

0. PREFACIO

UN LARGO CAMINO

Desde que Hipócrates (460-370 a.c.) describiera el cáncer como un padecimiento de pronóstico grave secundario al exceso de, lo que él denominaba, bilis negra producida por el bazo y el estómago, hasta nuestros días, ha habido grandes e importantes avances en el conocimiento y manejo de esta enfermedad, pero en los comienzos del siglo XXI sigue constituyendo uno de los problemas socio sanitarios más importantes que conoce la humanidad.

La primera herramienta empleada en el tratamiento del cáncer fue su exéresis, que se asentó definitivamente a finales del siglo XIX y principios del XX con cirujanos de la talla de Wolkman (primera extirpación de un cáncer de recto), Kocker (desarrollo de la cirugía tiroidea), Bilroth (primera gastrectomía), Halsted (primera mastectomía radical), Wertheim (histerectomía radical), Mile (introdujo la resección abdominoperineal en el cáncer de recto) etc.

Más tarde, en 1908, a raíz de los descubrimientos de Becquerel (radioactividad) y el matrimonio Curie (radio), Becquerel empleó las radiaciones ionizantes como terapéutica por primera vez y posteriormente se desarrollaría como tal la radioterapia.

El turno de la quimioterapia llegaría más tarde, a partir de los descubrimientos de Lits y Dustin en 1934 (efecto antimitótico de la colchicina), Waksman (descubrimiento de la actinomicina), Gilman y Goodman (efectos de la mostaza nitrogenada en diversas neoplasias linfoides) y de otros muchos.

Los tratamientos hormonales ya se venían empleando desde finales del siglo XIX: en 1890, Wite y Cabot realizaron una castración en un paciente con hipertrofia prostática y en 1895, Beatson, realizó una ovariectomía a una mujer con cáncer de mama avanzado. Sin embargo, la hormonoterapia médica como tal se desarrolló a partir de los años 40 y 60. En 1944, Haddow comprobó la acción del dietilestilbestrol en el cáncer de mama, Jensen describió en 1967 la presencia de receptores estrogénicos en el cáncer de mama,

en 1969 Hall sintetizó la aminoglutetimida y Cole descubrió los fármacos antiestrógenos en 1971.

Más tarde, se empezó a emplear la inmunoterapia como tratamiento oncológico. En este campo se podría considerar a Mathé el pionero, quien en 1964 observó fenómenos inmunológicos en pacientes afectos de coriocarcinoma e intentó su aplicación clínica con poco éxito (De Castro y González, 1998a).

Desde entonces y conforme se han ido incrementando los conocimientos sobre las bases moleculares del cáncer, se han ido abriendo nuevas líneas de investigación con resultados esperanzadores en muchos casos, aunque todavía hoy con escasa rentabilidad clínica.

Este trabajo va a intentar aprovechar los conocimientos que tantos otros infatigables investigadores han aportado anteriormente en el terreno de la biología molecular y la inmunoterapia para avanzar otro pequeño, pero confiamos que firme, paso hacia la mejor comprensión del cáncer y aproximarnos más así a su curación.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CICLO CELULAR

El ciclo celular constituye el proceso básico de la vida. Se compone de diferentes fases interrelacionadas entre sí que tienen como objetivo final la reproducción y proliferación celular (Fig.1).

Una célula en reposo estaría en lo que se conoce como Fase G0 o de quiescencia. Cuando esta célula es requerida para iniciar un ciclo celular se suceden las siguientes fases (Monzó, 1999):

- Fase G1: la célula es estimulada por diversos factores de crecimiento extracelulares que se unen a receptores de membrana y activan las cascadas de señalización que regulan la transcripción de los genes que codifican las proteínas necesarias para llevar a cabo el proceso de la proliferación. Como consecuencia del incremento de la síntesis de sus componentes, fundamentalmente proteínas necesarias para la duplicación de ADN, la célula dobla su tamaño. Esta fase tiene una duración aproximada de 6 a 12 horas y al final existe un conjunto de proteínas cuya finalidad es la de garantizar que se den las condiciones propicias (temperatura, pH, concentración salina,...) para que la célula pueda pasar a la siguiente fase y que se denomina punto de control R o punto de restricción.
- Fase S: tiene una duración aproximada de 8 horas y es la fase en la que se duplica el ADN.
- Fase G2: supone una nueva fase de producción de proteínas para prepararse para entrar en división celular. Un nuevo punto de control, denominado control M, asegura que las condiciones fisicoquímicas sean las correctas y la duplicación precisa y sin errores.
- Fase M: Es la fase de división celular y dura aproximadamente 1 hora. Está a su vez subdividida en otras 5 fases (profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis) y su resultado final son dos células $2n$ idénticas a la primera.

