumoral que le dio origen e iniciar así el proceso de metástasis.

Desde los primeros trabajos de JP Sloane y MG Omerod (1981), en los que se empleaban antisueros contra membranas de los glóbulos de grasa de la leche humana para reconocer la presencia de este tipo de antígenos asociados a tumores, han sido publicados pocos trabajos que investiguen su expresión en el carcinoma epidermoide. Estos mismos autores (Sloane JP et al, 1982) fueron los primeros en describir la presencia del antígeno epitelial de membrana (EMA, que más tarde fuera denominado MUC1) en lesiones preneoplásicas y neoplásicas del carcinoma epidermoide de piel.

Posteriormente, B Fernández y colegas (1987) determinaron que el epitelio escamoso normal sí expresaba EMA y que los niveles de expresión no permitían distinguir entre tejidos normales, premalignos y malignos. Sin embargo, observaron que los tumores que presentaban mayor diferenciación expresaban niveles mayores de EMA, en coincidencia con nuestros hallazgos obtenidos con los anticuerpos C595 y CT33. En otra serie de pacientes (pacientes portadores de carcinoma epidermoide de piel y cavidad oral, lesiones preneoplásicas e individuos controles) que fue estudiada por Y Tatemoto y colegas (1987), estos autores hallaron escasa expresión de EMA en los individuos controles y un aumento significativo en las lesiones preneoplásicas y carcinomas invasores. Nuevamente la expresión de EMA fue mayor en los tumores bien diferenciados, en los cuales se localizó principalmente en áreas de queratinización.

Empleando técnicas de inmunohistoquímica y utilizando el AcMo DF3 (originalmente establecido contra una fracción de membranas de un tumor metastásico de mama) T Itho y colegas (1996) hallaron diferencias significativas en la expresión de MUC1 entre controles normales y muestras de epitelio displásico, y entre éstas y muestras de carcinomas de laringe y faringe. Al

analizar los pautas hitológicas de expresión de MUC1, concluyeron que la expresión en el citoplasma celular constituía la principal diferencia observada entre las lesiones displásicas y los tumores.

Por otra parte, T Nitta y colegas (2000) estudiaron la expresión tisular de MUC1 a través de inmunohistoquímica y del empleo del microscopio electrónico. Estos autores también utilizaron el AcMo DF3 y hallaron reactividad en un 59,7% de los tumores de la cavidad oral. Al correlacionar dicha expresión con los parámetros clínicos de los pacientes, sólo encontraron diferencias significativas entre aquellos pacientes que presentaban metástasis ganglionares y los que no. Estos autores señalaron que las diferencias resultan mayores si se toma en cuenta la expresión citoplásmica de MUC1 y que éstas se relacionan con los criterios de E Yamamoto (1983) del modo en que el tumor invade las regiones periféricas (modo de invasión). Es interesante notar que en los tumores que presentaron buena diferenciación T Nitta y colegas (2000) detectaron a MUC1 en las células basales de los nidos epiteliales y no en las áreas de queratinización, e incluso notaron que manifestaba una tendencia a mayor expresión en los tumores indiferenciados. Debe destacarse que la distribución celular de MUC1 observada por estos autores con el microscopio electrónico incluía la presencia en la membrana plasmática y otras membranas de vesículas citoplásmicas, pero no en el aparato de Golgi.

En coincidencia con otros autores (T Itho et al, 1996 y T Nitta et al, 2000), no hallamos una correlación entre la expresión de MUC1 y el estadio tumoral T. Sólo JP Jeannon y colegas (2001) informaron esta relación, luego de estudiar 36 pacientes portadores de cáncer de laringe, si bien no detallaron los datos clínicos del grupo de pacientes estudiados. Por otra parte, emplearon el AcMo monoclonal Ma695 (Novocastra, Gran Bretaña), el cual se encuentra dirigido contra un epítopo carbohidrato de MUC1 y no contra la porción peptídica en sí. Estos autores hallaron reactividad para MUC1 en 32/36 (89%) de los tumores y en 18/21 (85%) de los controles. Empleando análisis multivariado no hallaron una relación significativa entre MUC1 y la supervivencia del paciente.

Recientemente, SC Lim y colegas (2004) analizaron la expresión de MUC1 en 56 pacientes portadores de carcinoma oral en estadios I y II (N0) con el objetivo de estudiar el rol que la mucina pudiera cumplir en el proceso de metástasis ganglionar. Utilizando el AcMo Ma695 observaron tinción en más del 10% de las células tumorales en el 55% de los casos, aunque a través de un análisis multivariado no se logró demostrar una relación entre la presencia de futuras metástasis ganglionares y la expresión de MUC1.

El AcMo empleado por Jeannon y colegas y Lim y colegas difiere en su especificidad por MUC1 de la que presenta el empleado por nosotros (AcMo C595). El epítipo definido por Ma695 incluye ácido siálico. Luego del tratamiento con neuraminidasa, su reactividad por MUC1 en ensayos de ELISA se reduce en un 70%. Mientras que el AcMo C595 presenta un aumento de la reactividad del 100% (Dai J et al, 1998).

El 37,5% de los pacientes incluidos en este trabajo de Tesis pertenecientes a los estadios I y II fueron positivos con el AcMo C595. La diferencia de especificidades entre los anticuerpos empleados por otros investigadores puede bien explicar las discrepancias en los niveles de detección de MUC1 halladas en los distintos grupos de pacientes. Nosotros logramos demostrar un aumento sustancial de la reactividad con C595 luego del tratamiento de los cortes histológicos con neuraminidasa, lo que sumado al mayor nivel de expresión hallado con el AcMo Ma695 sugiere que la MUC1 del CECC se halla, al menos en parte, profundamente glicosilada y sialilada.

Por otra parte, Song y colegas estudiaron la expresión de MUC1 en el carcinoma de esófago empleando el AcMo Ma552 dirigido contra un epítipo peptídico (Novocastra, UK), el cual fue positivo en 90/114 casos (78,9%). Luego de cinco años de seguimiento de los pacientes y a través de un análisis multivariado hallaron una relación significativa entre la expresión de MUC1 y el desarrollo de metástasis ganglionares. Previamente, otros autores (Kijima H et al, 2001) no habían logrado demostrar esta relación y en general los niveles de tumores positivos con MUC1 eran similares a los nuestros.

Nuestro trabajo ha demostrado que existe una estrecha relación entre el grado de diferenciación y la pérdida de expresión de MUC1. Como hemos mencionado, observaciones similares han sido efectuadas por otros investigadores, especialmente CY Shin y colegas (2000), quienes demostraron que la inducción de diferenciación escamosa de una línea de células de tráquea de hamster se acompañaba de una pérdida en la expresión de *mucl* (homóloga a MUC1 humana) evaluada por PCR.

Expresión histológica de la cola citoplásmica de MUC1

La expresión de la cola citoplásmica de MUC1 presentó en los tumores tres aspectos distintos. En primer lugar una expresión “lineal” que respondió a la localización exclusiva en la membrana plasmática. En segundo lugar, un patrón “mixto” donde además fue posible apreciar la presencia de pequeñas vesículas teñidas en el citoplasma. Finalmente, un patrón de expresión “nuclear”.

La expresión de MUC1 a través del anticuerpo CT33 demostró una mayor detección que la del dominio extracelular. En general se observó una coincidencia en la reactividad de los tumores, como lo demuestran las correlaciones halladas entre C595 y los patrones de expresión lineales y citoplásmicos de CT33. Sin embargo, no se observó esta correlación con la expresión de CT33 en el núcleo celular.

Las distintas localizaciones en las que la cola citoplásmica de MUC1 fue hallada se corresponden con las observaciones de D Kufe y colegas (1984), quienes describieron la presencia de este dominio a nivel de distintas organelas del citoplasma (como por ejemplo las mitocondrias), así como en el núcleo celular. La presencia de la cola citoplásmica de MUC1 en estas localizaciones se asocia a diversos fenómenos que regulan vías importantes de la activación de la apoptosis (Wei X et al, 2005) y la proliferación celular (Li Y et al, 2003), demostrando que MUC1 ejerce un efecto

directo sobre la progresión del tumor. Nosotros detectamos la expresión nuclear de MUC1 en un número reducido de pacientes.

El análisis estadístico permitió establecer diferencias significativas entre los tumores según su grado de diferenciación. La expresión global de CT33 y particularmente el patrón de expresión lineal se asoció a una buena diferenciación tumoral. Por lo tanto, la pérdida de expresión de la cola citoplásmica de MUC1 en la membrana celular se ve acompañada de un fenotipo indiferenciado.

En las muestras de epitelio normal fue posible detectar la presencia de la cola citoplásmica de MUC1 en la mayoría de los especímenes, localizada generalmente en la zona basal y para basal pero no en la apical. La ausencia del dominio extracelular de MUC1 en las capas epiteliales inferiores podría deberse a modificaciones de la glicosilación de la molécula, que impiden el acceso del AcMo C595 o directamente a la presencia de variantes de *splicing* que carecen de este dominio. A Sengupta y colegas (2001) han puesto en duda la expresión de ambos dominios de MUC1 en el epitelio de la cavidad oral. A través de ensayos de hibridación *in situ*, estos autores no lograron demostrar la presencia de ARN mensajero que codifique las regiones de la cola citoplásmica o extracelular de MUC1. No obstante, el tejido empleado provenía de tacos de parafina a partir de los cuales es dificultoso obtener ARN de calidad adecuada. Sengupta y colegas explican la presencia de la porción extracelular de MUC1 en las capas más superficiales del epitelio oral como resultado de la adsorción de la molécula desprendida de otros epitelios, y sugieren que ésta proviene de los ductos de las glándulas salivales menores que se abren a la cavidad oral.

Expresión de MUC1 en fracciones subcelulares

Al estudiar la expresión antigénica de MUC1 por medio de ensayos de Western Blot, se observó la presencia de una reacción difusa, desde pesos superiores a 200 kD hasta 70 kD, presentándose en ocasiones bandas dobles en 200 o 150 kD. En las fracciones citoplásmicas se observó la expresión de bandas con un peso molecular de alrededor de 50 kD, las que

probablemente corresponden a productos de la degradación de la molécula. Esta expresión heterogénea de MUC1 se debe a su elevado polimorfismo, el cual es producido por la coexpresión de variantes alélicas, distintas formas de *splicing*, y a variaciones en el grado de glicosilación de la molécula. (Hanisch FG y Müller S, 2000).

A Sengupta y colegas (2001) también estudiaron la presencia de MUC1 en carcinomas por medio de Western Blot y Dot Blot. Empleando anticuerpos dirigidos contra el centro proteico de MUC1 observaron la presencia de bandas de pesos moleculares mayores a 200 kD y no detectaron bandas de menor peso.

Efecto del tratamiento con neuraminidasa

Es sabido que las cadenas laterales de carbohidratos presentes en MUC1 pueden afectar la interacción del centro proteico de la molécula y los AcMo que la reconocen (Ho JJ et al, 1995). Los mecanismos por los cuales se produce esta interferencia incluyen el enmascaramiento por la unión covalente de cadenas de carbohidratos, o bien un impedimento estérico producido por los residuos terminales de ácido siálico cargados negativamente. Como resultado de este fenómeno se obtiene una evaluación deficiente de la expresión del centro proteico de MUC1, razón por la cual nosotros procedimos a la remoción de estos azúcares.

El grado de sialilación que presenta MUC1 en los tumores epiteliales depende de la actividad y distribución de las glicosiltransferasas en el aparato de Golgi y del proceso de reinternalización y maduración de la molécula en la membrana plasmática celular. Por otra parte, el agregado prematuro de residuos de ácido siálico en las cadenas laterales de carbohidratos interrumpe el agregado de residuos subsiguientes y produce un acortamiento de las mismas. Estos fenómenos se encuentran bien descritos en otras localizaciones tumorales pero no en el CECC (Dalziel M et al, 2001).

W Bergler y colegas (1997) analizaron la presencia de ácido siálico y la existencia de sitios aceptores sin ácido siálico, es decir cadenas de polilactosaminas, en 30 pacientes con carcinoma de cavidad oral y sus metástasis ganglionares. Determinaron que tanto el tejido tumoral primario como metastático presentaban niveles elevados de sialilación, pero que ésta resultaba menor en las metástasis en donde se observaban mayor cantidad de sitios aceptores libres. Otro grupo de investigadores demostró que los niveles de ácido siálico también se hallaban elevados en el suero de los pacientes portadores de CECC (Rawal RM, et al 1999). Lo mismo se observó respecto de la actividad enzimática de la sialiltransferasa sérica (Raval GN et al, 2003).

El efecto del tratamiento con neuraminidasa también ha sido evaluado en líneas celulares tumorales humanas implantadas en ratones inmunodeficientes. Tanto los tumores como las metástasis producidas por la inyección de células A431 (una línea obtenida a partir de un carcinoma epidermoide) expresaron MUC1 y el tratamiento con neuraminidasa aumentó sustancialmente su detección (Schumacher U y Adam E, 1998).

Los resultados que hemos obtenido permiten inferir que, en el CECC, MUC1 se encuentra ampliamente glicosilada, en tanto que la remoción parcial de los residuos de ácido siálico permitió la detección de MUC1 en prácticamente la totalidad de las muestras, revelando un grado importante de sialilación presente en la molécula.

La presencia de ácido siálico no sólo afecta la expresión de un importante antígeno tumoral como es MUC1; también interfiere con la actividad de las células del sistema inmune y altera la adhesividad célula-célula y célula-sustrato, interviniendo en los procesos de metástasis. Por ejemplo, W Bergler y colegas (1998) determinaron que el aumento de sialilación en el CECC afecta la actividad del receptor del factor de crecimiento epitelial, lo cual favorece la proliferación celular.

Aislamiento de MUC1

La centrifugación en gradientes de CsCl permitió comprobar que los resultados obtenidos en las diferentes fracciones subcelulares corresponden a glicoproteínas con pesos moleculares, forma de expresión y densidad propias de las mucinas, observándose en el caso de MUC1 una densidad aproximada de 1,40 g/ml (Bhavanandan VP, 1998).

