



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Presencia de la glicoproteína α -1 ácida en tejido tumoral
mamario**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ANDREA ANAHI ALFARO CENDEJAS



**DIRECTOR DE TESIS:
M en C Erasmo Martínez Cordero
2014**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

Datos de la alumna

Andrea Anahí
Alfaro
Cendejas
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
409098954

Datos del tutor

M. en C.
Erasmus
Martínez
Cordero

Datos del sinodal 1

Dr.
Alejandro Manuel
García
Carrancá

Datos del sinodal 2

Dr.
René de Jesús
Cárdenas
Vázquez

Datos del sinodal 3

M en IBB
Simón
Guzmán
León

Datos del sinodal 4

M. en C.
Rosa María
Burgos
Chaidez

Datos del trabajo escrito

Presencia de la glicoproteína α -1 ácida en tejido tumoral mamario
34 pp
2014

Este trabajo se realizó en el Departamento de Autoinmunidad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), bajo la asesoría del M. en C. Erasmo Martínez Cordero.



Agradecimientos:

A mi tutor Erasmo Martínez Cordero, por su disposición y por facilitar lo necesario para concluir este trabajo.

Al grupo de personas que trabajan en el Laboratorio de Autoinmunidad del INER por su apoyo en la realización de las técnicas.

Al departamento de Patología del Instituto de Nutrición en especial a la Dr. Norma Uribe que con sus conocimientos de histología fue de gran ayuda.

A los demás miembros de mi jurado ya que lograron que este trabajo tuviera más forma.

Le dedico esta tesis a la persona que me brindo toda su ayuda para que yo pudiera estudiar y concluir esta licenciatura.

Gracias mamá por esperar.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1. Glicoproteína alfa-1 ácida	2
1.2. Cáncer y cáncer de mama	7
1.3. La glicoproteína alfa-1 ácida es un posible marcador en cáncer de mama	13
2. Objetivos	14
3. Justificación	15
4. Método	16
4.1. Precipitación de gammaglobulinas totales	16
4.2. Muestras biológicas	16
4.3. Inmunohistoquímica	17
4.4. Análisis estadístico	19
5. Resultados	20
5.1. Anticuerpo y anti AGP	20
5.2. Cáncer de mama	20
5.3. Relación con las características clínico patológicas	22
6. Discusión	24
7. Conclusiones	28
8. Anexo	31
Estandarización y optimización	31
Tablas y conceptos del análisis estadístico	33

Abreviaturas

AGP	Glicoproteína α -1 ácida
AMBP	Microglobulina alfa 1
APP	Proteínas de la fase aguda
BSA	Albumina bovina
C8G	Subunidad gamma del componente 8 de la cascada del complemento
CCR5	Quimiocina receptora de tipo 5
CD15	poli-N-acetil-lactosamina
CDI	Carcinoma ductal infiltrante
CLI	Carcinoma lobulillar infiltrante
DAB	Diaminobenzidina
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ER	Receptor de estrógeno
ERBB2	Gen que codifica a Her-2
ERS1	Gen que codifica el receptor de estrógeno.
GD	Glicodelina
Her2	Receptor de factores de crecimiento, su expresión indica proceso canceroso
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-1	Interlucina 1
IL-2	Interlucina 2
IL-6	Interlucina 6
Ki-67	Marcador de proliferación celular
LCN1	Lipocalina 1, gen de la lipocalina 1
MCF-7	Línea celular
MIP1 β	CCL4 proteínas inflamatorias de macrófagos 1 β
NGAL	LCN2 lipocalina 2
ORM 1	Gen que codifica a la AGP-1
ORM 2	Gen que codifica a la AGP-2
PAEP	Gen que codifica la glicodelina
PBS	Amortiguador de fosfatos
PR	Receptor de progesterona
PTGDS	Prostaglandina H2-D-isomerasa
SCR	Pequeños sitios conservados
TNF α	Factor de necrosis tumoral

Resumen

Antecedentes: La glicoproteína alfa-1 ácida (AGP) es una lipocalina que participa en la fase aguda de la inflamación así como en el transporte de distintos componentes endógenos y exógenos. Además, una de sus principales acciones es modular distintos mecanismos de la respuesta inmune, propiedad por la cual ha sido motivo de estudio en diferentes ámbitos del área biomédica. Esta lipocalina es producida principalmente en células hepáticas y puede tener otros orígenes. Su estudio en neoplasias de cabeza y cuello, tumores intestinales, y menos frecuentemente en cáncer de mama sugiere que puede constituir un marcador en distintos procesos neoplásicos.

Objetivo: Evaluar la presencia de la glicoproteína α -1 ácida en células tumorales de cáncer de mama, en particular en las de carcinoma.

Metodología: Se realizó inmunohistoquímica a 14 casos con carcinoma mamario con el fin de localizar AGP en el tejido tumoral mamario. En todos contamos con tejidos afectados, y el área médica proporcionó las variables clínico patológicas que presentaron estos pacientes. Para detectar la presencia de la lipocalina se utilizó un anticuerpo contra la AGP desializada. Esto debido a la posibilidad de que al usar anticuerpos contra AGP total se presentara un efecto de interferencia, al considerar el alto grado de glicosilación de dicha inmunocalina, y con el objetivo de minimizar la posibilidad de reacción contra residuos de ácido siálico que pueden estar presentes e incrementados en distintos tejidos tumorales.

Resultados: Se detectó AGP en el 50% de los casos evaluados. La tinción mediante inmunohistoquímica fue predominantemente citosólica, en 5 casos que presentaron AGP citosólica también tuvieron tinción perinuclear positiva. Una tendencia interesante fue encontrar AGP positiva en pacientes con histología sugerente de capacidad invasiva.

Conclusión: Con el uso de anticuerpos policlonales contra AGP humana desializada se identificó la presencia de esta inmunocalina en al menos 50% de las muestras analizadas con cáncer de mama. La ubicación histopatológica principal fue citosólica. Este es el primer reporte que se identifica por inmunohistoquímica la presencia de AGP directamente en células malignas epiteliales o carcinoma. Hay evidencia de una asociación positiva y creciente entre la presencia de AGP y la histología infiltrante lo que sugiere que AGP puede ser un marcador útil en algunos tipos de carcinoma de mama.

1. Introducción

1.1. Glicoproteína alfa-1 ácida

1.1.1. Lipocalinas

Las lipocalinas son proteínas extracelulares que tienen como principal propiedad el reconocimiento molecular, cualidad que les da tres capacidades que son: transportar moléculas pequeñas especialmente lipofílicas, el de interactuar con receptores celulares de membrana y por último la capacidad de formar complejos macromoleculares libres. En la secuencia de las lipocalinas se han identificado tres motivos conservados pero principalmente se describe la semejanza en la estructura terciaria, constituida por un barril β formado de ocho laminas β anti paralelas, conformación que se estabiliza con dos puentes disulfuro, figura 1.

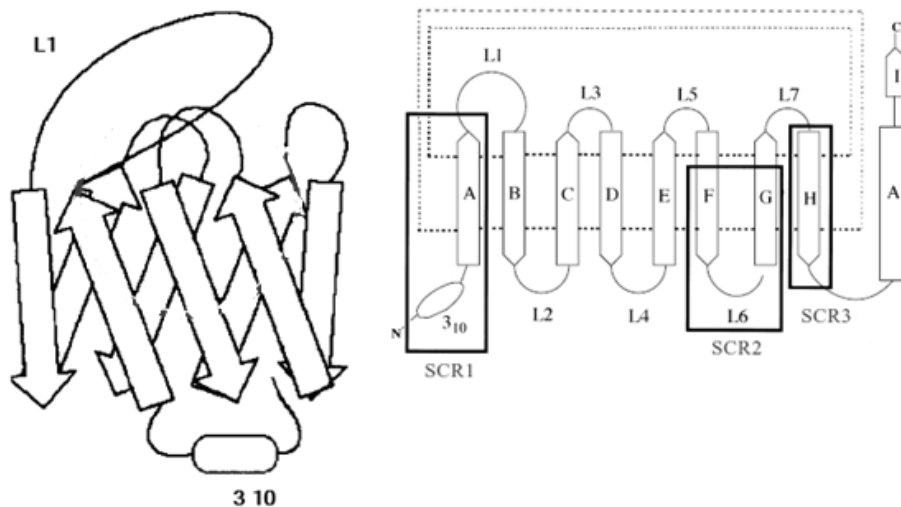


Figura 1. **Estructura terciaria de las lipocalinas.** (Flower, 1996). Las lipocalinas se distinguen por tener una conformación de barril β . En recuadros se señalan los tres SCR de esta familia.