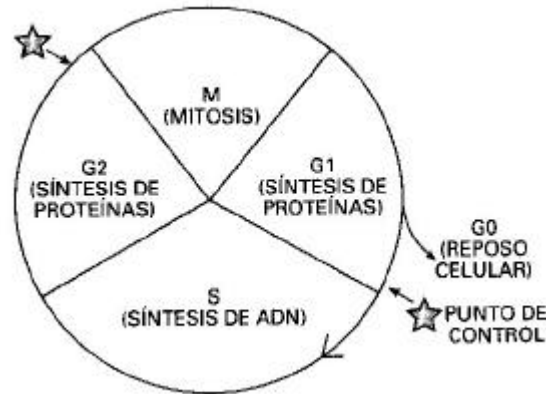


Fig.1. Ciclo Celular. Reproducido de De Castro J, González Barón M, “Cinética de la célula tumoral” en “Oncología Clínica” Vol. 1, 2ª Edición, 21-34.

1.1.1 CICLINAS Y CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS

Como es lógico, este ciclo está sometido a un riguroso sistema de control llevado a cabo por una serie de proteínas cuyo objetivo es el de garantizar que cada fase se haya completado de forma correcta. Estas proteínas son las cinasas que se caracterizan por tener la capacidad de fosforilar otras proteínas. Esta acción está a su vez regulada por otras proteínas denominadas ciclinas, por lo que las cinasas se denominan cinasas dependientes de ciclinas (CDK=Cyclin Dependent Kinase). Ambas, forman un complejo activo (holoenzima) con actividad serin/treonin cinasa específica que actúa en diferentes puntos del ciclo celular. Mientras que los niveles de CDK permanecen estables durante todo el ciclo, los niveles de ciclina aumentan y disminuyen en función de la fase del ciclo celular (Fig. 2). Así, existen dos tipos especiales de ciclinas:

a) **Ciclinas G1:** regulan el punto de control R. Son las ciclinas D y E y se unen a las CDK(2, 4 y 6) durante la fase G1 para activar el inicio de la fase S.

b) **Ciclinas mitóticas:** regulan el punto de control G2/M. Son las ciclinas A y B y se unen a las CDK (1 y 2) durante la fase G2 para activar la entrada en mitosis (Arellano y Moreno, 1997).

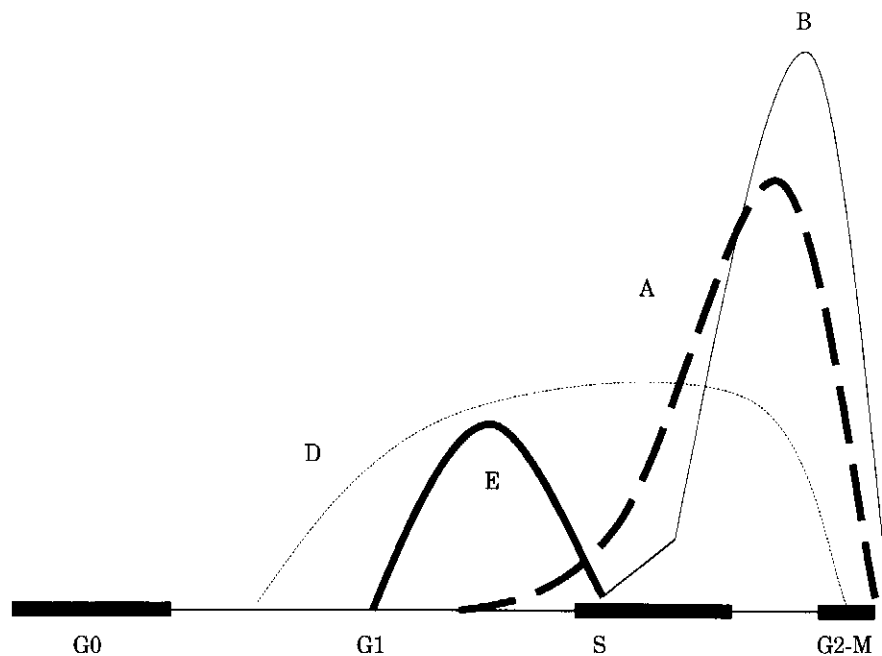


Fig. 2. Expresión de ciclinas durante el ciclo celular. Reproducido de Monzó M. “El ciclo celular y sus alteraciones” en “Oncología Médica” Vol. 1, 26-33.

La producción de los diferentes subtipos de ciclinas D (actualmente existen tres identificadas D1, D2 y D3) (Inaba et al, 1992) es estimulada por factores de crecimiento extracelulares y su inhibición depende de factores que reducen la proliferación celular.