Utilizando la misma técnica, MV Croce y colegas (2000) lograron aislar MUC1 a partir de un carcinoma epidermoide de laringe y, a través del análisis por Western Blot, demostraron la existencia de una reacción difusa desde el punto de siembra hasta el frente de la corrida electroforética y, además, dos bandas nítidas de aproximadamente 180 kD. En los pacientes estudiados en este trabajo de Tesis no fue posible detectar la presencia característica de la doble banda de MUC1, lo que implicaría la ausencia de estas isoformas en las muestras estudiadas.

El aislamiento y detección de MUC1 asociada a *Lewis y* por gradientes de densidad en pacientes con CECC constituye un hallazgo totalmente original. La expresión de antígenos del grupo Lewis de clase II (*H/Lewis y/Lewis x*) asociados a mucinas ha sido descrita en otras localizaciones. C De Bolós y colegas (1995) estudiaron la asociación de MUC6 y *Lewis y* en las criptas glandulares del epitelio del estómago, y sugirieron que había cierta especificidad en la glicosilación de las mucinas digestivas. Por otra parte, SE Baldus y colegas (2002) determinaron que en el adenocarcinoma de colon la progresión de adenoma a adenocarcinoma se acompaña de un aumento significativo de la expresión del centro proteico de MUC1 conjuntamente con el antígeno *Lewis y*, pero no de otros carbohidratos del grupo Lewis o MUC2.

Expresión de antígenos del grupo Lewis en el CECC

La sobre-expresión de los antígenos del grupo Lewis tiene su origen en la neosíntesis, a partir de la desregulación de las enzimas que producen las sustancias precursoras o bien en su acumulación, producto del bloqueo de la síntesis de los productos finales, es decir los antígenos del

Grupo ABO. Durante la transformación neoplásica en el CECC se observa la desaparición de los antígenos A y B en el 80% de los individuos positivos, expresándose cantidades elevadas del antígeno precursor H. Una parte del bloqueo de la síntesis se origina por la pérdida de largos segmentos del cromosoma 9p que codifican las enzimas correspondientes. Otro porcentaje del bloqueo se asocia a la presencia de metilación del ADN en esta región, lo cual inhibe la transcripción de estas enzimas (Dabelsteen E y Gao G, 2004). A continuación, el exceso de antígeno H es convertido en las estructuras difucosiladas *Lewis b* o *Lewis y* por medio de la acción de las 1-3/4 fucosiltransferasas o, si el tejido tumoral no presenta actividad de 1-2 fucosiltransferasas, pueden producirse los antígenos *Lewis a* o *Lewis x*.

Antígenos Lewis x/y

Cuando se analizó en nuestros pacientes el patrón de expresión de *Lewis x* o *Lewis y*, éste fue coincidente en la mitad de los casos. Es probable que los precursores de estos antígenos sean convertidos indistintamente en uno u otro. Sin embargo, no puede descartarse la existencia de una reacción cruzada de los anticuerpos, teniendo en cuenta la semejanza de los epitopes que reconocen.

Los resultados obtenidos permitieron establecer una amplia expresión de antígenos del grupo Lewis de clase II en el CECC, tanto por inmunohistoquímica como a través del estudio de fracciones subcelulares. El análisis multivariado de la expresión antigénica muestra una estrecha relación entre la expresión del centro proteico extracelular de MUC1 y los antígenos *Lewis y*, *Lewis x* y *sialil Lewis x*, lo que permite afirmar que, al menos en parte, MUC1 representa una molécula portadora de este tipo de antígenos.

Otras moléculas podrían ser portadoras de cadenas de carbohidratos en el CECC. La glicoproteína CD44 es altamente polimórfica y se expresa constitutivamente en las zonas basales y parabasales del epitelio del tracto aerodigestivo superior. Las variedades de CD44 presentan pesos moleculares desde 68 kD (la molécula sin glicosilación) hasta 250 kD (completamente glicosilada),

pero sólo las moléculas de pesos mayores a 200 kD presentarían O-glicosilación (Brown TA, 1991). Algunas de estas variantes han sido relacionadas con el pronóstico del CECC, dado que se encuentran sobreexpresadas y pueden tanto reconocer carbohidratos (poseen dominios de lectinas) como expresar cadenas de polilactosaminas decoradas con residuos de ácido siálico o fucosas. De esta manera, pueden mediar la adhesión y metástasis ganglionar (Kawano T et al, 2004).

Los antígenos del grupo Lewis que también pueden estar asociados a glicoesfingolípidos (GSL), forman parte de uniones intercelulares especializadas denominadas por S Hakomori (2004) “glicosinapsis”. Estas uniones son mediadas por la interacción glicano-glicano en una región de la membrana plasmática rica en GSL y en tirosinquinazas, cuya activación genera una señal intracelular relacionada con fenómenos que alteran la diferenciación. La interacción entre los carbohidratos es específica pero débil y logra estabilidad al producirse numerosas uniones en presencia de Ca^{++} . Particular interés se ha prestado a la interacción homofílica de *Lewis x*, el cual cumple un rol fundamental en la agregación y comunicación de las células durante la embriogénesis (Eggens I et al 1989). Sin embargo, se desconoce su papel en la progresión tumoral. Aún no se ha comprobado si este tipo de interacción se observa en el CECC.

La expresión de los antígenos del grupo Lewis fue afectada principalmente por la diferenciación tumoral, observándose una pérdida de los mismos en los tumores indiferenciados. La relación entre la diferenciación celular y la expresión de las enzimas que sintetizan los antígenos del grupo Lewis (fucosiltransferasas) ha sido probada experimentalmente por T Yamada y colegas (1996). Estos autores emplearon drogas inhibidoras de la metilación del DNA para inducir a su vez la inhibición del ciclo de replicación celular y favorecer la diferenciación, lo cual fue acompañado de un aumento de la expresión de los antígenos Lewis de clase II.

El análisis estadístico de la expresión de los antígenos del grupo Lewis nos mostró una relación del epítipo *Lewis y* inversamente proporcional al estadio tumoral T. Dada la estrecha relación observada entre la diferenciación tumoral y la expresión de *Lewis y*, es probable que la

asociación negativa observada se deba al predominio de tumores indiferenciados en el estadio T4 (46% de los tumores T4 resultaron indiferenciados vs. <25% en los estadios previos).

Antígeno sialil Lewis x

A través de nuestros resultados se constató una asociación entre la expresión de *sialil Lewis x* y la diseminación ganglionar evaluada por el parámetro N. Particularmente se observó un aumento de la expresión en el estadio N3. Esta asociación en el CECC ya ha sido descrita previamente por varios autores, aunque con resultados heterogéneos. Tiempo después de que el receptor de *sialil Lewis x* (E-selectina) fuera descrito y se estableciera su relación con la diseminación de los carcinomas, CT Wenzel y colegas (1995) demostraron que *sialil Lewis x* se encontraba específicamente involucrado en la adhesión de líneas celulares de cabeza y cuello a células endoteliales en cultivo activadas por citoquinas, lo cual insinuó un rol fundamental en la diseminación del CECC. Posteriormente, T Itho y colegas (1996) analizaron la expresión de *sialil Lewis x* en lesiones preneoplásicas y carcinoma sin lograr demostrar diferencias.

Por otra parte, RW Farmer y colegas (1998) analizaron la expresión de *sialil Lewis x* en tumores primarios de cabeza y cuello y sus metástasis a órganos distantes y, aunque hallaron una mayor intensidad de marcación en las metástasis, ésta no resultó una diferencia significativa. Lamentablemente, el estadio ganglionar de los pacientes no fue incluido en el estudio. En un trabajo de SI Kurahara y colegas (1999) se estudió la expresión de *sialil Lewis x* y *sialil Lewis a* (ambos constituyen ligandos de E-selectina) tanto en tumores primarios como en líneas celulares y sólo pudo demostrarse una asociación de *sialil Lewis a* con la diseminación ganglionar.

El rol de *sialil Lewis x* en la diseminación del CECC aún no se encuentra completamente aclarado. Indiscutiblemente, la presencia de este antígeno favorece la diseminación tumoral al interactuar con su receptor E-selectina en el endotelio vascular. No obstante, en nuestros pacientes *sialil Lewis x* se expresa fundamentalmente en el tejido normal, lesiones preneoplásicas y tumores

bien diferenciados, lo cual implica un grado muy bajo de probabilidad de metástasis. Recientemente, C Ohyama y colegas (2002) demostraron experimentalmente que una expresión elevada de *sialil Lewis x* se asocia con la eliminación de las células tumorales mediada por linfocitos NK, lo que contribuye a explicar la relativa utilidad que este antígeno le confiere a los tumores.

Expresión antigénica de carbohidratos Tn y sialil Tn asociados a mucinas

Nosotros hemos detectado una muy escasa expresión de los antígenos Tn y sialil Tn en el CECC y sólo observamos una mayor tinción con el AcMo anti-Tn luego de la desialilación de las muestras. La expresión de estos antígenos no ha sido extensamente estudiada en el carcinoma epidermoide así como tampoco se ha estudiado la expresión de las enzimas que los producen.

El antígeno Tn es el producto de la actividad de las enzimas ppGalNAc transferasas sobre el centro proteico de las mucinas, y además, de que la elongación de la cadena de carbohidratos que lo contiene no se produzca. En el epitelio escamoso esta situación sólo puede ser observada en las células basales de reserva indiferenciadas que se encuentran en división. Sin embargo, no hemos podido demostrar la expresión de Tn en tumores indiferenciados, los que se asemejan morfológicamente a estas células.

Recientemente, U Mandel y colegas (1999) demostraron la expresión de las enzimas ppGalNAc T1, T2 y T3 en el epitelio escamoso, líneas celulares y carcinoma de cabeza y cuello empleando inmunofluorescencia. Estos autores determinaron que la expresión de las ppGalNAc transferasas en el epitelio normal es heterogénea y que tanto en estos tejidos como en los neoplásicos la expresión es modificada según el grado de diferenciación que presenten los mismos.

En la síntesis del antígeno sialil Tn intervienen las enzimas ST6GalNAc-I o II, produciendo la terminación temprana de la elongación de la cadena de carbohidratos. Estas enzimas no han sido estudiadas en el carcinoma epidermoide y se desconoce el rol que pudieran cumplir en la expresión

de sialil Tn en el CECC. Tradicionalmente, sialil Tn ha sido considerado como un marcador de displasia epitelial al asociarse su expresión con el período post mitótico de las células basales de reserva. Sin embargo, T Itho y colegas (1996) compararon la expresión entre epitelios normales, displásicos y el carcinoma invasor, sin hallar ninguna diferencia. Por otra parte, P Jensen y colegas (1999) estudiaron la expresión de sialil Tn en una serie de 29 pacientes con carcinoma epidermoide de piel, y hallaron un nivel de expresión del 31%, además de una notable expresión en el epitelio hiperplásico vecino a la lesión neoplásica (88%). En las muestras que hemos estudiado para este trabajo no fue posible confirmar la presencia de este fenómeno.

Medición de niveles de MUC1 sérica

La medición de los niveles séricos del centro proteico de MUC1 constituye el mejor factor pronóstico en el cáncer avanzado de mama, independientemente del tamaño tumoral o la diseminación ganglionar que posea la paciente (Duffy MJ et al, 2000). Este fenómeno resulta de gran utilidad desde el punto de vista clínico y ha dado origen al desarrollo de numerosos ensayos comerciales (entre ellos CASA, que fuera empleado en nuestros pacientes) (McGuckin MA et al, 1993). Sin embargo, los ensayos que detectan el centro proteico de MUC1 no emplean los mismos AcMo y por lo tanto presentan especificidades diferentes que evalúan fenómenos distintos. Particularmente, al estudiar mujeres embarazadas se observa una marcada elevación en los niveles de MUC1 hallados por CASA (Croce MV et al, 2001) que no se presentan, por ejemplo, empleando CA-15.3 (Devine PL et al, 1994). La mayoría de estas variaciones se originan en la presencia de diferencias en la glicosilación de la MUC1 circulante, que en el caso de las mujeres embarazadas o portadoras de cáncer de mama es deficiente.

No hemos logrado hallar literatura que describa la presencia de MUC1 circulante en el CECC y sólo algunos trabajos la han evaluado en otros carcinomas epidermoides. H Hamada y colegas (2000) estudiaron los niveles de MUC1 sérica en pacientes con cáncer de pulmón por medio de un ELISA de doble determinante similar al CASA, en el cual se empleó el AcMo H9,

dirigido contra el centro proteico de MUC1, y el AcMo KL-6, dirigido contra epitopes sialilados presentes en MUC1. Estos autores hallaron niveles elevados de MUC1 sialilada en el 39% de los carcinomas epidermoides de pulmón. Niveles inferiores se hallaron en los pacientes que presentaron adenocarcinoma o tumores de células pequeñas. Los niveles de MUC1 hallados por estos investigadores son mayores a los observados en nuestros pacientes, los cuales fueron positivos sólo en el 17,3% de los casos.

Dentro de los factores estudiados que afectan la medición de MUC1 sérica se encuentra el consumo de cigarrillos (McGuckin MA et al, 1993) que provoca un efecto inflamatorio sobre la mucosa respiratoria mediado por los compuestos de la combustión del tabaco. Los aldehídos como el formaldehído o la acroleína presentes en el humo ocasionan una estimulación crónica de leucocitos provocando la liberación de mediadores químicos de la inflamación y daño del epitelio (Hasnis E et al, 2004). Recientemente, Li y colegas demostraron que la expresión de MUC1 en queratinocitos en cultivo (células KB) aumentaba cuando las células eran expuestas a concentraciones elevadas de IL-1, IL-6, INF γ y TNF o sus combinaciones (Li X et al, 2003). También hallaron niveles elevados de MUC1 en cultivos que fueron infectados con la bacteria *Porphyromonas gingivalis*.

Por lo tanto, es posible que frente a la presencia de un agente lesionante que induce la producción de citoquinas en el epitelio del tracto aerodigestivo, se produzca un aumento de la producción y liberación de MUC1. Por otra parte, en el CECC es posible observar niveles anormalmente altos de IL-6 (Chen Z et al, 1999), la que es producida por las propias células tumorales y activa las proteínas STAT. Esto podría estimular la producción de MUC1 a través de la activación de las proteínas STAT, ya que el promotor del gen de MUC1 posee una secuencia que une a STAT3 (Gaemmers IC et al ,2000).