Las funciones de las lipocalinas son generalizadas, modulan el crecimiento celular y el metabolismo, participan en la respuesta inmune, así como en recepción del olfato y definir el comportamiento animal (Gryzyb & Latowski 2006). En otro ámbito, las lipocalinas son consideradas buenos marcadores bioquímicos en distintas patologías que incluyen cáncer, enfermedades hepáticas y renales, enfermedades inflamatorias, infecciones virales y bacterianas (Xu & Venge 2000)

1.1.2. Inmunocalinas

La glicoproteína alfa-1 ácida (AGP) junto con las proteínas lipocalina 1 (LCN1), lipocalina asociada con la gelatinasa del complemento (NGAL), microglobulina alfa 1 (AMBP), la glicodelina (GD), así como la subunidad gamma del componente 8 de la cascada del complemento (C8G), y la prostaglandina H2-D-isomerasa (PTGDS) forman la subfamilia de las inmunocalinas denominadas así por su participación en la fase aguda y tener propiedades anti-inflamatorias y antimicrobianas (García & García, 2008). Todas ellas son codificadas a partir de un grupo de genes de la región q 31-34 del cromosoma 9 en el humano, figura 2.

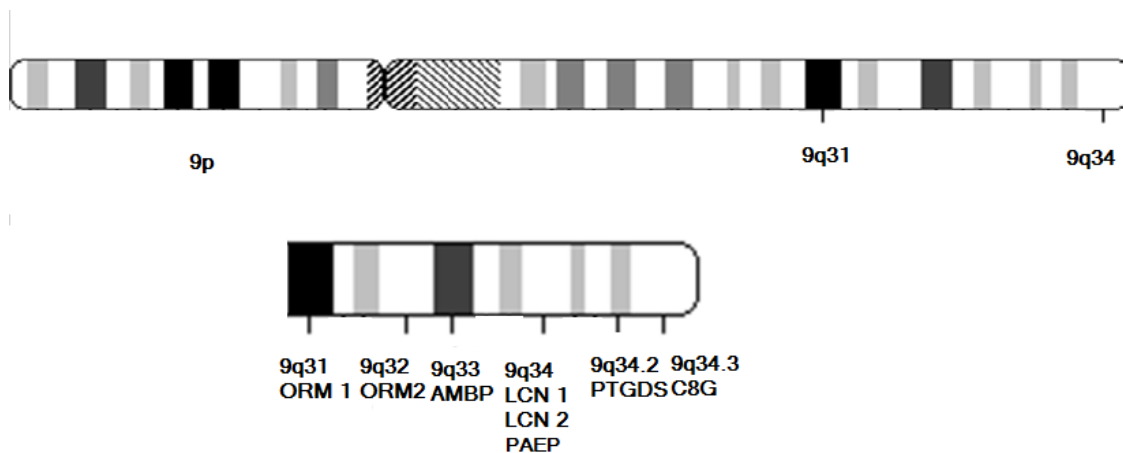


Figura 2. **Cromosoma 9 humano.** (Modificado de NCBI¹). Localización de los genes de las inmunocalinas en el cromosoma 9 humano, los genes que codifican AGP se encuentran en la región 9q31-32.

Al ocurrir un daño tisular o infección se comienza una serie de reacciones inflamatorias que llevan a la síntesis de las proteínas de la fase aguda (APP) por el hígado entre ellas algunas inmunocalinas, estas lipocalinas inhibirán la respuesta celular y humoral adicionalmente regularán las reacciones del complemento logrando que la respuesta inmune sea efectiva y no se expanda más allá del tejido dañado. Entre las participantes más importantes se encuentran AGP, AMBP, y C8G mientras que LCN1 y la NGAL que es producida por neutrófilos tienen efectos antivirales y antimicrobianos. Durante el embarazo el sistema reproductor femenino produce GD la cual inhibe a acción de las células asesinas naturales o NK y la estimulación antigénica de los linfocitos T (Lögdberg & Wester, 2000).

Estas funciones son resultado de tres capacidades que tienen las lipocalinas, ya que son capaces de secuestrar o interactuar con pequeñas moléculas lipofílicas liberadas por microorganismos o células inflamatorias, así como moléculas tóxicas; las inmunocalinas al unirse con receptores de la superficie celular pueden identificar la célula inflamatoria blanco e inhibirla y finalmente estando libres tienden a formar complejos con otras proteínas plasmáticas intensificando o regulando la función de la macromolécula asociada.

1.1.3. Características de glicoproteína alfa-1 ácida.

La AGP es una lipocalina atípica, posee dos de los tres pequeños sitios conservados (SRC) de la familia de la que forma parte (Åkerstrom et al, 2000), es una inmunocalina altamente glicosilada aunque tiene pocos aminoácidos, 183aa en el humano, su peso molecular varía reportándose cifras de 38 a 48 KDa lo que es debido en parte a la presencia de sus carbohidratos.

En la figura 3 se muestra la estructura terciaria de la parte proteica de AGP, donde observamos la conformación que adquiere al transportar una molécula.

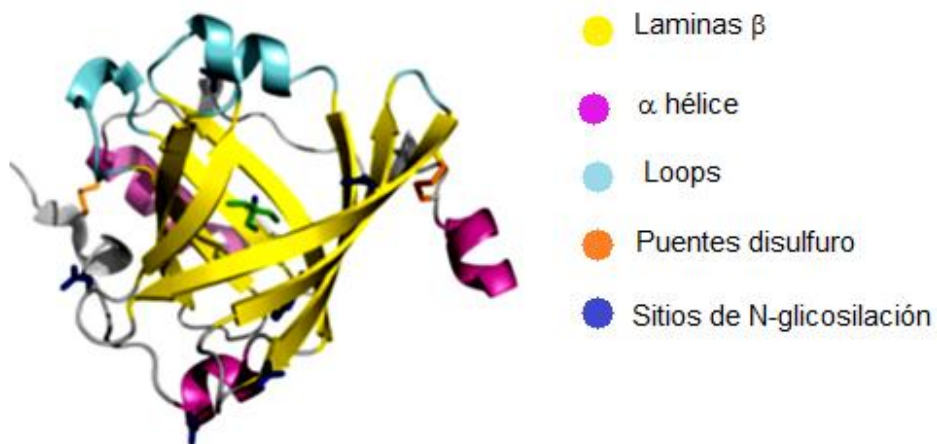


Figura 3. **Estructura terciaria de AGP** (Schönfeld et al, 2008). Se muestra únicamente la parte proteica de la inmunocalina y con diferentes colores se distinguen estructuras.

La glicosilación de esta inmunocalina tiene como base la presencia de cinco sitios de N glicosilación los cuales se ubican en los residuos 15, 38, 54, 75, 85 de asparagina (Asp). Los carbohidratos N-acetilglucosamina, manosa, galactosa, fucosa, ácido siálico son los

carbohidratos que se encuentran en este tipo de modificación postraduccional, en AGP se ha descrito la formación de ramificaciones dobles, triples o hasta cuádruples, figura 4. La fucosilación y ramificación varían durante la fase aguda de la inflamación y en otras condiciones fisiopatológicas.

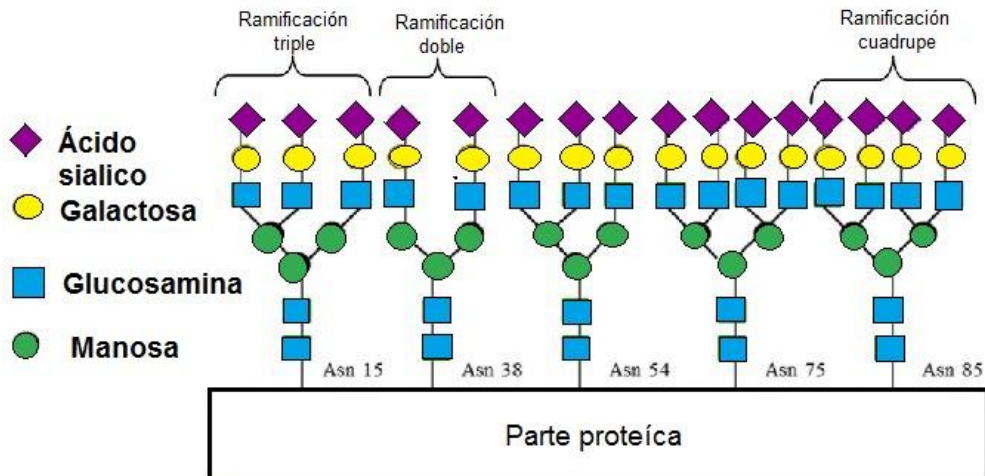


Figura 4. **Tipos de ramificaciones descritas en AGP.** (Smith et al. 2012) En distintas condiciones fisiopatológicas se han encontrado estos tipos de ramificaciones.

Los hepatocitos sintetizan constitutivamente AGP, y al ser extracelular se distribuye a distintos fluidos y excreciones corporales. En plasma sanguíneo su concentración es de 0.5-1 mg/ml, la cual puede incrementarse hasta cinco veces durante la fase aguda de la inflamación por acción de las citocinas interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interleucina 6 (IL-6). Se ha comprobado que otros tejidos y grupos celulares llegan a sintetizar AGP en forma constitutiva o inducible, y al igual que en circulación sanguínea tanto su concentración, como la glicosilación puede variar como respuesta a distintas condiciones patológicas, ver Tabla 1.