Hasta que la célula no ha rebasado el punto de restricción de G1 es dependiente de factores mitógenos extracelulares (Pardee, 1989). La ausencia de estos factores antes de llegar al punto de restricción condicionaría la rápida degradación de las ciclinas-D, impidiendo la activación del complejo E-cdk2 y provocando la interrupción del ciclo celular. Sin embargo, la desaparición de los factores mitógenos cuando la célula ya ha rebasado el primer punto de restricción ya no impide la progresión de la célula en el ciclo celular, la célula es ahora mitógeno-independiente.

Las ciclinas-D presentan un pequeño pico de acumulación al final de la fase G1 y se unen a la CDK4 o CDK6 (en función del tipo celular) (Matsushime et al, 1992). El complejo D-CDK4 se encarga de hiperfosforilar la proteína Rb. Esta proteína desfosforilada bloquea el ciclo celular en la transición G1-S, por lo que su fosforilación permite a la célula entrar en fase S. Rb tiene también una importante relación con el factor de transcripción E2F que estimula expresión de diversas proteínas activadoras de la proliferación y a la cual se encuentra unida en estado de desfosforilación, impidiendo así su acción pro-proliferativa (De Castro y González, 1998b).

Las ciclinas E se unen fundamentalmente a CDK2. Esta tiene un pico de acumulación al inicio de la fase S y poco después sufre una rápida degradación. Al igual que el complejo D-CDK4, su acción fundamental es la de fosforilar la proteína Rb.

La ciclina A se expresa fundamentalmente en fase S y alcanza su máxima concentración al final de G2, sufriendo una rápida degradación nada más iniciarse la mitosis. Se une a la CDK2 que estaba unida a la ciclina E y que queda libre al producirse la degradación de la misma. El complejo A-CDK2 actúa fundamentalmente fosforilando y activando helicasas, las cuales a su vez actúan abriendo la doble hélice de ADN.

Por último, las ciclinas B (B1 y B2) inician su síntesis al final de la fase S, alcanzando su pico al final de G2 y sufriendo una rápida degradación al inicio de la mitosis. Forman

complejos con la cinasa Cdc2 ó CDK1 (también llamada p34) cuya acción es la de controlar la formación del uso mitótico y la correcta distribución de los cromosomas en la placa ecuatorial de la célula. Finalmente, para que la célula pueda completar la mitosis y abandonar el ciclo celular, la ciclina B debe ser eliminada mediante el complejo promotor de anafase (degradación proteica mediada por ubiquitina) (King et al, 1996).

1.1.2. INHIBIDORES DE CDK

A su vez, los complejos ciclina-CDK son controlados por otra serie proteínas (Fig. 3). Unas activan las síntesis de los complejos G-CDK (fosfatasas codificadas por Cdc 25 y Pyp3, kinasas codificadas por Cak y Civ) y otras los inactivan (p21, p27, p15, p16, p18, p19). Globalmente, las proteínas que regulan de forma negativa la actividad de G-CDK se denominan inhibidores de las ciclinas dependientes de kinasas o CKI (del inglés Cyclin-dependent Kinase Inhibitors). Actualmente las CKI se clasifican en dos grupos: la familia de p16 Ink (p15,p16, p18 y p19) y la familia Cip/Kip (p21, p27 y p57) que se definen por su analogía estructural y su diferente mecanismo inhibitorio (Tannoch et al, 2000).

La familia Ink tiene actividad contra las cinasas G1, cdk2 y cdk4. Su mecanismo de acción se basa en la unión a las cdk bloqueando así su unión a la ciclina.

Por otra parte, las CKI de la familia Cip/Kip actúan formando complejos terciarios con las unidades ciclina-cdk y al contrario que las anteriores, parecen interactuar con casi todos los complejos ciclina-cdk (Sherr y Roberts, 1995). Además, P21 y p57 también se unen al antígeno nuclear de proliferación celular PCNA (del inglés Proliferating Cell Nuclear Antigen) que es una subunidad de la ADN polimerasa, con lo que se bloquea su acción y resulta así una inhibición de la síntesis de ADN y la interrupción del ciclo celular (Flores-Rozas et al, 1994).