La proteína STAT3 se encuentra involucrada en la carcinogénesis temprana del CECC y puede ser inducida por interleuquinas o a través de los EGFR (Kijima T et al, 2002). Entonces, es

probable que los niveles elevados de MUC1 que nosotros observamos en los cortes histológicos y en el suero de pacientes portadores de CECC en estadios iniciales y con diferenciación conservada se deban, en parte, a este mecanismo.

Respuesta inmune humoral en el CECC

Niveles de CIC en pacientes con CECC

Un complejo inmune es un agregado de alto peso molecular compuesto por antígenos e inmunoglobulinas producidas en respuesta a ese antígeno, así como por proteínas del complemento en el caso de que se haya producido la activación de C3. Cuando los complejos inmunes se encuentran en circulación se denominan “complejos inmunes circulantes”.

Desde el momento en que surgió el concepto de complejo inmune se han desarrollado numerosos métodos para su medición y aislamiento, los que han sido de gran utilidad en el laboratorio de análisis clínico para el estudio de enfermedades infecciosas y autoinmunitarias. También existen antecedentes similares en la literatura sobre el estudio de CIC en pacientes portadores de enfermedad neoplásica.

En el CECC es frecuente observar la presencia de CIC en el suero de los pacientes, resultado de la interacción de antígenos circulantes y anticuerpos anti-tumor (Vlock DR et al, 1993). Si bien se desconoce cuál es el rol de los CIC en la progresión de los tumores, numerosos trabajos han demostrado que pueden ser utilizados como marcadores del pronóstico de la enfermedad.

Empleando el método de detección de CIC por medio de las células de Raji, PE Máxime y colegas (1978) determinaron una diferencia significativa entre los individuos normales (de quienes sólo el 10% resultó positivo) y los pacientes portadores de CECC, en los que se observó una positividad del 80%. Por otra parte, RW Veltri y colegas (1978), empleando el mismo método, analizaron los niveles de complejos inmunes en pacientes con CECC y compararon los pacientes que poseían una respuesta inmune celular alterada con los que no la presentaban. Hallaron que los

pacientes con una respuesta celular defectuosa presentaban niveles de CIC mayores, sugiriendo que los CIC ejercían un efecto “bloqueante” de la respuesta inmune celular. También fueron hallados niveles elevados de CIC en pacientes con lesiones preneoplásicas que, como lo demostraron C Scully y colegas (1982), presentaron niveles similares a los de portadores de carcinoma.

Estos y otros trabajos que emplearon distintos métodos arrojan un porcentaje de positividad de CIC en pacientes con CECC que oscila entre el 30% y el 60% de los casos, valores que resultan similares a los encontrados en nuestros pacientes (34,8%).

La relación que nosotros hallamos entre un estadio tumoral avanzado y niveles elevados de CIC concuerda con lo informado por N Yamanaka y colegas (1988) y GT Wolf y RA Wolfe (1990). Estos y otros autores afirman que los niveles elevados de CIC resultan del aumento de la masa tumoral y sugieren que los mismos inducen alteraciones en la inmunidad celular anti-tumor que favorecen la progresión tumoral, lo que explica en parte la utilidad de los CIC como factor pronóstico en el CECC.

Por otra parte, los niveles de CIC pueden permanecer elevados durante meses en aquellos pacientes que han recibido tratamiento quirúrgico, debido a la presencia de restos tumorales o metástasis ocultas (Das TK et al, 1995)

Aislamiento e identificación de antígenos asociados a CIC en pacientes con CECC

Empleando la cromatografía en columnas de Sefarosa y proteína A hemos logrado identificar la presencia de antígenos de MUC1 y antígenos carbohidratos del grupo Lewis en fracciones del suero de pacientes con CECC. Previamente, MV Croce y colegas (1995), mediante la misma metodología, obtuvieron fracciones antigénicas de los CIC de pacientes con cáncer de mama, a partir de las cuales identificaron la presencia del epítipo de MUC1 reconocido por el AcMo C595 mediante Western Blot. Estos autores midieron posteriormente los niveles de CIC que

contenían MUC1 en mujeres embarazadas o lactantes (Croce MV et al, 2001) y pacientes con cáncer de mama (Croce MV et al, 2003), determinando que en todos los grupos existían complejos inmunes formados tanto por IgG como por IgM. Es probable que estos complejos inmunes interfieran con el reconocimiento de la mucina y por lo tanto deben tenerse en cuenta al momento de interpretar la medición de MUC1 sérica.

Con respecto a la detección de antígenos del grupo Lewis en el suero de pacientes con CECC, es posible que tanto la MUC1 sérica como la asociada a complejos inmunes sea portadora de los antígenos del grupo Lewis que hemos detectado. R Sikut y colegas (1996) demostraron que en 11 pacientes con cáncer de mama en los que fue posible identificar a MUC1 por medio de Western Blot, 4 expresaban el antígeno sialil Lewis x asociado y que dicho epítipo estaba ausente en los pacientes que expresaban el antígeno T (Gal-GalNAc-R).

Otras glicoproteínas de interés han sido detectadas o aisladas a partir de CIC en pacientes portadores de tumores. RK Gupta y DL Morton (1992) describieron la presencia de una glicoproteína de 90-100 kD en el suero de pacientes con melanoma y determinaron que los CIC que contenían este antígeno poseían valor pronóstico y podían ser utilizados como evaluación del resultado de tratamientos inmunoterápicos (Tsioulis GJ et al, 2001). Dicho antígeno circula también como un polímero de 590-620 kD unido por enlaces disulfuros, es decir que posee las características de una mucina formadora de geles (Euhus DM et al, 1990).

El antígeno carcino-embriionario (CEA) también ha sido aislado a partir de CIC. R Pompecki y colegas (1981) demostraron la presencia de antígenos del grupo Lewis asociados al CEA en una serie de 170 pacientes con tumores en diversas localizaciones. Estos antígenos también fueron hallados en individuos controles fumadores, sugiriendo que el sistema inmune se enfrenta tempranamente durante la carcinogénesis a este tipo de antígenos. Por otra parte, C Fuchs y colegas (1988) midieron los niveles de CIC de tipo IgG e IgM que contenían CEA sin hallar relación con los niveles séricos de CEA no complejado.

CONCLUSIONES

En primer lugar hemos caracterizado los pacientes que conformaron nuestra muestra y hemos observado una similitud en cuanto a la distribución de las variables anatomoclínicas de la misma con respecto de la informada en la literatura.

A continuación, empleando distintos anticuerpos en ensayos de inmunohistoquímica hemos hallado una importante expresión de MUC1 a nivel histológico. Dicha expresión presentó diferencias en la localización celular. En las muestras provenientes de controles normales y lesiones preneoplásicas la expresión se localizó en la membrana plasmática, mientras que en el CECC pudo observarse en el citoplasma o el núcleo celular. Sin embargo, los porcentajes de positividad en los tres grupos no presentaron diferencias significativas. Con respecto a las variables estudiadas en la presente Tesis, se demostró que el grado de diferenciación tumoral afecta la expresión tisular de MUC1, ya que se hallaron diferencias significativas entre los distintos grupos. No observamos diferencias en cuanto a la localización del tumor primario o los estadios tumorales T y N.

Logramos aislar y caracterizar MUC1 de distintas fracciones subcelulares de CECC mediante la centrifugación diferencial y en gradientes de CsCl, SDS-PAGE y Western Blot, determinando que efectivamente se trata de una molécula de alto peso molecular y cuya densidad es de 1,44 g/ml, característica de las mucinas. Por medio de estos estudios demostramos que MUC1 se encuentra conjugada a cadenas de carbohidratos que contienen antígenos del grupo Lewis.

Demostramos que la MUC1 asociada a CECC está altamente glicosilada ya que el tratamiento con neuraminidasa aumentó la reactividad del anticuerpo C595, dirigido contra el centro proteico de MUC1. La correlación hallada entre la expresión de los antígenos carbohidratos del grupo Lewis y MUC1 corroboró estas observaciones.

Los antígenos del grupo Lewis de clase II (*Lewis y*, *Lewis x* y *sialil Lewis x*) se expresaron ampliamente tanto en las muestras de tejido normal como en el CECC. Al igual que MUC1 su

expresión se vio afectada por la diferenciación tumoral, y en el caso del *sialil Lewis x* se comprobó una correlación entre su expresión en el tumor primario y la presencia de diseminación ganglionar.

Analizamos la presencia de MUC1 circulante en pacientes con CECC y determinamos diferencias significativas al compararlos con los individuos controles. Observamos una disminución en los niveles de MUC1 sérica en tumores indiferenciados, aunque esta tendencia no fue significativa.

Por otra parte, determinamos los niveles de complejos inmunes circulantes por medio de la precipitación en polietilenglicol 3,5%, resultando elevados en el 36,2% de los casos, la mayoría de ellos pertenecientes a estadios avanzados de la enfermedad. Comprobamos, empleando cromatografía de afinidad en columnas de sefarosa CL-4B y proteína A, SDS-PAGE y Western Blot, que la fracción antigénica de los CIC detectados en el CECC está compuesta por MUC1 y antígenos carbohidratos del grupo Lewis, en particular *Lewis y*.

A través de estos hallazgos podemos concluir que el carcinoma de cabeza y cuello expresa la mucina humana MUC1 (tanto a nivel tisular como sérico) la que se encuentra ampliamente glicosilada en su porción extracelular, lo que afecta sensiblemente su detección. Demostramos que los antígenos del grupo Lewis de clase II forman parte de las cadenas de carbohidratos conjugadas a MUC1, y que uno de estos antígenos (*sialil Lewis x*) se asocia con la diseminación ganglionar. Por otra parte, concluimos que la expresión de estos antígenos depende del grado de diferenciación tumoral. Finalmente, demostramos la presencia de niveles elevados de CIC en pacientes portadores de CECC y que dichos complejos contienen tanto MUC1 como antígenos del grupo Lewis.

La expresión de MUC1 y antígenos carbohidratos asociados hallada en el CECC, sumado a la presencia de una respuesta inmune humoral contra estos antígenos, realza su utilidad como herramienta para el estudio de este tipo de tumores y plantea la posibilidad de su empleo en la inmunoterapia tumoral.

RESUMEN

El cáncer de cabeza y cuello representa la sexta causa de enfermedad neoplásica a nivel mundial y sus niveles de incidencia y mortalidad no han variado sustancialmente en las últimas décadas. Esta enfermedad, cuyo tratamiento impone al paciente una morbilidad importante y deteriora su calidad de vida, ha recibido escasa atención en cuanto al estudio de los antígenos asociados a tumor.

Es sabido que el CECC expresa distintos antígenos pero no existe un análisis exhaustivo de la expresión y distribución de MUC1 en esta localización tumoral. La mucina humana MUC1 es una glicoproteína de alto peso molecular expresada por las células epiteliales a la cual se asocian antígenos carbohidratos. Estos antígenos representan una oportunidad única para obtener mejores alternativas en el diagnóstico, pronóstico e inmunoterapia del cáncer de cabeza y cuello.

La finalidad del presente trabajo de tesis fue determinar la utilidad de MUC1 y antígenos asociados como marcadores tumorales en neoplasias de cabeza y cuello. Con tal fin se estudió la expresión histológica de dichos antígenos en relación con los parámetros anatomoclinicos de los pacientes y la presencia de una respuesta inmune humoral.

Se incluyeron muestras histológicas de 141 pacientes e individuos controles las cuales fueron analizadas por medio de inmunohistoquímica y Western Blot. A partir de material fresco se procedió al aislamiento de las glicoproteínas por medio de centrifugación en gradientes de densidad de guanidina HCl y CsCl. Se analizó el efecto de la desialilación sobre la expresión de MUC1. Por otra parte, se obtuvieron muestras serológicas utilizadas para la medición de MUC1 circulante empleando la técnica de ELISA, así como, para la determinación de complejos inmunes circulantes por medio de la precipitación en polietilenglicol 3,5%. A partir de estos últimos se procedió a la detección antigénica mediante cromatografía en columnas con Proteína A seguido de análisis por SDS-PAGE y Western Blot de las fracciones.

Los resultados obtenidos del estudio de estos pacientes nos demuestran una importante expresión de MUC1 tumoral, tanto su porción extracelular como su porción intracelular. Dicha expresión se encuentra relacionada con la diferenciación celular que presenta la lesión neoplásica, siendo mayor en los tumores bien diferenciados. En las muestras provenientes de controles normales y lesiones preneoplásicas se localizó en la membrana plasmática, mientras que en el CECC pudo observarse en el citoplasma o el núcleo celular; sin embargo, los porcentajes de positividad en los tres grupos no presentaron diferencias significativas. No observamos diferencias en cuanto a la localización del tumor primario o los estadios tumorales T y N.

Se pudo constatar la presencia de una glicosilación rica en ácido siálico de la porción extracelular, la cual interfiere con el reconocimiento del centro proteico de MUC1; este fenómeno explica en parte las diferencias halladas en el reconocimiento de la cola citoplásmica de la molécula, el cual no depende del estado de glicosilación de la misma.

La porción citoplásmica de MUC1 fue detectada en el 78,6% de los casos analizados por inmunohistoquímica y su presencia en la membrana plasmática coincidió con la expresión de la porción extracelular.

Se logró aislar y caracterizar MUC1 de distintas fracciones subcelulares de CECC mediante la centrifugación diferencial y en gradientes de CsCl, SDS-PAGE y Western Blot, determinando que efectivamente se trata de una molécula de alto peso molecular y cuya densidad es de 1,44 g/ml, característica de las mucinas. Por medio de estos estudios demostramos que MUC1 se encuentra conjugada a cadenas de carbohidratos que contienen antígenos del grupo Lewis.

La expresión de los antígenos carbohidratos del grupo Lewis también se vio afectada por la diferenciación tumoral y en el caso de *sialil Lewis x* se comprobó una relación con la presencia de invasión ganglionar en los estadios avanzados de la misma. En tanto que los antígenos Tn y sTn se expresaron esporádicamente.