Tabla 1. **Condiciones patológicas que presentan niveles elevados de AGP en plasma** (Israili & Dayton, 2001)

Condición patológica	Excepción
Cáncer	Cáncer de páncreas*
Enfermedades cardiovasculares	Cardiopatía congénita en niños Enfermedad de las arterias coronarias
Trastornos del sistema nervioso central	Depresión primaria

Infección	---
Enfermedades inflamatorias	---
Daño tisular	---
Trasplante	---
Enfermedades renales	Síndrome nefrótico Uremia*
Enfermedades del hígado	Insuficiencia hepática* Cirrosis* Hepatitis*
Enfermedades pulmonares	---
Cambio significativo de peso	Caquexia*
Otras patologías	Alcoholismo Diabetes mellitus tipo 2 Hipertiroidismo* Hipoalbuminemia* Esclerosis sistémica / esclerodermia*
*los niveles de la concentración AGP disminuyen	

1.1.4. Funciones biológicas de AGP

AGP es capaz de inhibir la respuesta quimiotáctica, agregación plaquetaria y la activación de neutrófilos. Así mismo puede disminuir las características efectoras de macrófagos uniéndose a los receptores de algunas quimiocinas como el CCR5 y desplazar a MIP1 β . También puede inducir la producción de inhibidores de IL-1 en monocitos, suprimir la producción de TNF α y abatir la proliferación de linfocitos T cuando son estimulados con mitógenos y aloantígenos. Además, se ha reportado que inhibe la síntesis de IL-2 y la citotoxicidad mediada por TNF α (Hochepped et al, 2003).

AGP se une a esteroides y distintos fármacos ácidos y básicos. Se ha descrito que la unión a fármacos de esta inmunocalina depende de varios factores como lo son concentración de la proteína y del ligando, el pH, la presencia de otros ligandos y proteínas asociadas o competitivas (Israili & Dayton, 2001) y a nivel molecular pueden influir el cambio conformacional de AGP lo que puede dejar descubiertos los dominios

hidrófobos, la desialilación altera sus capacidades funcionales; la presencia de residuos de aminoácidos en los sitios de unión y polaridad del ligando son otros factores que intervienen en la unión de AGP con fármacos. AGP tiene varios sitios de unión a ligando incluso para una sola molécula, por ejemplo se han registrado siete sitios de unión con estradiol, hormona esteroide femenina; y de uno a dos sitios de interacción con fármacos neutros, ácidos y básicos (Tesseromatis et al, 2011). AGP ha tomado importancia para estudios de farmacodinámica y farmacocinética porque su interacción con fármacos podría implicar consecuencias toxicológicas debido a que los sitios de unión a fármacos de AGP son saturables y desplazables (Huang & Ung, 2013). AGP continua siendo objeto de estudio en diferentes cánceres que incluyen mama, colon, cabeza y cuello, estomago, leucemia, hígado y pulmón encontrando cambios principalmente en sus carbohidratos en etapas avanzadas de la patología y una concentración anormal en distintos fluidos que incluyen orina, suero o líquidos cercanos a la masa tumoral.

1.1.5. Variantes de AGP

Dos genes en el cromosoma 9 ORM1 y ORM2 son los responsables de codificar las dos variantes genéticas de esta proteína denominadas AGP 1 y AGP 2. En el plasma se encuentra una mezcla de AGP 1 y AGP 2, siendo más abundante la primera. El gen ORM1 tiene tres variantes alélicas que son denominadas ORM1*F1, ORM1*F2 y ORM1 S (Yasua et al, 1997) que codifican tres variantes diferentes de AGP 1. Las variantes de AGP 2 han sido menos estudiadas. Debido a estas variantes se ha descrito que en diferentes poblaciones tienen distinta reacción a fármacos y que la AGP puede poseer diferentes propiedades inmunomoduladoras y en cánceres investigadores han encontrado un aumento en la frecuencia de alelos específicos que se asocian con diferentes tipos de carcinoma.

1.2. Cáncer y cáncer de mama

1.2.1. Cáncer

Los tejidos están constituidos por conjuntos de células organizadas que se renuevan por división celular y entre ellas todos los linajes de las células somáticas tienen como fin la muerte celular sin dejar progenie. Además, la función de las células somáticas es el de

ser el sostén de las células germinales que las cuales son las únicas capaces de transmitir la información genética a otra generación.

Una célula somática es susceptible de sufrir un cambio hereditario, el cual puede ser una alteración en la secuencia de DNA o un cambio epigenético lo que tiene diferentes consecuencias en la sobrevivencia de la progenie resultante.

Las células somáticas transformadas tienen crecimiento y multiplicación anormales lo que lleva a formar tumores los cuales pueden ser benignos o malignos, siendo estos últimos los de mayor importancia médica ya que es lo que conocemos como cáncer. (Alberts, 1996) Las células que componen un tumor maligno son diferentes en apariencia a las células del tejido del cual se originaron e invaden otros tejidos por dos vías principales, siguiendo el flujo sanguíneo y a través del sistema linfático, procesos que determinan en gran medida el fenómeno denominado metástasis.

De acuerdo al tejido en que se origina o está presente el cáncer, éste recibe diferentes denominaciones como la leucemia en sangre periférica, el linfoma en el sistema linfático, o el sarcoma en los tejidos conectivos mientras que a los procesos neoplásicos que derivan de la capa que recubre los órganos, los epitelios, se les llama carcinomas. Estos últimos constituyen alrededor del 80% de la totalidad de procesos malignos en el humano, lo cual se explica por la alta proliferación celular en los epitelios que aumenta la tasa de mutación y en parte es debido a que los tejidos epiteliales están expuestos a un gran número de lesiones físicas y químicas que favorecen el desarrollo de cáncer.

1.2.2. Glándula mamaria

Las glándulas mamarias son órganos compuestos por distintos tipos celulares que incluyen a las células epiteliales, células mesenquimales, adipocitos, células endoteliales vasculares, fibroblastos y células inmunes, entre otras. Hay dos tipos de epitelio en la glándula mamaria el luminal y el basal. El epitelio luminal se encuentra en el interior de los acinos y los ductos mientras que en el exterior se encuentra el epitelio basal formado principalmente por células mioepiteliares (Watson & Khaled, 2008). Al conjunto acinos se le denomina lobulillo, esta estructura se muestra en la figura 5. Varios lobulillos forman lóbulos, y se estima que cada seno en la mujer puede tener de 15 a 20 lóbulos según la

edad, etapa reproductiva o condición hormonal en que se encuentre, la cual depende de si se estudian en estado de reposo, embarazo o lactancia. Una red de conductos galactóforos o ductos comunican estas estructuras glandulares, siendo los conductos lactíferos los más externos que al dilatarse forman el seno lactífero donde se almacena la leche la cual sale al exterior por las aberturas cuando durante la lactancia ocurre estimulación en el pezón. El espacio entre los lóbulos es llenado por tejido adiposo y fibroso que en conjunto dan forma y sostén al seno, además hay una red de venas y un sistema de vasos linfáticos en todo el seno. Las células madre son responsables de la continua renovación celular, el crecimiento y ramificación durante la época reproductiva y los cambios que involucra un embarazo; el desarrollo de las glándulas depende las secreciones de estrógeno y progesterona del ovario, estas hormonas harán que los conductos crezcan y se ramifiquen mientras que la prolactina secretada por la hipófisis inicia el desarrollo de lobulillos y otros conductos.

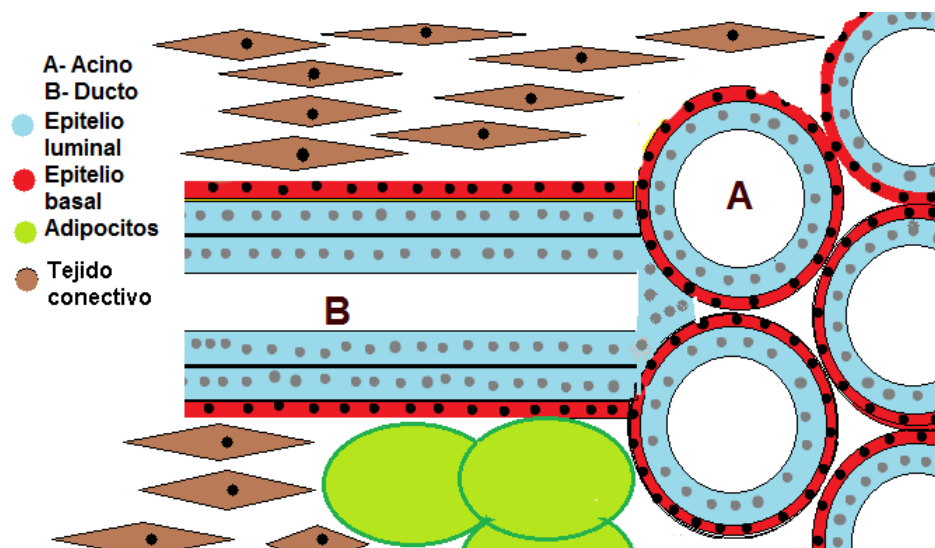


Figura 5. **Lobulillo mamario.** Nombrado la unidad funcional de la glándula mamaria. Se representan los dos epitelios y otros grupos celulares presentes.

1.2.3. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de neoplasia maligna más común en mujeres mayores de 25 años en México con cerca del 11% del total de casos de tumores malignos detectados. Más de la mitad de los casos de cáncer de mama se presenta en mujeres de 30 a 59

años de edad. Las pacientes mayores a 50 años pocas veces sobreviven, la mayoría de las veces porque la patología se detecta en etapas avanzadas. (INEGI)²

El cáncer de mama no es una enfermedad con una sola causa ya que distintos factores contribuyen en su desarrollo, como la edad, sexo, herencia, paridad, historia menstrual, lesiones mamarias, dieta y el uso de estrógenos como tratamiento. Un diagnóstico oportuno y certero son parte del éxito del tratamiento antineoplásico para evitar la proliferación de las células cancerosas con los tratamientos actuales.

1.2.4. Diagnóstico del cáncer de mama

Un bulto palpable o alteraciones de forma, tamaño y color del seno pueden constituir los primeros indicios para empezar una serie de estudios que permitan diagnosticar el cáncer y orientar sobre su posible tratamiento; los primeros estudios son por imagen e incluyen ultrasonido, resonancia magnética y mastografía, este último es un aparato de rayos x diseñado para obtener radiografías detalladas de las estructuras internas de la mama. La mastografía es el mejor método de detección por imagen con una sensibilidad del 80%-95% mientras que los otros son complementarios (Pérez, 2009).

La confirmación histológica del tumor es el siguiente paso en el diagnóstico cuando se ha obtenido una imagen anormal, comienza con la obtención de tejido por biopsia, esta puede ser de mínima invasión como lo es biopsia por aguja de corte (trucut), y cuando no es factible este procedimiento se deben hacer biopsias quirúrgicas. El tejido obtenido se debe dividir en dos, una parte se congelara a -70°C y la otra debe ser fijada e incluida en parafina, ambas se almacenan para futuros estudios que incluyen extracción de ácidos nucleicos y proteínas y análisis con sondas y anticuerpos. De un tejido incluido en parafina con la ayuda de un micrótopo se pueden obtener copias de una sección de tejido, se recomiendan ciertos límites pero no están estandarizados por lo que en un banco de muestras se pueden obtener tejidos de diversos tamaños, lo que parece común es el grosor de tres micras ideal para observación en microscopio. (Brooks, 2006) La tinción eosina-hematoxilina es uno de los principales estudios que se realizan en los cortes del tejido tumoral. Con ellos se puede diferenciar el núcleo y el citoplasma de las células obteniendo una serie de características histopatológicas como el tipo histológico, tamaño, y si ha invadido otros tejidos.

Complementario a los anteriores estudios se han utilizado una serie de marcadores con utilidad variada que incluye diagnóstico, pronóstico y comportamiento de la neoplasia en el tiempo o a un tratamiento, estos marcadores pueden ser proteínas u oncogenes que se identifican en sangre, orina o tejidos en cantidades anormales debido a que son sintetizados por el mismo tumor o por otros grupos celulares en respuesta a la presencia de células neoplásicas. Los receptores hormonales son un tipo de marcador de pronóstico y cuyo resultado define el tipo de terapia hormonal que se dará a las pacientes esta prueba incluye evaluar por inmunohistoquímica los receptores de estrógeno (ER) y los receptores de progesterona (PR), adicional a esta prueba se evalúa la expresión de Her-2 y Ki-67.

1.2.5. Clasificación del cáncer de mama

El adenocarcinoma de mama, tumor maligno ubicado en la parte glandular del seno, presenta histológicamente variantes distintivas que pueden llegar a clasificar a estos tumores epiteliales en más de 18 tipos histológicos especiales, para fines prácticos se usa simplemente la clasificación ductal y lobulillar adicionando el carácter in situ y/o infiltrante, pero si se distingue en una muestra un tipo histológico especial se debe incluir para fines de un tratamiento adecuado (Weigelt et al, 2010).

El carcinoma ductal infiltrante (CDI) es un cáncer de los ductos pero con propagación hacia los tejidos mamarios que le rodean, puede presentar cambios inusuales en la mama o no tener síntomas. En las radiografías se observa como proyecciones en forma de dedos y es palpable como un pequeño bulto en exploración física. Presenta varios estadios dados por el tamaño del tumor, afectación de los ganglios linfáticos y diseminación a huesos, hígado, pulmones y cerebro.³

El carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) es un cáncer que identificado en los lobulillos productores de leche, al igual que el CDI puede o no presentar cambios inusuales en la mama. Por su forma de crecimiento en una mastografía se puede errar su diagnóstico, en exploración física se nota un engrosamiento o endurecimiento de la mama, es posible que afecte ambas mamas. Presenta varios subtipos por las formas de las células

cancerígenas y estadios, su diseminación es principalmente hacia aparato digestivo, revestimiento del abdomen, aparatos reproductores y sistema nervioso central.

Tanto el estudio de imagen como el histológico sirven para clasificar los tumores, el sistema de clasificación más usado es el TNM (de tumor, nódulos o ganglios y metástasis) donde se presenta el tipo histológico, grado, permeación vascular y linfática, tamaño del tumor, márgenes, así como número de ganglios afectados.

En la actualidad hay más adeptos a una clasificación molecular, y por el interés de este estudio se tomó la que involucran genes que participan en la expresión de receptores hormonales y Her-2, (Sørlie et al, 2001) obteniendo principalmente cuatro subtipos luminal A, luminal B, subtipo Her-2 positivo, y triple negativo, ver tabla 2.

Tabla 2. **Subtipos de carcinomas mamarios** (Gruver et al, 2010)

Subtipo molecular	Inmunofenotipo			Gen representante	Característica histológica	Características clínicas
Luminal A	ER+	PR+/-	Her-2 -	<i>ERS1</i>	Bajo grado	Buen pronóstico.
Luminal B	ER+	PR+/-	Her-2 +	<i>ERS1</i>	Mayor grado que luminal A	Pronóstico menos favorable que luminal A
Her-2	ER-	PR-	Her-2 +	<i>ERBB2</i>	Alto grado	Mal pronóstico
Triple negativo	ER-	PR-	Her-2 -	<i>KRT5,</i> <i>KRT17,</i> <i>LAMC2</i>	Alto grado	Mal pronóstico

1.2.6. Tratamiento

Existen dos tipos de tratamiento el locorregional y el tratamiento sistémico, los cuales son recomendados según una serie de características clínicas principalmente el estadio del tumor dado por el sistema TNM, grado, el estado proteico de los receptores hormonales ER y PR en el tumor primario, actividad proliferativa y resultados otros marcadores como Her-2.

La radioterapia se aplica para asegurar la destrucción de células cancerígenas que pudieron haber quedado en la extracción por cirugía. En la quimioterapia se utilizan una combinación de medicamentos que incluyen entre otros antraciclinas y taxanos que impiden la formación de clonas resistentes. El Trastuzumab es un medicamento utilizado en cánceres con sobreexpresión Her-2 y para los tumores sensible a hormonas en los que se busca reducir la concentración de estrógenos o bloquear su acción, se usan medicamentos que afectan esta condición hormonal, además de que puede incluir en el tratamiento la extracción de ovarios. ⁴.

1.3. La glicoproteína alfa-1 ácida es un posible marcador en cáncer de mama

En México se usan una variedad de marcadores que han permitido diferenciar las distintas lesiones y carcinomas que pueden afectar a la glándula mamaria y nuestra línea de trabajo se inserta en este contexto. El avance en el diagnóstico se ha conseguido con el uso de anticuerpos específicos capaces identificar proteínas o complejos únicos para patologías como en lesiones proliferativas epiteliales, lesiones papilares, carcinoma ductal in situ, carcinoma lobulillar, lesiones esclerosantes y carcinomas infiltrantes (Vilches et al, 2010). El anticuerpo gammas anti-asialo AGP humana es capaz de reconocer el antígeno del cual fue producido y todo indica que AGP por su elevación en suero y fluidos debe estar presente en células tumorales de carcinomas mamarios.

2. Objetivos

Objetivo general:

Evaluar la presencia de la glicoproteína α -1 ácida en células tumorales de cáncer de mama, en particular en las de carcinoma.

Objetivos particulares:

- Evaluar la utilidad del anticuerpo policlonal generado contra AGP desializada.
- Estandarizar y optimizar los métodos de inmunohistoquímica para la detección de AGP.
- Procesar un grupo de muestras de carcinoma de mama mediante inmunohistoquímica para demostrar la presencia de esta inmunocalina en el tejido tumoral.
- Analizar si la positividad a AGP se relaciona con las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de mama.

3. Justificación

Al generar anticuerpos contra glicoproteínas nativas se puede obtener una reactividad cruzada con residuos de carbohidratos y en el caso de AGP la presencia de alto contenido de ácido siálico puede generar este efecto. Los ácidos siálicos son componentes importantes en sueros, mucosas y en membranas celulares de los animales superiores y su contenido suele incrementarse en algunas condiciones fisiopatológicas como el cáncer, incluyendo el de mama. Por ello, al estudiar la AGP como posible marcador tumoral mediante pruebas inmunológicas y tener la posibilidad de identificar simultáneamente los residuos de carbohidratos y la proteína de interés, se decidió minimizar este tipo de interferencia eliminando falsos positivos usando inmunoglobulinas que identifiquen la porción proteica de dicha inmunocalina.