El estudio de MUC1 y los antígenos carbohidratos en las fracciones subcelulares de tumores mostró un nivel mayor de reactividad en cuanto al número de tumores positivos, probablemente debido a cambios en la configuración molecular inducidos por el tratamiento realizado para el análisis electroforético.

La medición de MUC1 circulante en pacientes con CECC empleando la técnica de ELISA de doble determinante mostró diferencias significativas con los individuos controles, aunque el porcentaje de pacientes con niveles elevados fue sólo del 17,3%. En los pacientes portadores de CECC es probable que la MUC1 circulante se origine tanto a partir de los tumores que expresan la mucina, como del efecto del consumo de cigarrillos, que, según han demostrado otros autores, induce un aumento de la producción de mucinas en los epitelios expuestos.

Por medio de precipitación en PEG 3,5% evaluamos los niveles de CIC en pacientes con CECC y hallamos positividad en el 36,2% de la muestras, la gran mayoría pertenecientes a individuos en estadios avanzados de la enfermedad. Por medio de un análisis multivariado se demostró una ausencia de relación con los parámetros clínicos de los pacientes, aunque resulta clara la tendencia a un aumento en pacientes con tumores en estadios T3 y T4.

Finalmente, aislamos e identificamos la MUC1 en la fracción antigénica a partir de un grupo de 18 pacientes con niveles elevados de CIC, empleando cromatografía de afinidad con proteína A, seguida de SDS-PAGE y Western Blot de las fracciones obtenidas. De esta manera demostramos la presencia de MUC1 y los antígenos del grupo Lewis en los CIC de pacientes con CECC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res.* 2001 Apr 1;61(7):2911-6.

AJCC Cancer Staging Manual, Sixth Edition. Springer-Verlag, New York, 2002.

Anderhuber W, Steinschifter W, Schauenstein E, Gotschuli A, Habermann W, Fischer M, Felsner P, Schauenstein K. The IgG1/G2 subclass shift—a sensitive, tissue non-specific marker for malignancy. Diagnostic performance with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer.* 1999 Apr;79(11-12):1777-81.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res.* 1987 Jun;95(3):229-49.

Azuma Y, Ito M, Taniguchi A, Matsumoto K. Expression of cell surface Lewis X and Y antigens and FUT4 mRNA is increased in Jurkat cells undergoing apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jun 11;1672(3):157-63.

Babino A, Oppezzo P, Bianco S, Barrios E, Berois N, Navarrete H, Osinaga E. Tn antigen is a pre-cancerous biomarker in breast tissue and serum in n-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2000 Jun 15;86(6):753-9.

Baldus SE, Hanisch FG, Putz C, Flucke U, Monig SP, Schneider PM, Thiele J, Holscher AH, Dienes HP. Immunoreactivity of Lewis blood group and mucin peptide core antigens: correlations with grade of dysplasia and malignant transformation in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Histol Histopathol.* 2002 Jan;17(1):191-8.

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.

Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Hollingsworth MA, Merx G, van Kessel AG, Eiberg H, Steffensen R, Clausen H. Cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-Galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat. *J Biol Chem.* 1998 Nov 13;273(46):30472-81.

Bergler W, Riedel F, Schwartz-Albiez R, Gross HJ, Hormann K. A new histobiochemical method to analyze sialylation on cell-surface glycoproteins of head and neck squamous-cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1997;254(9-10):437-41.

Bergler W, Stanek A, Riedel F, Petroianu G, Hormann K. Role of sialoglycan structures for the function of the epidermal growth factor receptor and the in vitro proliferation of head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1998;255(8):414-9.

Bhavanandan VP, Zhu Q, Yamakami K, Dilulio NA, Nair S, Capon C, Lemoine J, Fournet B. Purification and characterization of the MUC1 mucin-type glycoprotein, epitectin, from human urine: structures of the major oligosaccharide alditols. *Glycoconj J.* 1998 Jan;15(1):37-49.

Bierhuizen MF, Fukuda M. Expression cloning of a cDNA encoding UDP-GlcNAc:Gal beta 1-3-GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) beta 1-6GlcNAc transferase by gene transfer into CHO cells expressing polyoma large tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Oct 1;89(19):9326-330.

- Borowitz MJ, Tuck FL, Sindelar WF, Fernsten PD, Metzgar RS. Monoclonal antibodies against human pancreatic adenocarcinoma: distribution of DU-PAN-2 antigen on glandular epithelia and adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1984 May;72(5):999-1005.
- Bouquot JE, Gorlin RJ. Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986;61:373-381.
- Bourhis J, Lubin R, Roche B, Koscielny S, Bosq J, Dubois I, Talbot M, Marandas P, Schwaab G, Wibault P, Lubinski B, Eschwege F, Soussi T. Analysis of p53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Sep 4;88(17):1228-33.
- Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, Cole IE, Sheridan BF, Jensen MJ, Morgan GJ, Hughes CJ, Sutherland RL. Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res.* 1999 Oct;5(10):2810-9.
- Boveri T. *The Origin of Malignant Tumors.* Baltimore, Williams & Wilkins, 1929
- Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003 Apr 15;63(8):1727-30.
- Brasilino de Carvalho M. Quantitative analysis of the extent of extracapsular invasion and its prognostic significance: a prospective study of 170 cases of carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Head Neck.* 1998 Jan;20(1):16-21.
- Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 1995 Mar 16;332(11):712-7.
- Broders AC. Squamous cell epithelioma of the lip. *JAMA.* 1920;74:656-64.
- Brokx RD, Revers L, Zhang Q, Yang S, Mal TK, Ikura M, Garipey J. Nuclear magnetic resonance-based dissection of a glycosyltransferase specificity for the mucin MUC1 tandem repeat. *Biochemistry.* 2003 Dec 2;42(47):13817-25.
- Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood.* 1999 Jun 15;93(12):4309-17.
- Brown TA, Bouchard T, St John T, Wayner E, Carter WG. Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol.* 1991 Apr;113(1):207-21.
- Burchell J, Durbin H, Taylor-Papadimitriou J. Complexity of expression of antigenic determinants, recognized by monoclonal antibodies HMFG-1 and HMFG-2, in normal and malignant human mammary epithelial cells. *J Immunol.* 1983 Jul;131(1):508-13.
- 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.
- Burnet FM. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet.* 1967; 1: 1171-4.
- Byers RM, Weber RS, Andrews T, McGill D, Kare R, Wolf P. Frequency and therapeutic implications of "skip metastases" in the neck from squamous carcinoma of the oral tongue. *Head & Neck.* 1997 Jan;19(1):14-9.

- Calenoff E, Cheever MA, Satam M, Dutra JC, Pelzer HJ, Kern RC, Hanson DG. Serum immunoglobulins specific for intracellular proteins of squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995 Feb;121(2):183-91.
- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996 Jun 1;56(11):2488-92.
- Camerini V, Panwala C, Kronenberg M. Regional specialization of the mucosal immune system. Intraepithelial lymphocytes of the large intestine have a different phenotype and function than those of the small intestine. *J Immunol.* 1993; 151, 1765–76.
- Cao Y, Stosiek P, Springer GF, Karsten U. Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochem Cell Biol.* 1996 Aug;106(2):197-207.
- Capaccio P, Pruneri G, Carboni N, Pagliari AV, Quatela M, Cesana BM, Pignataro L. Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patients with clinically negative cervical lymph nodes. *Head Neck.* 2000 May;22(3):234-40.
- Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH, Daniel R, Shah KV, Sidransky D. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000 Nov;6(11):4171-5.
- Cardillo TM, Blumenthal R, Ying Z, Gold DV. Combined gemcitabine and radioimmunotherapy for the treatment of pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2002 Jan 20;97(3):386-92.
- Carvalho F, Peixoto A, Steffensen R, Amorim A, David L, Sobrinho-Simoes M. MUC1 gene polymorphism does not explain the different incidence of gastric cancer in Portugal and Denmark. *Ann Hum Genet.* 1999 May;63 (Pt 3):187-91.
- Carvalho F, Seruca R, David L, Amorim A, Seixas M, Bennett E, Clausen H, Sobrinho-Simoes M. MUC1 gene polymorphism and gastric cancer—an epidemiological study. *Glycoconj J.* 1997 Jan;14(1):107-11.
- Castelli M, Cianfriglia F, Manieri A, Palma L, Pezzuto RW, Falasca G, Delpino A. Anti-p53 and anti-heat shock proteins antibodies in patients with malignant or pre-malignant lesions of the oral cavity. *Anticancer Res.* 2001 Jan-Feb;21(1B):753-8.
- Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, Enamorado I, Yeh NT, Kroog GS, Rudy S, McCullagh L, Mousa S, Quezado M, Herscher LL, Van Waes C. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 1999 Jun;5(6):1369-79.
- Chien YC, Chen JY, Liu MY, Yang HI, Hsu MM, Chen CJ, Yang CS. Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N Engl J Med.* 2001 Dec 27;345(26):1877-82.
- Cohen RF, Contrino J, Spiro JD, Mann EA, Chen LL, Kreutzer DL. Interleukin-8 expression by head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995 Feb;121(2):202-9.
- Colcher D, Hand PH, Nuti M, Schlom J. A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 May;78(5):3199-203.
- Collard JG, Schijven JF, Bikker A, La Riviere G, Bolscher JG, Roos E. Cell surface sialic acid and the invasive and metastatic potential of T-cell hybridomas. *Cancer Res.* 1986 Jul;46(7):3521-7.

- Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest.* 2002 Apr;109(8):987-91.
- 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, Price MR, Segal-Eiras A. Detection and isolation of MUC1 mucin from larynx squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2000;6(2):93-9.
- 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.
- 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, 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.
- Dabelsteen E. ABO blood group antigens in oral mucosa. What is new? *J Oral Pathol Med.* 2002 Feb;31(2):65-70.
- Dabelsteen E, Gao S. ABO blood-group antigens in oral cancer. *J Dent Res.* 2005 Jan;84(1):21-8.
- Dahiya R, Itzkowitz SH, Byrd JC, Kim YS. Mucin oligosaccharide biosynthesis in human colonic cancerous tissues and cell lines. *Cancer.* 1992 Sep 15; 70(6):1467-76.
- Dahr W, Uhlenbruck G, Bird GW. Cryptic A-like receptor sites in human erythrocyte glycoproteins: proposed nature of Tn-antigen. *Vox Sang.* 1974;27(1):29-42.
- Dai J, Allard WJ, Davis G, Yeung KK. Effect of desialylation on binding, affinity, and specificity of 56 monoclonal antibodies against MUC1 mucin. *Tumour Biol.* 1998;19 Suppl 1:100-10.
- Dalziel M, Whitehouse C, McFarlane I, Brockhausen I, Gschmeissner S, Schwientek T, Clausen H, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J. The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1. *J Biol Chem.* 2001 Apr 6;276(14):11007-15.
- Danahey DG, Tobin EJ, Schuller DE, Bier-Laning CM, Weghorst CM, Lang JC. p16 mutation frequency and clinical correlation in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol.* 1999 Mar;119(2):285-8.
- Das TK, Aziz M, Rattan A, Sherwani R. Prognostic significance of circulating immune complexes in malignant tumours of head and neck. *J Indian Med Assoc.* 1995 Jan;93(1):3-7.
- De Bolos C, Garrido M, Real FX. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology.* 1995 Sep;109(3):723-34.
- Dekker J, Rossen JW, Buller HA, Einerhand AW. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci.* 2002 Mar;27(3):126-31.
- Delvenne P, Hubert P, Jacobs N. Epithelial metaplasia: an inadequate environment for antitumour immunity? *Trends Immunol.* 2004 Apr;25(4):169-73
- Devine PL, McGuckin MA, Quin RJ, Ward BG. Serum markers CASA and CA 15-3 in ovarian cancer: all MUC1 assays are not the same. *Tumour Biol.* 1994;15(6):337-44.

- Dobrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev.* 2005 Jan;24(1):9-17.
- Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van Waes C. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2001 Aug 1;61(15):5911-8
- Druzgal CH, Chen Z, Yeh NT, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Vilela RJ, Ende K, McCullagh L, Rudy SF, Muir C, Herscher LL, Morris JC, Albert PS, Van Waes C. A pilot study of longitudinal serum cytokine and angiogenesis factor levels as markers of therapeutic response and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2005 May 26; [Epub ahead of print]
- Duffy MJ, Shering S, Sherry F, McDermott E, O'Higgins N. CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer. *Int J Biol Markers.* 2000 Oct-Dec;15(4):330-3.
- Dyce OH, Ziober AF, Weber RS, Miyazaki K, Khariwala SS, Feldman M, Ziober BL. Integrins in head and neck squamous cell carcinoma invasion. *Laryngoscope.* 2002 Nov;112(11):2025-32.
- Easton EW, Bolscher JG, van den Eijnden DH. Enzymatic amplification involving glycosyltransferases forms the basis for the increased size of asparagine-linked glycans at the surface of NIH 3T3 cells expressing the N-ras proto-oncogene. *J Biol Chem.* 1991 Nov 15;266(32):21674-80.
- Eggens I, Fenderson B, Toyokuni T, Dean B, Stroud M, Hakomori S. Specific interaction between Le-x and Le-x determinants. A possible basis for cell recognition in preimplantation embryos and in embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem.* 1989 Jun 5;264(16):9476-84.
- Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL. Role of angiogenic factors: coexpression of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in patients with head and neck squamous carcinoma. *Laryngoscope.* 1999 May;109(5):687-93.
- Engelmann K, Baldus SE, Hanisch FG. Identification and topology of variant sequences within individual repeat domains of the human epithelial tumor mucin MUC1. *J Biol Chem.* 2001 Jul 27;276(30):27764-9.
- Esteban F, Concha A, Huelin C, Perez-Ayala M, Pedrinaci S, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Histocompatibility antigens in primary and metastatic squamous cell carcinoma of the larynx. *Int J Cancer.* 1989 Mar 15;43(3):436-42.
- Euhus DM, Gupta RK, Morton DL. Characterization of a 90-100 kDa tumor-associated antigen in the sera of melanoma patients. *Int J Cancer.* 1990 Jun 15;45(6):1065-70.
- Farmer RW, Richtsmeier WJ, Scher RL. Identification of sialyl Lewis-x in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 1998 Dec;20(8):726-31.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun 1;61(5):759-67
- Fernandez B, Lund J, Meyers F. Epithelial membrane antigen expression in benign and malignant squamous epithelium of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987 Sep;97(3):288-93.
- Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer.* 1995 Dec 11;63(6):769-73.