Este trabajo es parte de un estudio general en el que se determinó evaluar la presencia de AGP en cáncer de mama con métodos que permitan proponer que las células tumorales del tejido afectado tienen la capacidad de sintetizar esta inmunocalina, y proponer que debido a su capacidad para regular negativamente distintos efectores del sistema inmune puede estar involucrada como un mecanismo de evasión de la respuesta antitumoral.

4. Método

4.1. Precipitación de gammaglobulinas totales

Este procedimiento se realizó para obtener las gammaglobulinas totales del suero de ratones Balb/c previamente inmunizados con AGP humana desializada. Para ello, se agregó un volumen de sulfato de amonio saturado en agua a un volumen de suero, el sulfato de amonio se adiciona gota a gota con agitación a 4°C, la mezcla se incubó 2 horas a 4°C y se centrifuga a 3500 rpm 40 minutos a 4°C. Al precipitado se realizaron dos lavados de la siguiente forma: se adicionó 2/3 de PBS 0.01M pH 7 y 1/3 de sulfato de amonio (del volumen original del suero). Al final el botón que contenía las gammaglobulinas se resuspendió en PBS, este preparado se almacenó manteniendo una temperatura de 4°C hasta su uso. (Bioquímica, 1993 vol. XVIII. No.6)

4.2. Muestras biológicas

Para este estudio retrospectivo y transversal se solicitaron tejidos conservados en bloques de parafina del archivo de pacientes con cáncer de mama de las áreas de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y del Centro Médico American British Cowdray (ABC), los cuales se entregaron en cortes de 3 micras adheridos a portaobjetos.

Las variables clínico-patológicas fueron proporcionadas por las áreas médicas que participaron en el estudio. Estos datos de los pacientes incluyeron sus características respecto a edad, tipo de carcinoma, resultados de las pruebas de receptores nucleares y Her-2. Al trabajar con especímenes de tejido previamente obtenidas y procesadas para el diagnóstico clínico, y accesibles en el archivo de patología no se requirió informar a las pacientes.

Los controles del estudio utilizados en inmunohistoquímica fueron, control positivo (hígado humano) que en cada corrida dos tejidos de hígado eran evaluados uno con el anticuerpo y el otros sin él y blanco de muestra (tejido mamario sin gammas anti-asialo AGP humana) para evitar falsos positivos ya que los tejidos hay componentes que tienen un color parecido a la tinción de la inmunoperoxidasa como la hemosiderina.

4.3. Inmunohistoquímica

4.3.1. Desparafinado e hidratación

Los tejidos problema y el control se incubaron durante 25 minutos en una incubadora a 58°C para retirar la parafina, en seguida se procedió a utilizar un tren de alcoholes desde Xilol absoluto a etanol al 90% en agua para hidratar los tejidos. Al final se lavaron los cortes en agua mQ durante cinco minutos.

4.3.2. Recuperación antigénica

La recuperación antigénica se realizó mediante el tratamiento de los tejidos con amortiguador citrato de sodio 10 mM Tween 20 0.05% durante 10 minutos a una temperatura de 80°C. (Sarrazy & Desmoulière) Las laminillas se dejaron enfriar por 20 minutos, y una vez que se recuperó la temperatura ambiente se realizó un lavado del tejido en agua mQ y finalmente se trasladaron a un contenedor con PBS 0.01M pH 7.4.

4.3.3. Tratamiento enzimático

Los tejidos fueron incubados a 37°C en presencia de solución de tripsina neutralizada (Clonetics#CC-5002) durante 10 minutos, para retirar la tripsina se lavaron las laminillas dos veces con PBS.

4.3.4. Bloqueo de actividad enzimática y de sitios de unión no específica

El bloqueo de la peroxidasa endógena se hizo con peróxido de hidrogeno al 3% en metanol se prepararon 40 mL para cubrir los tejidos de las laminillas, se realizaron dos bloqueos consecutivos de 30 minutos en agitación, esta reacción se hacía en oscuridad, para quitar el exceso de peróxido se realizaron cuatro lavados, tres en PBS 0.01M pH 7.4 Tween 20 0.1% y uno en PBS. Para el bloqueo de sitios inespecíficos se utilizó BSA 0.01% en PBS 0.01M pH 7.4, durante una hora a 37°C. (Robb, 1987)

4.3.5. Detección y revelado

El anticuerpo primario gammas anti-asialo AGP humana fue diluido en BSA 0.01%/PBS 0.01M pH 7.4 y filtrado en membrana millipore de 0.8 micras, se incubó 16 horas a 4°C en una cámara húmeda.

Al día siguiente se lavaron las laminillas cuatro veces con PBS Tween 20 0.1% y una vez con PBS. El anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón peroxidado (Cappel ICN, Pharmaceuticals Inc. E.U.A) en una dilución 1:800, se incubó una hora a 37°C en cámara húmeda y pasado este tiempo se lavaron nuevamente las laminillas cuatro veces con PBS Tween 20 0.1% y una vez con PBS. El revelador se preparó colocando 2 mg de DAB en un tubo al cual se diluyó en 3 ml de PBS 0.01M pH 7.4.

Antes de ser utilizada se le agregaban 4 µl de H₂O₂ al 30%, esta solución se filtró en una membrana de 0.8 micras. En promedio se colocaron 200µl del revelador y se dejó actuar en el tejido hasta ver reacción en un tiempo no mayor de 20 minutos. La reacción se detuvo con agua mQ.

4.3.6. Contratación

La contratación se realizó con Hematoxilina de Harris, colocando las laminillas por tres minutos en una solución filtrada que contenía el colorante, el exceso se lavó con agua corriente y con alcohol ácido atenuó la intensidad del colorante y con agua amoniacal se resaltó la contratación obteniendo un tono azul. Después se procedía a deshidratar y montar los tejidos los cuales se quedaban toda la noche en reposo.

4.3.7 Observación

Las laminillas se observaron con microscopio óptico en los aumentos 10X y 40X en una primera evaluación y con se adición el aumento de 60X, sobre todo para la toma de fotografías representativas de las muestras además de los aumentos adicionales con los que cuentan los microscopios Zeiss.

4.4 Análisis estadístico

Para probar si la presencia de AGP estaba asociada a una característica clinicopatológica en particular se evaluaron las variables con tablas de contingencia.

Se utilizó la prueba Exacta de Fisher que analiza si existe relación entre las variables cualitativas en este caso con resultado dicotómico y posteriormente si el resultado se consideró significativo se usaron medidas de asociación. El coeficiente Φ y el coeficiente Q de Yule se utilizan para evaluar variables dicotómicas y muestras pequeñas incluso soportan tener un 0 o ausencia total en una categoría. Para el cálculo de las pruebas y coeficientes se usó el programa Statdisk 12.0.2 (Triola & Pearson Education, 2013) y el calculador del sitio web de John C. Pezzullo⁵.

5. Resultados

5.1. Anticuerpo y anti AGP

Una vez que se obtuvieron las gammaglobulinas totales contenidas en los sueros se probaron a diferentes concentraciones para obtener la dilución óptima para su uso en IHQ. Como control se obtuvieron previamente cortes de hígado humano (donados por el área de Patología del INCNMSZ) en los cuales se demostró la positividad con tinción granular y uniforme en el citosol de los hepatocitos al usar el anticuerpo contra la glicoproteína, figura 6.

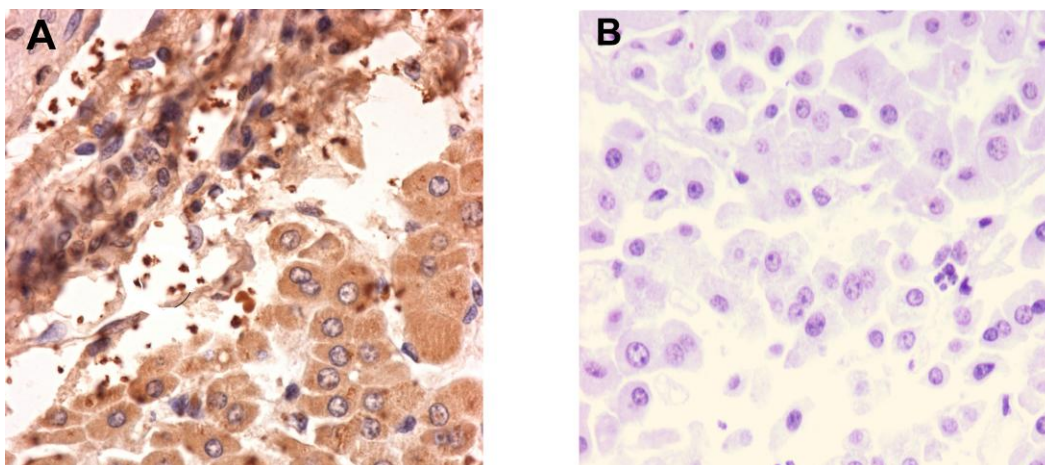


Figura 6. **Hepatocitos positivos a AGP.** A Anticuerpo gammas anti-asialo AGP humana producido en ratón 1:40. B Tejido blanco sin anticuerpo gammas anti-asialo AGP humana. Aumento 60x.

5.2. Cáncer de mama

Al evaluar a las pacientes con este tipo de patología, se excluyeron del estudio dos casos por tratarse de tejidos cuyos cortes y estado de conservación impidieron procesarlos. Del total de 14 tejidos neoplásicos, se encontró tinción positiva para AGP en siete, (50%). Esta inmunocalina fue detectada predominantemente en el citosol de las células neoplásicas, y solo en cinco se identificó tinción perinuclear, ver Figura 7, además de apreciar que algunos linfocitos en al menos dos pacientes presentaban AGP. Por otra parte, las células y el resto de tejido no tumoral no presentaron positividad en la IHQ. Al respecto, es importante señalar que en cada IHQ, se contó con las condiciones de control

que incluyeron muestras positivas y negativas, anticuerpo primario y secundario, así como blanco de reacción.

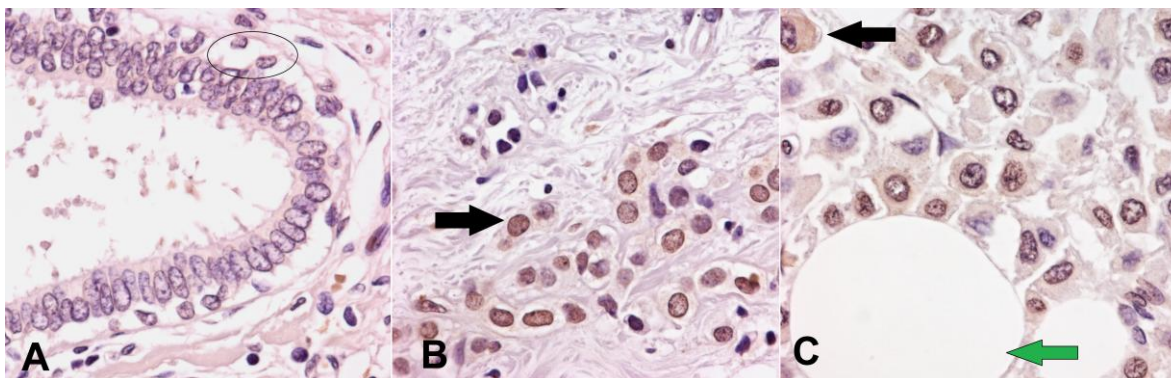


Fig. 7 **Positividad de AGP en Cáncer de mama.** Aumento 60X.

- A- Tejido mamario sano, en un círculo célula mioepitelial con citoplasma claro.
- B- Tejido invasor, la flecha negra indica una célula con tinción predominantemente perinuclear.
- C- Tejido invasor hacia tejido adiposo, la flecha negra indica una célula con tinción citoplasmática; la flecha verde indica un adipocito.

En la tabla 3 se presentan las características individuales del grupo de estudio, el área de patología nos proporcionó la edad, el tipo histológico y si se trataba de canceres doble positivo, tiple negativo esta característica acompañada de los porcentajes de las prueba de coloración de los receptores hormonales dados en porcentajes del 0 al 100% que es lo que se presenta en esta misma tabla. El marcador Her-2 se nos dio en la forma que indica la intensidad de reacción en la membrana (0+, 1+, 2+, 3+).

Tabla 3. **Enlistado de casos, características y resultados**

Caso	Edad	Histología	Marcadores			Positividad a AGP
			ER	PR	Her-2	
1	81	Ductal	95%	60%	0+	Negativo
2	65	Ductal	90%	80%	1+	Negativo
3	51	Ductal infiltrante	90%	0	2+	+tumores in situ +tumores infiltrante ☼ ++ linfocitos
4	43	Ductal	0	0	0+	Negativo

5	87	Ductal alto grado	90%	5%	0+	+tumorales ☼ ++linfocitos + mastocitos
6	73	Lobulillar infiltrante	0	0	0+	+tumorales ☼
7	83	Ductal <i>in situ</i>	10%	10%	0+	Negativo
8	43	Ductal infiltrante	20%	20%	0+	+ tumorales + mastocitos
9	50	Ductal infiltrante	92.5%	88.54%	0+	Negativo
10	42	Ductal infiltrante	84.21%	78.46%	0+	Negativo
11	69	Ductal infiltrante	92.58%	19.23%	1+	Negativo
12	61	Ductal infiltrante	92.59%	71.43%	1+	+ tumorales☼
13	57	Ductal infiltrante	65.79%	31.58%	2+	+ tumorales in situ
14	68	Ductal infiltrante	88.06%	4.41%	1+	+ tumorales☼

☼ Positivo perinuclear

5.3. Relación con las características clínico patológicas

AGP se presentó en este estudio en mujeres con edad 43-87 años, rango que incluye tanto a mujeres premenopáusicas como posmenopáusicas, en las cuales se les diagnosticaron carcinomas infiltrantes. Otra variable que tenían en común era el marcador PR (-); estas dos características al ser evaluadas con la prueba exacta de Fisher al 95% de confianza su relación con la positividad a AGP no fue significativa.

Tabla 4. **Tabla 2x2 para la relación de AGP y la presencia del receptor de progesterona**

Presencia del receptor de progesterona	Resultado positivo a AGP	Resultado negativo a AGP	Totales
PR(+)	3	6	9
PR(-)	4	1	5
	7	7	14

Tabla 5. **Tabla 2X2 para la relación de AGP y el tipo de carcinoma**

	Resultado positivo a AGP	Resultado negativo a AGP	Totales
Carcinoma infiltrante	6	3	9
Carcinoma no infiltrante	0	4	4
	6	7	13

En la tabla 6 se presenta un resumen de las variables analizadas y sus resultados al evaluarlas con estadística, en el anexo están las tablas de contingencia del resto de las características evaluadas.

Hay una tendencia de que la positividad a AGP este asociada con la característica carcinoma infiltrante. Los coeficientes Φ y Q de Yule presentados cuantifican la asociación entre Carcinoma infiltrante y presencia de AGP obteniendo que la asociación entre estas dos variables tiende a ser positiva y creciente.

Tabla. 6 **Resultados de las pruebas estadísticas.**

	Valor p de la prueba exacta de Fisher	Relación con la presencia de AGP
Edad	1.000	NO
Subtipo molecular luminal (A o B)	0.470	NO
Presencia del receptor de estrógeno	1.000	NO
Presencia del receptor de progesterona	0.266	NO
Positividad al marcador Her-2	0.462	NO
Carcinoma infiltrante	0.070	Existe asociación
Medidas de asociación para Carcinoma infiltrante y presencia de AGP		
Coeficiente Φ		Coeficiente Q de Yule
0.67		1.000
Asociación creciente		Asociación positiva

6. Discusión

El estudio de AGP en cáncer de mama ha sido abordado en trabajos previos, en los cuales se han utilizado diferentes estrategias. Una de las primeras evidencias de la asociación entre esta inmunocalina y cáncer de mama fue en los primeros años de la década de los setenta, se estudió el derrame pleural de 13 casos con metástasis, se reveló que los pacientes tienen incremento de AGP en este fluido corporal y su concentración fue mayor que la registrada en suero. Esto se atribuyó a que posiblemente esta proteína se está produciendo localmente en el tejido tumoral. Además, la AGP en líquido pleural a diferencia de la de suero, tenía una composición anormal de carbohidratos, lo cual fue determinado aislando y caracterizando esta proteína mediante electroforesis con gel de acrilamida y el uso de lectinas. Ese mismo estudio mostró que al usar anticuerpos de conejo anti suero humano en inmunodifusión a pH 7.4 e inmunolectroforesis a pH 8.6 se lograba identificar AGP y otras glicoproteínas del derrame (Rudman et al, 1974).

Más adelante la AGP se estudió principalmente en suero, esto fue realizado en un grupo de pacientes con cáncer de mama con diseminación a hueso en los cuales se evaluó la concentración plasmática de esta inmunocalina en su etapa inicial, recurrente y avanzada. Los niveles de AGP se encontraron elevados en etapas donde la gammagrafía ósea resultaba positiva (Roberts et al, 1975).

La evaluación de AGP en las células tumorales no solo de cáncer de mama, sino en otras neoplasias ha sido mucho más limitada. El primer estudio al respecto fue comprobar la síntesis activa de esta inmunocalina en células epiteliales de mama. Al trabajar con la línea tumoral MCF-7, correspondiente a un carcinoma de mama hormonodependiente y células recuperadas de muestras de carcinomas de mama infiltrantes y de mama normal, se reportó, que en todos los casos hay producción de AGP. El método principal de detección consistió en adicionar al medio de cultivo glucosamina y leucina. Se identificaron al menos cinco grupos de componentes, uno de los cuales presentó características como peso molecular y migración electroforética similares a AGP plasmática. (Gendler et al, 1982)

En nuestro estudio se decidió utilizar la inmunohistoquímica porque no solo queríamos información sobre la presencia de AGP sino también su localización ya fuera intracelular en ciertos grupos o extracelular. Además, se usó un anticuerpo contra la AGP desializada debido a que como ya hemos mencionado que el ácido siálico puede generar falsos positivos debido a su distribución en el organismo. En este contexto fue necesario contar durante el desarrollo del trabajo de controles apropiados como la capacidad del anticuerpo anti AGP desializada para identificar a esta inmunocalina en todos los hepatocitos, lo que se logró usando cortes en el hígado humano, los cuales generaron una tinción citoplasmática, respetando el tono uniforme y aspecto granular (Berger et al, 1977).