- Foulkes WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA. Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *BMJ*. 1996 Sep 21;313(7059):716-21.
- Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 2002 Nov 1;95(9):1902-10.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*. 1986 Oct 16-22;323(6089):643-6.
- Friend SH, Horowitz JM, Gerber MR, Wang XF, Bogenmann E, Li FP, Weinberg RA. Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(24):9059-63.
- Fritz TA, Hurley JH, Trinh LB, Shiloach J, Tabak LA. The beginnings of mucin biosynthesis: the crystal structure of UDP-GalNAc:polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase-T1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 26;101(43):15307-12.
- Fuchs C, Krapf F, Kern P, Hoferichter S, Jager W, Kalden JR. CEA-containing immune complexes in sera of patients with colorectal and breast cancer—analysis of complexed immunoglobulin classes. *Cancer Immunol Immunother*. 1988;26(2):180-4.
- Fukuda M. Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Dec 19;1573(3):394-405.
- Fukushima K, Hirota M, Terasaki PI, Wakisaka A, Togashi H, Chia D, Suyama N, Fukushi Y, Nudelman E, Hakomori S. Characterization of sialosylated Lewis x as a new tumor-associated antigen. *Cancer Res*. 1984 Nov;44(11):5279-85.
- Gaemers IC, Vos HL, Volders HH, van der Valk SW, Hilkens J. A stat-responsive element in the promoter of the episialin/MUC1 gene is involved in its overexpression in carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6191-9.
- Gao S, Bennett EP, Reibel J, Chen X, Christensen ME, Krogdahl A, Dabelsteen E. Histo-blood group ABO antigen in oral potentially malignant lesions and squamous cell carcinoma—genotypic and phenotypic characterization. *APMIS*. 2004 Jan;112(1):11-20.
- Gastman BR, Atarshi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H, Whiteside TL. Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res*. 1999 Oct 15;59(20):5356-64.
- Genden EM, Ferlito A, Bradley PJ, Rinaldo A, Scully C. Neck disease and distant metastases. *Oral Oncol*. 2003 Apr;39(3):207-12.
- Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001 Jul;6(3):339-53.
- Gendler SJ, Burchell JM, Duhig T, Lamport D, White R, Parker M, Taylor-Papadimitriou J. Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Sep;84(17):6060-4.
- 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.
- Gillespie W, Kelm S, Paulson JC. Cloning and expression of the Gal-1,3GalNAc-2,3-sialyltransferase. *J Biol Chem*. 1992; 267, 21004–10.

- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3;92(9):709-20.
- Gold DV, Cardillo T, Vardi Y, Blumenthal R. Radioimmunotherapy of experimental pancreatic cancer with ¹³¹I-labeled monoclonal antibody PAM4. *Int J Cancer.* 1997 May 16;71(4):660-7.
- Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965; 121:439-62.
- 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.
- Graham RA, Burchell JM, Beverley P, Taylor-Papadimitriou J. Intramuscular immunisation with MUC1 cDNA can protect C57 mice challenged with MUC1-expressing syngeneic mouse tumour cells. *Int J Cancer.* 1996 Mar 1;65(5):664-70.
- Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 1993 Aug 1;53(15):3579-84.
- Guan HH, Budzynski W, Koganty RR, Krantz MJ, Reddish MA, Rogers JA, Longenecker BM, Samuel J. Liposomal formulations of synthetic MUC1 peptides: effects of encapsulation versus surface display of peptides on immune responses. *Bioconjug Chem.* 1998 Jul-Aug;9(4):451-8.
- Gupta RK, Morton DL. Monoclonal antibody-based ELISA to detect glycoprotein tumor-associated-antigen-specific immune complexes in cancer patients. *J Clin Lab Anal.* 1992;6(5):329-36.
- Ha PK, Califano JA. The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(5):363-9.
- Hakomori S. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. *An Acad Bras Cienc.* 2004 Sep;76(3):553-72
- Hakomori S. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol.* 2001;491:369-402
- Hamada S, Furumoto H, Kamada M, Hirao, T, Aono T. High expression rate of Tn antigen in metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Cancer Lett.* 1993 Nov 1; 74(3):167-73.
- Hamada H, Kohno N, Yokoyama A, Kondo K, Yang SZ, Hiwada K, Watanabe K, Miyake M. A novel monoclonal antibody, H9, directed against the core protein of MUC1 mucin. *Oncol Rep.* 2000 Mar-Apr;7(2):225-32.
- Hanisch FG, Muller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology.* 2000 May;10(5):439-49.
- Hanisch FG, Muller 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, Uhlenbruck G, Peter-Katalinic J, Egge H, Dabrowski J, Dabrowski U. Structures of neutral O-linked poly lactosaminoglycans on human skim milk mucins. A novel type of linearly

- extended poly-N-acetylactosamine backbones with Gal beta(1-4)GlcNAc beta(1-6) repeating units. *J Biol Chem.* 1989 Jan 15;264(2):872-83.
- Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. The human sialyltransferase family. *Biochimie.* 2001 Aug;83(8):727-37
- Hasnis E, Reznick AZ, Pollack S, Klein Y, Nagler RM. Synergistic effect of cigarette smoke and saliva on lymphocytes--the mediatory role of volatile aldehydes and redox active iron and the possible implications for oral cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 May;36(5):826-39.
- Hayes DF, Sekine H, Marcus D, Alper CA, Kufe DW. Genetically determined polymorphism of the circulating human breast cancer-associated DF3 antigen. *Blood* 1988; 71(2):436-40.
- 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.
- Heimdal JH, Aarstad HJ, Klementsens B, Olofsson J. Disease stage related in vitro responsiveness of peripheral blood T-lymphocytes in patients with head and neck carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 1998 Nov;118(6):887-91.
- Heuser C, Ganser M, Hombach A, Brand H, Denton G, Hanisch FG, Abken H. An anti-MUC1-antibody-interleukin-2 fusion protein that activates resting NK cells to lysis of MUC1-positive tumour cells. *Br J Cancer.* 2003 Sep 15;89(6):1130-9.
- Hilkens J, Buijjs F. Biosynthesis of MAM-6, an epithelial sialomucin. *J Biol Chem.* 1988; 263: 4215-4222.
- Hilkens J, Buijjs F, Hilgers J, Hageman P, Calafat J, Sonnenberg A, van der Valk M. Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. *Int J Cancer.* 1984 Aug 15;34(2):197-206.
- Hilkens J, Kroezen V, Bonfrer JM, De Jong-Bakker M, Bruning PF. MAM-6 antigen, a new serum marker for breast cancer monitoring. *Cancer Res.* 1986 May;46(5):2582-7.
- Hill HD Jr, Reynolds JA, Hill RL. Purification, composition, molecular weight, and subunit structure of ovine submaxillary mucin. *J Biol Chem.* 1977 Jun 10;252(11):3791-8
- 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, Ciborowski P, Finn OJ. Naturally processed class II epitope from the tumor antigen MUC1 primes human CD4+ T cells. *Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5066-70.
- 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.
- Hinoda Y, Nakagawa N, Nakamura H, Makiguchi Y, Itoh F, Adachi M, Yabana T, Imai K, Yachi A. Detection of a circulating antibody against a peptide epitope on a mucin core protein, MUC1, in ulcerative colitis. *Immunol Lett.* 1993 Feb;35(2):163-8.
- Hiraishi K, Suzuki K, Hakomori S, Adachi M. Le(y) antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death). *Glycobiology.* 1993 Aug;3(4):381-90.
- Hiroashi S, Clausen H, Yamada T, Shimosato Y, Hakomori S-I. Blood group A cross-reacting epitope defined by monoclonal antibodies NCC-LU-35 and -81 expressed in cancer of blood group O or B individuals: its identification as Tn antigen. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1985; 20: 120.

- Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol.* 1998 Aug;153(2):333-9.
- Ho JJ, Cheng S, Kim YS. Access to peptide regions of a surface mucin (MUC1) is reduced by sialic acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 May 25;210(3):866-73.
- Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihiro T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res.* 2002 Aug;8(8):2553-62.
- Hoption Cann SA, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J* 2003;79:672–680
- Ichikawa D, Handa K, Withers DA, Hakomori S. Histo-blood group A/B versus H status of human carcinoma cells as correlated with haptotactic cell motility: approach with A and B gene transfection. *Cancer Res.* 1997 Aug 1;57(15):3092-6.
- Imai J, Ghazizadeh M, Naito Z, Asano G. Immunohistochemical expression of T, Tn and sialyl-Tn antigens and clinical outcome in human breast carcinoma. *Anticancer Res.* 2001 Mar-Apr;21(2B):1327-34.
- Inoue M, Ogawa H, Nakanishi K, Tanizawa O, Karino K, Endo J. Clinical value of sialyl Tn antigen in patients with gynecologic tumors. *Obstet Gynecol.* 1990 Jun; 75(6):1032-6.
- Inoue M, Ton SM, Ogawa H, Tanizawa O. Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in tumor tissues of the ovary. *Am J Clin Pathol.* 1991 Dec; 96(6):711-6.
- Itoh T, Yonezawa S, Nomoto M, Ueno K, Kim YS, Sato E. Expression of mucin antigens and Lewis X-related antigens in carcinomas and dysplasia of the pharynx and larynx. *Pathol Int.* 1996 Sep;46(9):646-55.
- Itzkowitz S, Kjeldsen T, Frieria A, Hakomori S, Yang US, Kim YS. Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human pancreas. *Gastroenterology.* 1991 Jun; 100(6):1691-700.
- Itzkowitz SH, Bloom EJ, Lau TS, Kim YS. Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps. *Gut.* 1992 Apr; 33(4):518-23.
- Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi, HK, Bigbee WL, Kim Y. S. Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res.* 1989 Jan 1; 49(1):197-204.
- Izawa M, Kumamoto K, Mitsuoka C, Kanamori A, Ohmori K, Ishida H, Nakamura S, Kurata-Miura K, Sasaki K, Nishi T, Kannagi R, Expression of sialyl 6-sulfo Lewis x is inversely correlated with conventional sialyl Lewis x expression in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 2000; 60, 1410–16.
- Jakobsson PA. Histologic grading of malignancy and prognosis in glottic carcinoma of the larynx. *Can J Otolaryngol.* 1975;4(5):885-92.
- Jakobsson PA, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Martensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol.* 1973 Feb;12(1):1-8.
- Jares P, Fernandez PL, Nadal A, Cazorla M, Hernandez L, Pinyol M, Hernandez S, Traserra J, Cardesa A, Campo E. p16MTS1/CDK4I mutations and concomitant loss of heterozygosity at 9p21-23 are frequent events in squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncogene.* 1997 Sep 18;15(12):1445-53.
- Jeannon JP, Aston V, Stafford FW, Soames JV, Wilson JA. Expression of MUC1 and MUC2 glycoproteins in laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2001 Apr;26(2):109-12.

- Jensen P, Clausen OP, Bryne M. Differences in sialyl-Tn antigen expression between keratoacanthomas and cutaneous squamous cell carcinomas. *J Cutan Pathol*. 1999 Apr;26(4):183-9.
- 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.
- Johnen H, Kulbe H, Pecher G. Long-term tumor growth suppression in mice immunized with naked DNA of the human tumor antigen mucin (MUC1). *Cancer Immunol Immunother*. 2001 Sep;50(7):356-60.
- Ju T, Brewer K, D'Souza A, Cummings RD, Canfield WM. Cloning and expression of human core 1 beta1,3-galactosyltransferase. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):178-86.
- 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.
- Kannagi R. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression-The Warburg effect revisited. *Glycoconj J*. 2004;20(5):353-64.
- Karlsson S, Swallow DM, Griffiths B, Corney G, Hopkinson DA, Dawnay A, Cartron JP. A genetic polymorphism of a human urinary mucin. *Ann Hum Genet*. 1983 Oct;47 (Pt 4):263-9.
- Katayama A, Bandoh N, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Nonaka S, Harabuchi Y. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2004 Jan 15;10(2):634-40.
- Katayama Y, Hidalgo A, Chang J, Peired A, Frenette PS. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med*. 2005 Apr 18;201(8):1183-9.
- Kato K, Takeuchi H, Miyahara N, Kanoh A, Hassan H, Clausen H, Irimura T. Distinct orders of GalNAc incorporation into a peptide with consecutive threonines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Sep 14;287(1):110-5.
- Kawano T, Nakamura Y, Yanoma S, Kubota A, Furukawa M, Miyagi Y, Tsukuda M. Expression of E-cadherin, and CD44s and CD44v6 and its association with prognosis in head and neck cancer. *Auris Nasus Larynx*. 2004 Mar;31(1):35-41.
- Kawano T, Yanoma S, Nakamura Y, Ozeki A, Kokatsu T, Kubota A, Furukawa M, Tsukuda M. Soluble CD44 standard, CD44 variant 5 and CD44 variant 6 and their relation to staging in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol*. 2005 Apr;125(4):392-7.
- Kijima H, Chino O, Oshiba G, Tanaka H, Kenmochi T, Kise Y, Shimada H, Abe Y, Tokunaga T, Yamazaki H, Nakamura M, Tanaka M, Makuuchi H, Ueyama Y. Immunohistochemical MUC1 (DF3 antigen) expression of human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2001 Mar-Apr;21(2B):1285-9.
- Kijima T, Niwa H, Steinman RA, Drenning SD, Gooding WE, Wentzel AL, Xi S, Grandis JR. STAT3 activation abrogates growth factor dependence and contributes to head and neck squamous cell carcinoma tumor growth in vivo. *Cell Growth Differ*. 2002 Aug;13(8):355-62.
- Kinarsky L, Suryanarayanan G, Prakash O, Paulsen H, Clausen H, Hanisch FG, Hollingsworth MA, Sherman S. Conformational studies on the MUC1 tandem repeat glycopeptides: implication for the enzymatic O-glycosylation of the mucin protein core. *Glycobiology*. 2003 Dec;13(12):929-39.
- Kinlough CL, Poland PA, Bruns JB, Harkleroad KL, Hughey RP. MUC1 membrane trafficking is modulated by multiple interactions. *J Biol Chem*. 2004 Dec 17;279(51):53071-7