Mediante esta estrategia y el uso de tejido hepático como control, fue posible documentar la presencia de AGP en tejido epitelial maligno correspondiente al 50% del total de los casos con cáncer de mama. La tinción fue predominantemente citosólica, pero también observamos marca perinuclear en algunos casos, esto fue similar a lo registrado en carcinoma colorrectal, así como en tejido tumoral de cáncer de cabeza y cuello, nombre que se le da los cánceres de las células escamosas del interior de boca, nariz y garganta, De hecho, en ambos casos los autores describen la presencia de la inmunocalina en citosol, y ocasionalmente la encontraron localizada a nivel perinuclear (Croce et al, 2001), (Croce et al, 2005). En estos trabajos, se han empleado anticuerpos comerciales contra AGP total y simultáneamente se ha identificado una marca positiva para grupos sialilados mediante anticuerpos anti-CD15. Al igual que en los tumores mencionados, nosotros no encontramos la presencia de AGP en todos los casos. En el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal AGP si se presentó en todos los casos (Chirwa et al, 2012).

Por otra parte, entre los casos positivos de cáncer de mama no se presentó tinción en células mioepiteliares, células del epitelio basal, lo que es relevante debido a que se sabe que el cáncer de mama se presenta mayormente en el epitelio luminal mientras que las células mioepiteliares rara vez se transforman ocasionando cáncer. Últimamente se ha propuesto que al presentarse mutación en las células mioepiteliares estas pueden perder la capacidad de contener las células cancerígenas evitando la invasión a otros tejidos (Gudjonsson et al, 2005). Esta barrera se rompe mayormente cuando las células cancerígenas tienen el fenotipo ER(-) como las células mioepiteliares es decir los subtipos moleculares triple negativo y Her-2.

En el primer grupo de casos evaluados la positividad estaba relacionada con el inmunofenotipo independiente a progesterona, tendencia que no continuó al incrementar el número de casos y tal relación no fue significativa con la prueba exacta de Fisher.

Al analizar lo referente a la dependencia de estrógeno fue evidente que AGP se encuentra en muestras tanto ER (+) como en ER (-), lo que nos indica que puede ser una proteína presente desde un grupo de procesos indiferenciados que dan origen tanto a tumores luminales (ER positivo) como tumores basales (ER negativos). Esta evidencia coincide con los resultados de un estudio donde se evaluó un conjunto de glicoproteínas incluida AGP con el objeto de obtener un marcador potencial para diferenciar a los subtipos luminales y basales y no observó diferencia significativa en la presencia de AGP tanto en muestras ER (+) como en ER (-). (Semann et al, 2012)

Sería interesante realizar un estudio adicional directo en el tejido relacionando los cambios en la glicosilación de AGP en que se consideren otras variables del cáncer como su etapa inicial, recaída y tumores secundarios como se ha hecho en suero, en los cuales se pueden encontrar tras el tratamiento algunas alteraciones distintivas en los residuos de carbohidratos. Los cambios en la glicosilación de AGP que se han evaluado en cáncer son el aumento de fucosa y ácido siálico estos dos ocasionan una microheterogeneidad que difiere entre un tumor maligno, benigno y tejido normal. La expresión de carbohidratos similares a sialil-LewisX en AGP se asocian a un mal pronóstico (Hashimoto et al, 2004), esta estructura es una de las principales alteraciones durante la carcinogénesis y está involucrada en la adhesión de células cancerosa al endotelio vascular favoreciendo la metástasis. Otros estudio encontró que tanto el carcinoma ductal *in situ* y el carcinoma infiltrante presentan altos niveles galactosa asociada a N-Acetilgalactosamina esta alteración se asocian a mayor malignidad (Smith et al, 2012).

La positividad de AGP en células tumorales presentes en áreas adyacentes al tumor como tejido adiposo y ganglio linfático sugiere la participación de esta inmunocalina en el aumento de la capacidad invasiva de las células tumorales. Aumentando el número de muestras se podría evaluar si la relación entre la presencia de AGP y los carcinomas infiltrantes es realmente significativa.

Además de las células con cáncer de mama algunos infiltrados de linfocitos en el tejido tumoral presentaron AGP, cosa que no se tomó como inespecificidad porque se ha descrito que estas células llegan a tener AGP en su membrana. La mayor positividad en linfocitos, fue interesante ya que la señal en estos fue intensa o mayor que la obtenida en células cancerosas.

Creemos que proseguir con el estudio de AGP permitirá evaluarla como un marcador útil, principalmente en tumores infiltrantes pero aún se debe seguir estudiando, en el presente trabajo se sugiere que la relación entre la presencia de AGP y el carcinoma infiltrante la cual podrá confirmarse o desestimarse al aumentar el número de muestra en futuros estudios.

7. Conclusiones

- AGP está presente en tejido tumoral mamario epitelial y este es el primer reporte que se identifica por Inmunohistoquímica.
- Al usar un anticuerpo contra AGP desializada fue posible detectar esta inmunocalina, que por su alta glicosilación podría generar distintos efectos de interferencia.
- Al menos el 50% de muestras de cáncer de mama presentaron AGP citosólica y en cinco de las 14 muestras analizadas presentaron tinción perinuclear.
- Se presentó evidencia de una asociación positiva y creciente entre la presencia de AGP y la histología infiltrante lo que sugiere que AGP puede ser un marcador útil en algunos grupos de carcinoma de mama.

Literatura citada

- Åkerstrom B., Flower D., Salier J. Lipocalins: unity in diversity. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000; 1482(1-2): 1-8.
- Alberts, B. 1996. *Biología Molecular de la célula*. Tercera Edición. Omega. España. 1498 págs.
- Berger E., Alpert E., Schmid K., Isselbacher K. Immunohistochemical Localization of α 1-Acid-Glycoprotein in Human Liver Parenchymal Cells. *Histochemistry*.1977; 51:293-296.
- Brooks S., Harris A. 2006. *Methods in Molecular Medicine*. Breast Cancer Research Protocols. Humana Press. Estados Unidos de America. 517 pp.
- Chirwa N., Govender D., Ndimba B., Lotz Z., Tyler M., Panieri E., Kahn D., Mall A. A 40-50kDa Glycoprotein Associated with Mucus is identified as α -1-Acid Glycoprotein in Carcinoma of the Stomach. *Journal of Cancer*. 2012; 3: 83-92.
- Croce M., Price M., Segal A. Association of α 1 Acidic Glycoprotein and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Pathology oncology research*. 2001; 7(2): 111-117.
- Croce M., Sállice V., Lacunza E., Segal-Eiras A. α 1-acid glycoprotein (AGP): a possible carrier of sialyl Lewis X (slewis X) antigen in colorectal carcinoma. *Histology and Histopathology*.2005; 20: 91-97.
- Flower D. The lipocalin protein family; structure and fuction, *Biochemical Journal*.1996; 318:1-14.
- Garcés M., Pinto J., Marcelo M., Gómez H. Influencia de los subtipos de cáncer de mama determinados por inmunohistoquímica en la recurrencia local y a distancia en pacientes sometidas a cirugía como tratamiento inicial. *Carcinos*. 2012; 2(1): 3-12.
- García G., García A. Aspectos biomédicos de las inmunocalinas en la especie humana. *Universitas Médica*. 2008; 49(1): 77-96.
- Gendler S., Dermer G., Silverman L. Synthesis of α 1-Antichymotrypsin and α 1-Acid Glycoprotein by human breast epithelial cells. *Cancer Research*. 1982; 42: 4567-4573.
- Gruver A., Portier B., Tubbs R. Molecular pathology of breast cancer: the journey from traditional practice toward embracing the complexity of a molecular classification. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2011; 135(5): 544-557.
- Gryzyb J., Latowski D. Lipocalins-a family portrait. *Journal of Plant Physiology*. 2006; 163(9): 895-915.
- Gudjonsson T., Adriance M., Sternlicht M., Patersen O., Bissell M. Myoepithelial Cells: Their Origin and Function in Breast Morphogenesis and Neoplasia. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2005; 10: 261-272.
- Hashimoto S., Asao T., Takahashi J., Yagllhashi Y., Nishimura T., Sanlabadl A., Poland D., van Dijk W., Kuwano H., Kochibe N. Yazawa S. α 1- Acid Glycoprotein Fucosylation as a Marker of Carcinoma Progression and Prognosis. *Cancer*.2004; 101: 2825-2836.
- Hochepped T., Berger F., Baumann H., Libert C. α 1-Acid glycoprotein; an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties.*Cytokine & Growth Factor Reviews*.2003; 14: 25-34.
- Huang Z., Ung T. Effect of alpha-1-acid glycoprotein binding on pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Current Drug Metabolism*. 2013; 14(2): 226-238.
- Israili Z., Dayton P. Human Alpha-1-glycoprotein and its interaction with drugs. *Drug metabolism reviews*. 2001; 33(2): 161-235.
- Lögdberg L., Wester L. Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1482: 284-297.
- Pérez, I. 2009. Tipos histológicos más frecuentes de cáncer de mama en lesiones birads 4 y 5 en el Centro Médico ABC 2007-2008. Tesis que para obtener el grado de Especialista en Radiología e Imagen. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Robb, J. Diagnostic Immunohistochemistry of Epithelial Neoplasms: Practical Aspects of Technique and Interpretation. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*.1987; 1:116-123.
- Roberts J., Keyse J., Baum M. Serum alpha-1-acid glycoprotein as an index of dissemination in breast cancer. *Br J. Surg*. 1975. 62(10):816-9.
- Rubman D., Chawla R., Del Rio A., Holloms B., Hall E., Conn J. Orosomucoid content of pleural and peritoneal effusions. *The Journal of Clinical Investigation*. 1974; 54: 147-155.