- Kinney AY, Sahin A, Vernon SW, Frankowski RF, Annegers JF, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Frye DK, Dhingra K. The prognostic significance of sialyl-Tn antigen in women treated with breast carcinoma treated with adjuvant chemotherapy. *Cancer*. 1997 Dec 15;80(12):2240-9.
- Kitamura K, Stockert E, Garin-Chesa P, Welt S, Lloyd KO, Armour KL, Wallace TP, Harris WJ, Carr FJ, Old LJ. Specificity analysis of blood group Lewis-y (Le(y)) antibodies generated against synthetic and natural Le(y) determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 20;91(26):12957-61.
- Klinger M, Farhan H, Just H, Drobny H, Himmler G, Loibner H, Mudde GC, Freissmuth M, Sexl V. Antibodies directed against Lewis-Y antigen inhibit signaling of Lewis-Y modified ErbB receptors. *Cancer Res*. 2004 Feb 1;64(3):1087-93.
- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68(4):820-3.
- Kobayashi H, Terao T, Kawashima Y. Clinical evaluation of circulating serum sialyl Tn antigen levels in patients with epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 1991 Jun; 9(6):983-7.
- Koblyka D, Carraway KL. Proteins and glycoproteins of the milk fat globule membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1972; 288: 282.
- Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256(5517):495-7.
- 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.
- Kramer IR, Lucas RB, Pindborg, JJ, et al. WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral pre-cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;46:518-539.
- Krecicki T, Jelen M, Zalesska-Krecicka M, Rak J, Szkudlarek T, Jelen-Krzyszewska J. Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in laryngeal epithelial lesions. *Oral Oncol*. 1999 Mar;35(2):180-6.
- Kufe D, Inghirami G, Abe M, Hayes D, Justi-Wheeler H, Schlom J. Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma* 1984; 3(3):223-32.
- Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Hiraki A, Sasaki M, Beppu M, Shirasuna K. Immunohistochemical study of sialyl Le(a) and sialyl Le(x) antigen in oral squamous cell carcinoma: the association of sialyl Le(a) expression with the metastatic potential. *Head Neck*. 1999 Jul;21(4):330-7.
- Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL. Imbalance in absolute counts of T lymphocyte subsets in patients with head and neck cancer and its relation to disease. *Adv Otorhinolaryngol*. 2005;62:161-72.
- Kwon SY, Kim HJ, Woo JS, Jung KY, Kim I. The usefulness of cytokeratin immunohistochemistry in detection of lymph node micrometastasis in neck dissection specimens. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Sep;131(3):300-6.
- Lalla RV, Boissoneau DS, Spiro JD, Kreutzer DL. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Aug;129(8):882-8.
- Lan MS, Batra SK, Qi WN, Metzgar RS, Hollingsworth MA. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J Biol Chem*. 1990a Sep 5;265(25):15294-9.

- Lan MS, Hollingsworth MA, Metzgar RS. Polypeptide core of a human pancreatic tumor mucin antigen. *Cancer Res.* 1990b May 15;50(10):2997-3001.
- Lang S, Whiteside TL, Lebeau A, Zeidler R, Mack B, Wollenberg B. Impairment of T-cell activation in head and neck cancer in situ and in vitro: strategies for an immune restoration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999 Jan;125(1):82-8.
- Leethanakul C, Knezevic V, Patel V, Amornphimoltham P, Gillespie J, Shillitoe EJ, Emko P, Park MH, Emmert-Buck MR, Strausberg RL, Krizman DB, Gutkind JS; Head and Neck Cancer Genome Anatomy Project. Gene discovery in oral squamous cell carcinoma through the Head and Neck Cancer Genome Anatomy Project: confirmation by microarray analysis. *Oral Oncol.* 2003 Apr;39(3):248-58.
- Leivonen M, Nordling S, Lundin J, von Boguslawski K, Haglund C. STn and prognosis in breast cancer. *Oncology.* 2001;61(4):299-305.
- Levitin F, Baruch A, Weiss M, Stiegman K, Hartmann ML, Yoeli-Lerner M, Ziv R, Zrihan-Licht S, Shina S, Gat A, Lifschitz B, Simha M, Stadler Y, Cholostoy A, Gil B, Greaves D, Keydar I, Zaretsky J, Smorodinsky N, Wreschner DH. A novel protein derived from the MUC1 gene by alternative splicing and frameshifting. *J Biol Chem.* 2005 Mar 18;280(11):10655-63.
- Li X, Wang L, Nunes DP, Troxler RF, Offner GD. Pro-inflammatory cytokines up-regulate MUC1 gene expression in oral epithelial cells. *J Dent Res.* 2003 Nov;82(11):883-7.
- Li Y, Liu D, Chen D, Kharbanda S, Kufe D. Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene. *Oncogene.* 2003 Sep 4;22(38):6107-10.
- Li Y, Ren J, Yu W, Li Q, Kuwahara H, Yin L, Carraway KL 3rd, Kufe D. The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin. *J Biol Chem.* 2001 Sep 21;276(38):35239-42.
- 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.
- Lim SC, Zhang S, Ishii G, Endoh Y, Kodama K, Miyamoto S, Hayashi R, Ebihara S, Cho JS, Ochiai A. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):166-72.
- 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.
- Lloyd KO, Kabat EA, Layug EJ, Gruezo F. Immunochemical studies on blood groups. XXXIV. Structures of some oligosaccharides produced by alkaline degradation of blood group A, B, and H substances. *Biochemistry.* 1966 May;5(5):1489-501.
- Lo-Man R, Vichier-Guerre S, Bay S, Deriaud E, Cantacuzene D, Leclerc C. Anti-tumor immunity provided by a synthetic multiple antigenic glycopeptide displaying a tri-Tn glycotope. *J Immunol.* 2001 Feb 15;166(4):2849-54.
- Longenecker BM, Willans DJ, MacLean GD, Selvaraj S, Suresh MR, Noujaim AA. Monoclonal antibodies and synthetic tumor-associated glycoconjugates in the study of the expression of

- Thomsen-Friedenreich-like and Tn-like antigens on human cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1987 Mar;78(3):489-96.
- Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP, Larsen RD, Berhend TL, Marks RM. ELAM-1--dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell.* 1990 Nov 2;63(3):475-84.
- Lundin M, Nordling S, Roberts PJ, Lundin J, Carpelan-Holmstrom M, von Boguslawsky K, Haglund C. Sialyl Tn is a frequently expressed antigen in colorectal cancer: No correlation with patient prognosis. *Oncology.* 1999 Jul;57(1):70-6.
- Lundy J, Thor A, Maenza R et al. Monoclonal antibody DF3 correlates with tumor differentiation and hormone receptor status in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1985; 5(3):269-76.
- Magarian-Blander J, Domenech N, Finn OJ. Specific and effective T-cell recognition of cells transfected with a truncated human mucin cDNA. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Aug 12;690:231-43.
- Magarian-Blander J, Ciborowski P, Hsia S, Watkins SC, Finn OJ. Intercellular and intracellular events following the MHC-unrestricted TCR recognition of a tumor-specific peptide epitope on the epithelial antigen MUC1. *J Immunol.* 1998 Apr 1;160(7):3111-20.
- Mandel U, Hassan H, Therkildsen MH, Rygaard J, Jakobsen MH, Juhl BR, Dabelsteen E, Clausen H. Expression of polypeptide GalNAc-transferases in stratified epithelia and squamous cell carcinomas: immunohistological evaluation using monoclonal antibodies to three members of the GalNAc-transferase family. *Glycobiology.* 1999 Jan;9(1):43-52.
- Mann EA, Spiro JD, Chen LL, Kreutzer DL. Cytokine expression by head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg.* 1992 Dec;164(6):567-73.
- Martin-Satue M, de Castellarnau C, Blanco J, Overexpression of á (1,3)-fucosyltransferase VII is sufficient for the acquisition of lung colonization phenotype in human lung adenocarcinoma HAL-24Luc cells, *Br J Cancer.* 1999; 80, 1169–74.
- Martone T, Rosso P, Albera R, Migliaretti G, Fraire F, Pignataro L, Pruneri G, Bellone G, Cortesina G. Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncol.* 2005 Feb;41(2):147-55.
- Maxim PE, Veltri RW, Sprinkle PM, Pusateri RJ 3rd. Soluble immune complexes in sera from head and neck cancer patients: a preliminary report. *Otolaryngology.* 1978 May-Jun;86(3 Pt 1):ORL428-32.
- McGuckin MA, Ramm LE, Joy GJ, Devine PL, Ward BG. Circulating tumour-associated mucin concentrations, determined by the CASA assay, in healthy women. *Clin Chim Acta.* 1993 Feb 28;214(2):139-51.
- Metzgar RS, Gaillard MT, Levine SJ, Tuck FL, Bossen EH, Borowitz MJ. Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1982 Feb;42(2):601-8.
- Miles D, Papazisis K. Rationale for the Clinical Development of STn-KLH (Theratope®) and Anti-MUC-1 Vaccines in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2003 Feb;3 Suppl 4:S134-8.
- Moreau R, Dausset J, Bernard J and Moullec J. Acquired hemolytic anemia with polyagglutinability of erythrocytes by a new factor present in normal blood. *Bull Mem Soc Med Hop Paris.* 1957 Jun 14-1957 Jun 21; 73(20-21):569-87.
- Mourant AE. A 'new' human blood group antigen of frequent occurrence. *Nature (London).* 1946; 158: 237.

- Muller HJ. Some present problems in the genetic effects of radiation. *J Cell Physiol.* 1950 Jun;35(Suppl. 1):9-70.
- 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.
- Muroi K, Suda T, Nojiri H, Ema H, Amemiya Y, Miura Y, Nakauchi H, Singhal A, Hakomori S. Reactivity profiles of leukemic myeloblasts with monoclonal antibodies directed to sialosyl-Le(x) and other lacto-series type 2 chain antigens: absence of reactivity with normal hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1992 Feb 1;79(3):713-9.
- Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, Jibiki MA, Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T, Kurosaki N, Ayabe H, Arisawa K. Preoperative serum levels of sialyl Lewis(a), sialyl Lewis(x), and sialyl Tn antigens as prognostic markers after curative resection for colorectal cancer. *Cancer Detect Prev.* 2001;25(3):299-308.
- Nakaya H, Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Kato K, Hase T, Yamamoto E. Influences of angiogenesis and lymphangiogenesis on cancerous invasion in experimentally induced tongue carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005 Feb;34(2):87-92.
- Nawroz H, van der Riet P, Hruban RH, Koch W, Ruppert JM, Sidransky D. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1994 Mar 1;54(5):1152-5.
- Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002 Jul-Aug;52(4):195-215.
- Nitta T, Sugihara K, Tsuyama S, Murata F. Immunohistochemical study of MUC1 mucin in premalignant oral lesions and oral squamous cell carcinoma: association with disease progression, mode of invasion, and lymph node metastasis. *Cancer.* 2000 Jan 15;88(2):245-54.
- Numata Y, Nakada H, Fukui S, Kitagawa H, Ozaki K, Inoue M, Kawasaki T, Funakoshi I, Yamashina I. A monoclonal antibody directed to Tn antigen. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Aug 16;170(3):981-5.
- Nuti M, Teramoto YA, Mariani-Costantini R, Hand PH, Colcher D, Schlom J. A monoclonal antibody (B72.3) defines patterns of distribution of a novel tumor-associated antigen in human mammary carcinoma cell populations. *Int J Cancer.* 1982 May 15;29(5):539-45.
- Obermair A, Schmid BC, Stimpfl M, Fasching B, Preyer O, Leodolter S, Crandon AJ, Zeillinger R. Novel MUC1 splice variants are expressed in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2001 Nov;83(2):343-7.
- Odajima T, Sasaki Y, Tanaka N, Kato-Mori Y, Asanuma H, Ikeda T, Satoh M, Hiratsuka H, Tokino T, Sawada N. Abnormal beta-catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, Ki-67 labeling index, and clinicopathological features. *Hum Pathol.* 2005 Mar;36(3):234-41.
- Ogawa J, Sano A, Inoue H, Koide S. Expression of Lewis-related antigen and prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1995 Feb;59(2):412-5.
- Ohyama C, Kanto S, Kato K, Nakano O, Arai Y, Kato T, Chen S, Fukuda MN, Fukuda M. Natural killer cells attack tumor cells expressing high levels of sialyl Lewis x oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 15;99(21):13789-94.
- Okada Y, Mataga I, Katagiri M, Ishii K. An analysis of cervical lymph nodes metastasis in oral squamous cell carcinoma. Relationship between grade of histopathological malignancy and lymph nodes metastasis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Jun;32(3):284-8.

- Ono Y, Nakanishi Y, Ino Y, Niki T, Yamada T, Yoshimura K, Saikawa M, Nakajima T, Hirohashi S. Clinicopathologic significance of laminin-5 gamma2 chain expression in squamous cell carcinoma of the tongue: immunohistochemical analysis of 67 lesions. *Cancer*. 1999 Jun 1;85(11):2315-21.
- 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.
- Osako M, Yonezawa S, Siddiki B, Huang J, Ho JJ, Kim YS, Sato E. Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in human pancreatic tumors. *Cancer*. 1993 Apr 1; 71(7):2191-9.
- 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.
- Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC, Perez M, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science*. 1990 Nov 23;250(4984):1130-2.
- Pigman W, Moschera J, Weiss M, Tettamanti G. The occurrence of repetitive glycopeptide sequences in bovine submaxillary glycoprotein. *Eur J Biochem*. 1973 Jan 3;32(1):148-54.
- Pode D, Golijanin D, Sherman Y, Lebensart P, Shapiro A. Immunostaining of Lewis X in cells from voided urine, cytopathology and ultrasound for noninvasive detection of bladder tumors. *J Urol*. 1998 Feb;159(2):389-92
- Pompecki R, Shively JE, Todd CW. Demonstration of elevated anti-Lewis antibodies in sera of cancer patients using a carcinoembryonic antigen-polyethylene glycol immunoassay. *Cancer Res*. 1981 May;41(5):1910-5.
- 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.
- Prime SS, Pitigala-Arachchi A, Crane IJ, Rosser TJ, Scully C. The expression of cell surface MHC class I heavy and light chain molecules in pre-malignant and malignant lesions of the oral mucosa. *Histopathology*. 1987 Jan;11(1):81-91.
- Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Ronchetti D, Cesana BM, Ottaviani A, Neri A, Buffa R. Clinical relevance of p53 and bcl-2 protein over-expression in laryngeal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1998 Jun 19;79(3):263-8.
- Pyke C, Salo S, Ralfkiaer E, Romer J, Dano K, Tryggvason K. Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer Res*. 1995 Sep 15;55(18):4132-9.
- Rauvala H. Gangliosides of human kidney. *J Biol Chem*. 1976 Dec 10;251(23):7517-20.
- Raval GN, Patel DD, Parekh LJ, Patel JB, Shah MH, Patel PS. Evaluation of serum sialic acid, sialyltransferase and sialoproteins in oral cavity cancer. *Oral Dis*. 2003 May;9(3):119-28.
- Ravn V, Dabelsteen E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS*. 2000 Jan;108(1):1-28.
- Rawal RM, Patel PS, Patel BP, Raval GN, Patel MM, Bhatavdekar JM, Dixit SA, Patel DD. Evaluation of glycoprotein constituents in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. *Head Neck*. 1999 May;21(3):192-7.

- Reddy PK, Gold DV, Cardillo TM, Goldenberg DM, Li H, Burton JD. Interferon-gamma upregulates MUC1 expression in haematopoietic and epithelial cancer cell lines, an effect associated with MUC1 mRNA induction. *Eur J Cancer*. 2003 Feb;39(3):397-404.
- Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 1996 Aug 15;56(16):3630-3.
- Rege VP, Painter TJ, Watkins WM, Morgan WT. Three new trisaccharides obtained from human blood-group A, B, H and Lea substances: possible sugar sequences in the carbohydrate chains. *Nature*. 1963 Nov 9;200:532-4
- Reichert TE, Day R, Wagner EM, Whiteside TL. Absent or low expression of the zeta chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma. *Cancer Res*. 1998a Dec 1;58(23):5344-7.
- Reichert TE, Rabinowich H, Johnson JT, Whiteside TL. Mechanisms responsible for signaling and functional defects. *J Immunother*. 1998b Jul;21(4):295-306.
- Ribeiro U, Safatle-Ribeiro AV, Posner MC, Rosendale B, Bakker A, Swalsky PA, Kim R, Reynolds JC, Finkelstein SD. Comparative p53 mutational analysis of multiple primary cancers of the upper aerodigestive tract. *Surgery*. 1996 Jul;120(1):45-53.
- Ross GL, Shoaib T, Soutar DS, MacDonald DG, Camilleri IG, Bessent RG, Gray HW. The First International Conference on Sentinel Node Biopsy in Mucosal Head and Neck Cancer and adoption of a multicenter trial protocol. *Ann Surg Oncol*. 2002 May;9(4):406-10.
- Rothschild BM, Witzke BJ, Hershkovitz I. Metastatic cancer in the Jurassic. *Lancet* 1999; 354(9176):398.
- 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.
- Sandmaier BM, Oparin DV, Holmberg LA, Reddish MA, MacLean GD, Longenecker BM. Evidence of a cellular immune response against sialyl-Tn in breast and ovarian cancer patients after high-dose chemotherapy, stem cell rescue, and immunization with Theratope STn-KLH cancer vaccine. *J Immunother*. 1999 Jan;22(1):54-66.
- Saranath D, Mukhopadhyaya R, Rao RS, Fakih AR, Naik SL, Gangal SG. Cell-mediated immune status in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 1985 Sep 1;56(5):1062-70.
- Schachter H, McGuire EJ, Roseman S. Sialic acids. 13. A uridine diphosphate D-galactose: mucin galactosyltransferase from porcine submaxillary gland. *J Biol Chem*. 1971 Sep 10;246(17):5321-8
- Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer*. 2005 Mar 14;92(5):913-20.
- Schumacher U, Adam E. Immunohistochemical detection of the MUC1 gene product in human cancers grown in scid mice. *J Histochem Cytochem*. 1998 Jan;46(1):127-34.
- Schwartz RS. Paul Ehrlich's magic bullets. *N Engl J Med* 2004; 350(11):1079-80.
- Scully C. Immunological abnormalities in oral carcinoma and oral keratosis. *J Maxillofac Surg*. 1982 May;10(2):113-5.

- Scully C, Barkas T, Boyle P, McGregor IA. Circulating immune complexes detected by binding of radiolabelled protein A in patients with oral cancer and oral premalignant lesions. *J Clin Lab Immunol.* 1982 Jun;8(2):113-5.
- Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000;35(2):71-103.
- Sengupta A, Valdramidou D, Huntley S, Hicks SJ, Carrington SD, Corfield AP. Distribution of MUC1 in the normal human oral cavity is localized to the ducts of minor salivary glands. *Arch Oral Biol.* 2001 Jun;46(6):529-38.
- Shimizu M, Yamauchi K. Isolation and characterization of mucin-like glycoprotein in human milk fat globule membrane. *J Biochem (Tokyo).* 1982 Feb;91(2):515-24.
- Shin CY, Park KH, Ryu BK, Choi EY, Kim KC, Ko KH. Squamous differentiation downregulates Muc1 mucin in hamster tracheal surface epithelial cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 May 19;271(3):641-6.
- Shores CG, Yin X, Funkhouser W, Yarbrough W. Clinical evaluation of a new molecular method for detection of micrometastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004 Aug;130(8):937-42.
- Siddiqui J, Abe M, Hayes D, Shani E, Yunis E, Kufe D. Isolation and sequencing of a cDNA coding for the human DF3 breast carcinoma-associated antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Apr;85(7):2320-3.
- 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.
- Silva F, Carvalho F, Peixoto A, Seixas M, Almeida R, Carneiro F, Mesquita P, Figueiredo C, Nogueira C, Swallow DM, Amorim A, David L. MUC1 gene polymorphism in the gastric carcinogenesis pathway. *Eur J Hum Genet.* 2001 Jul;9(7):548-52.
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953 Sep;6(5):963-8.
- Sloane JP, Ormerod MG. Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer.* 1981 Apr 1;47(7):1786-95.
- Sloane JP, Ormerod MG, Carter RL, Gusterson BA, Foster CS. An immunocytochemical study of the distribution of epithelial membrane antigen in normal and disordered squamous epithelium. *Diagn Histopathol.* 1982 Jan-Mar;5(1):11-7.
- Sloane JP, Ormerod MG, Imrie SF, Coombes RC. The use of antisera to epithelial membrane antigen in detecting micrometastases in histological sections. *Br J Cancer.* 1980 Sep;42(3):392-8.
- Smid L, Strojjan P, Budihna M, Skrk J, Vrhovec I, Zargi M, Kos J. Prognostic value of cathepsins B, D and steffins A and B in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1997;254 Suppl 1:S150-3.
- Smith CW, Chen Z, Dong G, Loukinova E, Pegram MY, Nicholas-Figueroa L, Van Waes C. The host environment promotes the development of primary and metastatic squamous cell carcinomas that constitutively express proinflammatory cytokines IL-1alpha, IL-6, GM-CSF, and KC. *Clin Exp Metastasis.* 1998 Oct;16(7):655-64.

- Smorodinsky N, Weiss M, Hartmann ML, Baruch A, Harness E, Yaakovovitz M, Keydar I, Wreschner DH. Detection of a secreted MUC1/SEC protein by MUC1 isoform specific monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Nov 1;228(1):115-21.
- Snijdewint FG, von Mensdorff-Pouilly S, Karuntu-Wanamarta AH, Verstraeten AA, Livingston PO, Hilgers J, Kenemans P. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity can be induced by MUC1 peptide vaccination of breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2001 Jul 1;93(1):97-106.
- Sparano A, Weinstein G, Chalian A, Yodul M, Weber R. Multivariate predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Oct;131(4):472-6.
- Springer GF. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* 1984; 224(4654):1198-206.
- Springer GF, Chandrasekaran EV, Desai PR, Tegtmeier H. Blood group Tn-active macromolecules from human carcinomas and erythrocytes: characterization of and specific reactivity with mono- and poly-clonal anti-Tn antibodies induced by various immunogens. *Carbohydr Res*. 1988 Jul 15; 178:271-92.
- Springer GF, Desai PR, Banatwala I. Blood group MN antigens and precursors in normal and malignant human breast glandular tissue. *J Natl Cancer Inst* 1975; 54(2):335-9.
- Springer GF, Taylor CR, Howard DR, Tegtmeier H, Desai PR, Murthy SM, Felder B, Scanlon EF. Tn, a carcinoma-associated antigen, reacts with anti-Tn of normal human sera. *Cancer*. 1985 Feb 1;55(3):561-9.
- Springer GF, Tegtmeier H. Tn, a universal carcinoma (CA) marker, frequently strongly expressed in anaplastic, aggressive CA. *Naturwissenschaften* 1983; 70(12):621-2.
- Stadie TR, Chai W, Lawson AM, Byfield PG, Hanisch FG. Studies on the order and site specificity of GalNAc transfer to MUC1 tandem repeats by UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase from milk or mammary carcinoma cells. *Eur J Biochem*. 1995 Apr 1;229(1):140-7.
- Swallow DM, Gendler S, Griffiths B et al. The hypervariable gene locus PUM, which codes for the tumour associated epithelial mucins, is located on chromosome 1, within the region 1q21-24. *Annals of Human Genetics* 1987; 51: 289-294.
- Swallow DM, Griffiths B, Bramwell M, Wiseman G, Burchell J. Detection of the urinary 'PUM' polymorphism by the tumour-binding monoclonal antibodies Ca1, Ca2, Ca3, HMFG1, and HMFG2. *Dis Markers*. 1986 Dec;4(4):247-54.
- Szpak CA, Johnston WW, Lottich SC, Kufe D, Thor A, Schlom J. Patterns of reactivity of four novel monoclonal antibodies (B72.3, DF3, B1.1 and B6.2) with cells in human malignant and benign effusions. *Acta Cytol*. 1984 Jul-Aug;28(4):356-67.
- Tabor MP, van Houten VM, Kummer JA, Vosjan MJ, Vlasblom R, Snow GB, Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. Discordance of genetic alterations between primary head and neck tumors and corresponding metastases associated with mutational status of the TP53 gene. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Feb;33(2):168-77.
- 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; 53, 354-61.
- Takahashi HK, Metoki R, Hakomori S. Immunoglobulin G3 monoclonal antibody directed to Tn antigen (tumor-associated alpha-N-acetylgalactosaminyl epitope) that does not cross-react with blood group A antigen. *Cancer Res*. 1988 Aug 1; 48(15):4361-7.

- Tanaka F, Miyahara R, Ohtake Y, Yanagihara K, Fukuse T, Hitomi S, Wada H. Lewis Y antigen expression and postoperative survival in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1998 Nov;66(5):1745-50.
- Tanaka N, Ogi K, Odajima T, Dehari H, Yamada S, Sonoda T, Kohama G. pRb2/p130 protein expression is correlated with clinicopathologic findings in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2001 Oct 15;92(8):2117-25.
- Tatemoto Y, Saka M, Tanimura T, Mori M. Immunohistochemical observations on binding of monoclonal antibody to epithelial membrane antigen in epithelial tumors of the oral cavity and skin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987 Dec;64(6):721-6.
- 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. *International Journal Of Cancer. Journal International Du Cancer* 1981; 28(1):17-21.
- Terashima S, Takano Y, Ohori T, Kanno T, Kimura T, Motoki R, Kawaguchi T. Sialyl-Tn antigen as a useful predictor of poor prognosis in patients with advanced stomach cancer. *Surg Today.* 1998;28(7):682-6.
- Thomson DM, Krupey J, Freedman SO, Gold P. The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 64(1):161-7.
- Timar J, Csuka O, Remenar E, Repassy G, Kasler M. Progression of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2005 Jan;24(1):107-27.
- Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, Wong DT. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(1):51-61.
- Tsioulis GJ, Gupta RK, Tisman G, Hsueh EC, Essner R, Wanek LA, Morton DL. Serum TA90 antigen-antibody complex as a surrogate marker for the efficacy of a polyvalent allogeneic whole-cell vaccine (CancerVax) in melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2001 Apr;8(3):198-203.
- Tsuji S., Datta A.K., Paulson J.C., Systematic nomenclature for sialyltransferases, *Glycobiology* 6 (1996) v-xi.
- Tsukishiro T, Donnenberg AD, Whiteside TL. Rapid turnover of the CD8(+)CD28(-) T-cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2003 Oct;52(10):599-607.
- Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Bando T, Almofti A, Yoshida H, Sato M. Acquisition of lymph node, but not distant metastatic potentials, by the overexpression of CXCR4 in human oral squamous cell carcinoma. *Lab Invest.* 2004 Dec;84(12):1538-46.
- Ulanovski D, Stern Y, Roizman P, Shpitzer T, Popovtzer A, Feinmesser R. Expression of EGFR and Cerb-B2 as prognostic factors in cancer of the tongue. *Oral Oncol.* 2004 May;40(5):532-7.
- van Gog FB, Brakenhoff RH, Stigter-van Walsum M, Snow GB, van Dongen GA. Perspectives of combined radioimmunotherapy and anti-EGFR antibody therapy for the treatment of residual head and neck cancer. *Int J Cancer.* 1998 Jul 3;77(1):13-8.
- Varmus HE, Weiss RA, Friis RR, Levinson W, Bishop JM. Detection of avian tumor virus-specific nucleotide sequences in avian cell DNAs (reassociation kinetics-RNA tumor viruses-gas antigen-Rous sarcoma virus, chick cells). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69(1):20-4.