- Sarrazy V., Desmoulière A. Double Immunohistochemistry with Horseradish Peroxidase and Alkaline Phosphatase Detection Systems. *Methods in Molecular Biology*. 2010. 611:59-71.
- Semaan S., Wang X., Marshall A., Sang Q. Identification of Potential Glycoprotein Biomarkers in Estrogen Receptor Positive (ER+) and Negative (ER-) Human Breast Cancer Tissues by LC-LTQ/FT-ICR Mass Spectrometry. *Journal of cancer*. 2012; 3: 269–284.
- Schönfeld D., Ravelli R., Mueller U., Skerra A. The 1.8-Å Crystal Structure of α 1-Acid Glycoprotein (Orosomucoid) Solved by UV RIP Reveals the Broad Drug-Binding Activity of This Human Plasma Lipocalin. *Journal of Molecular Biology*, 2008; 384(2): 393-405.
- Smith K., Behan J., Matthews-Smith G., Magliocco A. 2012. Alpha-1-Acid Glycoprotein (AGP) as a Potential Biomarker for Breast Cancer. *Glycosylation. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. 201-222.
- Sørli T., Perou C., Tibshirani R., Aas T. Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M., Rijn M., Jeffrey S., Thorsen T., Quist H., Matese J., Brown P. Botstein D., Lønning P. Børresen-Dale A. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(19):10869-10874.
- Tesseromatis C., Alevizou A., Tigka E., Kotsiou A. 2011. Acute-Phase Proteins: Alpha -1- Acid Glycoprotein, Acute Phase Proteins - Regulation and Functions of Acute Phase . InTech, Disponible en <http://www.intechopen.com/books/acute-phase-proteins-regulation-and-functions-of-acute-phase-proteins/acute-phase-proteins-alpha-1-acid-glycoprotein>
- Triola, Marc., Pearson Education. Statdisk, version 12.0.2. 2013 Oct. www.statdisk.org.
- Vilches N., Barboza O., Garza R., Hacer J., Flores J. Aplicaciones prácticas de la inmunohistoquímica en la patología de la glándula mamaria. *Patología* 2010; 48(3): 194-203.
- Watson C., Khaled W. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development*, 2008; 135:995-1003.
- Weigelt B., Geyer F., Reis-Filho J. Histological types of breast cancer: How special are they? *Molecular Oncology* 2010; 4:192-208.
- Watkins, S. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. 14.6.1-14.6.13.
- Xu S., Venge P. Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1482: 298-307.
- Yuasa I., Umetsu K. Vogt U., Nakamura H., Nanba E., Tamaki N., Irizawa Y. Human orosomucoid polymorphism: molecular basis of the three common ORM1 alleles, ORM1*F1, ORM1*F2, and ORM1*S. *Human Genetics*. 1997; 99: 393-398.

Paginas consultadas

1. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía <http://www.inegi.org.mx/>
3. Breast Cancer <http://www.breastcancer.org/>
4. Instituto Nacional de Cancerología <http://www.incan.salud.gob.mx/>
5. Calculador de tabla 2x2 <http://statpages.org/ctab2x2.html>

8. Anexo

Estandarización y optimización

Los resultados de la prueba en hígado se presentan en la Tabla I.

Tabla I. Resultados de las concentraciones de γ α -asialo AGP en hígado humano

Concentración del anticuerpo gammas anti-asialo AGP humana	Positividad en tejido de hígado humano
1:400	Negativo
1:200	Negativo
1:100	Negativo
1:80	Positivo
1:40	Positivo
1:20	Positivo
1:10	Inespecífico

Es necesario recordar que parte de la no reproducibilidad de la inmunohistoquímica está dada por las variantes en la fijación de los tejidos, por lo que al contar con casos de varias instituciones se corría el riesgo de obtener este error, para evitarlo se realizó recuperación antigénica con calor con un amortiguador ácido y digestión enzimática moderada con tripsina, lo cual favoreció la señal del anticuerpo.

Con lo referente a la técnica de IHQ, en resumen podemos presentar las diferencias entre el protocolo inicial y protocolo que se presenta en este documento. Tabla II.

Tabla II. Diferencias entre el protocolo inicial y el protocolo estandarizado en este trabajo

	Protocolo inicial (Watkins, 1989)	Protocolo definitivo
Preparación de tejido	Desparafinado a 56°C	Desparafinado a 58°C Recuperación antigénica con calor 80°C en amortiguador ácido pH 6. Digestión enzimática moderada con tripsina grado cultivo 10 minutos 37°C.
Suero diluyente	Suero de caballo 2.5%	BSA 0.1%
Amortiguadores	HCN 0.01M HCN 0.01M 0.1% Tween 20	PBS 0.01 pH 7.4 PBS 0.01 M 0.1% Tween 20
Revelador	2mg de DAB 2ml de HCN 0.01M 2µl de H ₂ O ₂	2 mg de DAB 3 ml de PBS 0.01M pH 7.4 4 µl de H ₂ O ₂

Tablas y conceptos del análisis estadístico.

	Edad	Histología	Datos							Positivo a AGP
			ER		PR		Her 2		Subtipo	
1	<50	Ductal	95%	+	60%	+	0+	-	Luminal A	Negativo
2	<50	Ductal	90%	+	80%	+	1+	-	Luminal A	Negativo
3	<50	Ductal infiltrante	90%	+	0	-	2+	+	Luminal B	Positivo
4	>50	Ductal	0	-	0	-	0+	-	Triple negativo	Negativo
5	<50	Ductal alto grado	90%	+	5%	-	0+	-	Luminal A	Positivo
6	<50	Lobulillar infiltrante	0	-	0	-	0+	-	Triple negativo	Positivo
7	<50	Ductal in situ	10%	+	10%	+	0+	-	Luminal A	Negativo
8	>50	Ductal infiltrante	20%	+	20%	+	0+	-	Luminal A	Positivo
9	<50	Ductal infiltrante	92.5%	+	88.54%	+	0+	-	Luminal A	Negativo
10	>50	Ductal infiltrante	84.21%	+	78.46%	+	0+	-	Luminal A	Negativo
11	<50	Ductal infiltrante	92.58%	+	19.23%	+	1+	-	Luminal A	Negativo
12	<50	Ductal infiltrante	92.59%	+	71.43%	+	1+	-	Luminal A	Positivo
13	<50	Ductal infiltrante	65.79%	+	31.58%	+	2+	+	Luminal B	Positivo
14	<50	Ductal infiltrante	88.06%	+	4.41%	-	1+	-	Luminal A	Positivo

Se les dio carácter ER(+) y PR(+) a los casos cuyas cifras eran $\geq 10\%$ y Her-2(+) si contaban con tres cruces (3+) o dos cruces (2+) y Ki-67 $>14\%$ (Garcés, 2012) para convertir estos porcentajes en variables cualitativas dicotómicas . A la vez también con estos tres marcadores se clasificó las muestras en los subtipos luminal, triple negativo y Her-2 para obtener otras variables.

Tabla de contingencia 2X2			
Factor	Resultado positivo	Resultado negativo	
Presente	a	b	ni a+b
Ausente	c	d	no c+b
	mi a+c	mo b+d	N Total de casos a+b+c+d

N total de la muestra evaluada

mi total de la muestra que presenta la característica de interés

mo total de la muestra que no presenta la característica de interés

ni total de la muestra que presenta el factor 1

no total de la muestra que presenta el factor 2

Para la prueba Exacta de Fisher al completar la tabla se debe cumplir que $ni > no$ y si el valor de $p < 0.05$ se rechaza la hipótesis nula.

Tablas de contingencia del estudio de la presencia de AGP

Edad	Resultado positivo a AGP	Resultado negativo a AGP	Totales
>50	6	5	11
<50	1	2	3
	7	7	14

Subtipo molecular luminal	Resultado positivo a AGP	Resultado negativo a AGP	Totales
Luminal A	5	5	10
Luminal B	2	0	2
	7	5	12

Presencia del receptor de estrógeno	Resultado positivo a AGP	Resultado negativo a AGP	Totales
ER(+)	6	6	12
ER(-)	1	1	2
	7	7	14

Positividad al marcador Her-2	Resultado positivo a AGP	Resultado negativo a AGP	Totales
Her(-)	5	7	12
Her(+)	2	0	2
	7	7	14