- Vaughan HA, St Clair F, Scanlan MJ, Chen YT, Maraskovsky E, Sizeland A, Old LJ, Cebon J. The humoral immune response to head and neck cancer antigens as defined by the serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning. *Cancer Immun.* 2004 Jul 16;4:5.
- Veltri RW, Rodman SM, Maxim PE, Baseler MW, Sprinkle PM. Immune complexes, serum proteins, cell-mediated immunity, and immune regulation in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 1986 Jun 15;57(12):2295-308.
- Veltri RW, Sprinkle PM, Maxim PE, Theofilopoulos AN, Rodman SM, Kinney CL. Immune monitoring protocol for patients with carcinoma of the head and neck. Preliminary report. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1978 Sep-Oct;87(5 Pt 1):692-700.
- Vinzenz K, Pavelka R, Schonthal E, Zekert F. Serum immunoglobulin levels in patients with head and neck cancer (IgE, IgA, IgM, IgG). *Oncology.* 1986;43(5):316-22.
- Vlad AM, Muller S, Cudic M, Paulsen H, Otvos L Jr, Hanisch FG, Finn OJ. Complex carbohydrates are not removed during processing of glycoproteins by dendritic cells: processing of tumor antigen MUC1 glycopeptides for presentation to major histocompatibility complex class II-restricted T cells. *J Exp Med.* 2002 Dec 2;196(11):1435-46.
- Vlock DR, Schantz SP, Fisher SG, Savage HE, Carey TE, Wolf GT. Clinical correlates of circulating immune complexes and antibody reactivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1993 Dec;11(12):2427-33.
- von Mensdorff-Pouilly S, Kinarsky L, Engelmann K, Baldus SE, Verheijen RH, Hollingsworth MA, Pisarev V, Sherman S, Hanisch FG. Sequence-variant repeats of MUC1 show higher conformational flexibility, are less densely O-glycosylated and induce differential B lymphocyte responses. *Glycobiology.* 2005 Aug;15(8):735-746.
- Vora AR, Rodgers S, Parker AJ, Start R, Rees RC, Murray AK. An immunohistochemical study of altered immunomodulatory molecule expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 1997;76(7):836-44.
- Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited: A clinicopathological study of 3,256 oral leukoplakias. *Cancer* 1975;36:1386-1392.
- Wandall HH, Hassan H, Mirgorodskaya E, Kristensen AK, Roepstorff P, Bennett EP, Nielsen PA, Hollingsworth MA, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Clausen H. Substrate specificities of three members of the human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1, -T2, and -T3. *J Biol Chem.* 1997 Sep 19;272(38):23503-14.
- Wang BL, Springer GF, Carlstedt SC. Quantitative computerized image analysis of Tn and T (Thomsen-Friedenreich) epitopes in prognostication of human breast carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 1997 Oct;45(10):1393-400.
- Wang H, Lillehoj EP, Kim KC. Identification of four sites of stimulated tyrosine phosphorylation in the MUC1 cytoplasmic tail. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 17;310(2):341-6.
- Wang H, Lillehoj EP, Kim KC. MUC1 tyrosine phosphorylation activates the extracellular signal-regulated kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Aug 20;321(2):448-54.
- Wei X, Xu H, Kufe D. Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell.* 2005 Feb;7(2):167-78.
- Wen DX, Livingston BD, Medzihradszky KF, Kelm S, Burlingame AL, Paulson JC. Primary structure of Gal- α -1,3(4)GlcNAc α -2,3- sialyltransferase determined by mass spectrometry

- sequence analysis and molecular cloning. Evidence for a protein motif in the sialyltransferase gene family. *J Biol Chem.* 1992; 267, 21011–9.
- Wen QH, Miwa T, Yoshizaki T, Nagayama I, Furukawa M, Nishijima H. Prognostic value of EGFR and TGF- α in early laryngeal cancer treated with radiotherapy. *Laryngoscope.* 1996 Jul;106(7):884-8.
- Wenzel CT, Scher RL, Richtsmeier WJ. Adhesion of head and neck squamous cell carcinoma to endothelial cells. The missing links. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995 Nov;121(11):1279-86.
- Werner JA, Dunne AA, Ramaswamy A, Dalchow C, Behr T, Moll R, Folz BJ, Davis RK. The sentinel node concept in head and neck cancer: solution for the controversies in the N0 neck? *Head Neck.* 2004 Jul;26(7):603-11.
- Weston BW, Hiller KM, Mayben JP, Manousos GA, Bendt KM, Liu R, Cusack JC, Jr., Expression of human α (1,3)fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells, *Cancer Res.* 1999; 59, 2127–35.
- 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.
- Whiteside TL. Immunobiology of head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2005 Jan;24(1):95-105.
- Williams D, Schachter H. Mucin synthesis. I. Detection in canine submaxillary glands of an N-acetylglucosaminyltransferase which acts on mucin substrates. *J Biol Chem.* 1980 Dec 10;255(23):11247-52.
- Wilson GD, Richman PI, Dische S, Saunders MI, Robinson B, Daley FM, Ross DA. p53 status of head and neck cancer: relation to biological characteristics and outcome of radiotherapy. *Br J Cancer.* 1995 Jun;71(6):1248-52.
- Wolf GT, Wolfe RA. Circulating immune complexes in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope.* 1990 Mar;100(3):302-8.
- Woolgar JA, Rogers SN, Lowe D, Brown JS, Vaughan ED. Cervical lymph node metastasis in oral cancer: the importance of even microscopic extracapsular spread. *Oral Oncol.* 2003 Feb;39(2):130-7.
- Wreschner DH, Hareuveni M, Tsarfaty I et al. Human epithelial tumor antigen cDNA sequences. Differential splicing may generate multiple protein forms. *Eur J Biochem* 1990; 189(3):463-73.
- Wreschner DH, Zrihan-Licht S, Baruch A, Sagiv D, Hartman ML, Smorodinsky N, Keydar I. Does a novel form of the breast cancer marker protein, MUC1, act as a receptor molecule that modulates signal transduction? *Adv Exp Med Biol.* 1994;353:17-26.
- Xing PX, Tjandra JJ, Stacker SA, Teh JG, Thompson CH, McLaughlin PJ, McKenzie IF. Monoclonal antibodies reactive with mucin expressed in breast cancer. *Immunol Cell Biol.* 1989 Jun;67 (Pt 3):183-95.
- Yamada T, Ohwada S, Saitoh F, Adachi M, Morishita Y, Hozumi M. Induction of Ley antigen by 5-aza-2'-deoxycytidine in association with differentiation and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* 1996 Mar-Apr;16(2):735-40.

Yamamoto E, Kohama G, Sunakawa H, Iwai M, Hiratsuka H. Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 1983 Jun 15;51(12):2175-80.

Yamanaka N, Himi T, Harabuchi Y, Hoki K, Kataura A. Soluble immune complexes and squamous cell carcinoma-related antigens in patients with head and neck cancer. *Cancer*. 1988 Nov 1;62(9):1932-8.

Young MR, Wright MA, Lozano Y, Matthews JP, Benefield J, Prechel MM. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer. *Int J Cancer*. 1996 Jul 29;67(3):333-8.

Zaretsky JZ, Sarid R, Aylon Y, Mittelman LA, Wreschner DH, Keydar I. Analysis of the promoter of the MUC1 gene overexpressed in breast cancer. *FEBS Lett*. 1999 Nov 19;461(3):189-95.

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.

Zrihan-Licht S, Weiss M, Keydar I, Wreschner DH. DNA methylation status of the MUC1 gene coding for a breast-cancer-associated protein. *Int J Cancer*. 1995 Jul 28;62(3):245-51.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Isoformas de MUC1 resultado del <i>splicing</i> alternativo.....	26
Figura 1: Estructura esquemática de una cadena de carbohidratos unidos por enlaces O-glicosídicos.	27
Tabla 2: Sitios anatómicos en el CECC según la clasificación internacional de las enfermedades (ICD) de la Organización Mundial de la Salud (OMS).	50
Tabla 3: Tasa de incidencia de mortalidad y prevalencia del CECC en mujeres de la Argentina, discriminada según las tres localizaciones principales de la ICD.....	51
Tabla 4: Tasa de incidencia mortalidad y prevalencia del CECC en hombres de la Argentina, discriminada según las tres localizaciones principales de la ICD.....	52
Tabla 5: Tasa de incidencia de CECC en la Argentina en ambos sexos, discriminada según las tres localizaciones principales de la ICD.....	52
Tabla 6: Estadificación TNM del CECC según el manual de estadificación de la American Joint Cancer Committee ...	55
Figura 2: Modelo de progresión del CECC adaptado al concepto de cancerización de campo.	58
Tabla 7: Número y distribución porcentual del género en pacientes con CECC primario.....	84
Figura 3: Distribución de edad de los pacientes; histograma de frecuencias absolutas.....	84
Tabla 8: Tabla de frecuencias totales y relativas porcentuales del estadio clínico de pacientes con CECC primario	84
Figura 4: Gráfico de frecuencias totales comparando los parámetros T y N en pacientes portadores de CECC primario	85
Tabla 9: frecuencias totales de pacientes portadores de CECC primario y sus frecuencias porcentuales según su localización y género.....	85
Figura 5: Análisis de Componentes principales de la contribución relativa de los parámetros clínicos de los pacientes portadores de CECC representados por los ejes X (Factor 1) e Y (Factor 2). Las muestras de los pacientes se encuentran identificadas según la localización tumoral y representadas por puntos.....	109
Tabla 10: Tabla de frecuencias totales y relativas porcentuales de la detección de la expresión antigénica evaluada por medio de IHQ en pacientes portadores de CECC primario (n=131).....	113
Figura 6: Microfotografía de un cáncer de laringe bien diferenciado en el cual se determinó la expresión de MUC1 a través de la incubación con el AcMo C595. Se observa una marcada tinción a nivel de la membrana plasmática y en el citoplasma. (X400).....	115
Figura 7: Microfotografía de un cáncer de cavidad oral bien diferenciado en el cual se determinó la expresión de <i>Lewis x</i> a través de la incubación con el AcMo KM380. Se observa una marcada tinción a nivel de la membrana plasmática de algunas células. (X400).....	115
Figura 8: Microfotografía de una metástasis ganglionar hallada en el mismo paciente de la Figura 7 en el cual se determinó la expresión de <i>Lewis x</i> a través de la incubación con el AcMo KM380. Se observa una marcada tinción a nivel de la membrana plasmática celular de algunas células tumorales rodeadas de linfocitos. (X400).....	116
Figura 9: Microfotografía perteneciente al mismo paciente de la Figura 7 en el cual se determinó la expresión de <i>Lewis y</i> a través de la incubación con el AcMo C14. Se observa una marcada tinción a nivel de la membrana plasmática de algunas células tumorales. (X400).....	116
Figura 10: Microfotografía perteneciente a un CECC escasamente diferenciado en el cual se determinó la expresión del antígeno Tn. Se observa una tinción lineal a nivel de la membrana plasmática en un grupo aislado de células tumorales. (X400).....	117
Figura 11: A) Microfotografía de un corte histológico de mucosa oral normal incubada con el AcMo C595 (anti-MUC1); se observa una reacción positiva en las células basales. B) mismo corte histológico tratado previamente con neuraminidasa e incubado con el AcMo C595 en el cual se puede observar un incremento de la reactividad de las células basales y en algunas células de los estratos superiores. (X40).....	118
Figura 12: Análisis de Componentes principales de la contribución relativa de la expresión antigénica representados por los ejes x (Factor 1) e y (Factor 2). Las muestras de los pacientes se encuentran identificadas según la diferenciación tumoral o su origen y representadas por puntos.....	121

Tabla 11: Coeficientes de correlación clásica de la respuesta a la detección antigénica en tejidos normales, lesiones preneoplásicas y CECC. (n=144, p<0,05).	123
Tabla 12: Correlaciones no paramétricas (Kendall) entre los parámetros T y N de la estadificación clínica de pacientes con CECC y la expresión antigénica en el tumor primario.	124
Tabla 13: Tabla de frecuencias totales y relativas porcentuales de la detección de la expresión antigénica de <i>Lewis x</i> con KM380 en tumores con distinto grado de diferenciación.	125
Tabla 14: Tabla de frecuencias totales y relativas porcentuales de la detección de la expresión antigénica de MUC1 en membrana con CT33 en tumores con distinto grado de diferenciación.	125
Figura 13: Representación de la tendencia lineal de la densidad de las fracciones obtenidas por centrifugación en gradientes de CsCl.	127
Figura 14: Ensayo de Western Blot que demuestra el aislamiento de MUC1 por medio de centrifugación en gradientes de Cs Cl. Detección de una reacción difusa con AcMo C595 y C14 en una fracción cuya densidad fue de 1,44 g/L. La flechas señalan la unión del “stacking” con el “resolving”.	128
Figura 15: Ejemplos de ensayos por Western Blot de fracciones subcelulares de distintos CECC.	130
Figura 16: Ensayo de Western Blot que demuestra el efecto del tratamiento con neuraminidasa sobre la expresión de MUC1 y el antígeno Tn en dos fracciones de membranas extranucleares de CECC.	131
Figura 17: Representación de la dispersión de los datos al analizar los niveles de MUC1 circulante de individuos controles y pacientes portadores de CECC.	133
Figura 18: Representación de la dispersión de los datos al analizar los niveles de MUC1 circulante pacientes portadores de CECC, esto últimos agrupados según la diferenciación tumoral.	133
Figura 19: Representación de la dispersión de los datos al analizar los niveles de MUC1 circulante pacientes portadores de CECC, esto últimos agrupados según el estadio T.	134
Tabla 15: Análisis de varianza de los niveles de CIC en pacientes portadores de tumores primarios, recidivas, controles negativos y controles positivos.	135
Tabla 16: Categorías de agrupación de las variables en estudio según el método de Benferroni.	136
Figura 20: Representación de la dispersión de los datos al analizar los niveles de CIC en controles negativos, controles positivos y pacientes portadores de CECC, esto últimos agrupados según el estadio T.	137
Figura 21: Representación de la dispersión de los datos al analizar los niveles de CIC en controles negativos, controles positivos y pacientes portadores de CECC, esto últimos agrupados según el estadio N.	137
Tabla 17: Datos clínicos de los pacientes portadores de CECC y análisis de la fracción antigénica de CIC mediante SDS-PAGE y Western Blot.	138
Figura 22: Dos ejemplos de CIC analizados por Western Blot empleando el AcMo C595 (anti MUC1).	139
Figura 18: Tres ejemplos de CIC analizados por Western Blot empleando el AcMo C14 (anti <i>Lewis y</i>).	140