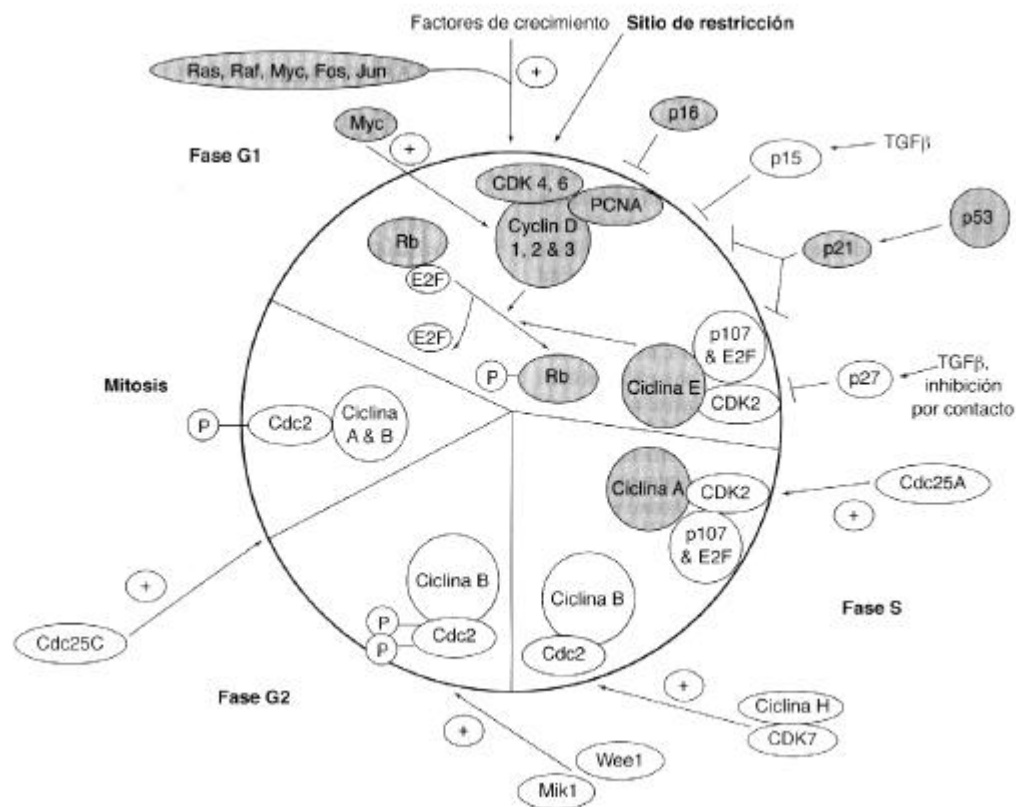


Fig. 3. Regulación del Ciclo Celular. Reproducido de Hunter T, Pines J. “Cyclins and cancer. II. Cyclin D and CDK inhibitors come of age”. *Cell* 1994; 79:573-82 (Hunter, Pines 1994). Fuente: DeVita VT, Jr, Hellman S, Rosenberg SA. Principios y Práctica de Oncología (Perkins, Stern 1997).

1.1.3. PROTEOLISIS MEDIADA POR UBIQUITINA

Cuando un componente del ciclo celular ha completado su función, es degradado completamente. De este modo, la progresión a través del ciclo celular queda asegurada sin riesgo de que la célula intente repetir alguna fase inapropiadamente. Esta

degradación proteica tanto de las ciclinas y cdk como de sus inhibidores se lleva a cabo por un mecanismo mediado por ubiquitina. Esencialmente, la proteína a eliminar sufre un proceso de ubiquitinación y se convierte así en sustrato del complejo proteosoma 26S quien la fragmentará en pequeños péptidos (King et al, 1996).

1.1.4. PAPEL DE LA PROTEÍNA RB

El gen Rb fue inicialmente descrito como un gen supresor de tumores que se encontraba mutado en familias con una predisposición a padecer retinoblastomas y osteosarcomas (Friend et al, 1986). Actualmente, se sabe que la proteína Rb (que consta de 928 aminoácidos) y otras proteínas asociadas (p107 y p130) son esenciales en la regulación del ciclo celular de casi todas las células del organismo, no sólo de las del ojo y el hueso.

Como se ha mencionado anteriormente, la función de la pRb viene determinada por su situación de fosforilación.

Normalmente, los niveles de proteína RB no se modifican durante el ciclo celular, pero sí sus niveles de fosforilación. En una célula que se encuentra en reposo, la pRb permanece hipofosforilada, la cual fija los factores de transcripción génica E2F y DP. El factor E2F está a su vez unido a una secuencia específica de nucleótidos en el DNA genómico, impidiendo así la transcripción de RNA mensajeros que codifican para proteínas necesarias para la proliferación celular. Sin embargo, a medida que progresa el ciclo celular, la pRb se va hiperfosforilando merced a la acción de los complejos ciclina-cdk4/6 y ciclina E-cdk2. Así permanecerá durante el resto del ciclo. Ahora, los factores de transcripción son liberados y pueden ejercer su acción, resultado de lo cual la célula progresa en el ciclo celular.

Se han descrito al menos seis subtipos de la familia E2F y dos de la DP. Las proteínas E2F₁₋₅ poseen una potente acción de transactivación, sin embargo E2F₆ parece que

tendría como misión el reprimir la transcripción mediada por E2F (Morkel et al, 1997).
Se cree que las proteínas DP actúan potenciando la acción de las E2F.

1.2. APOPTOSIS

La muerte celular programada o apoptosis es un complejo mecanismo esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular controlado genéticamente. Este complejo fenómeno es conocido desde 1972 (Kerr et al, 1972) aunque han sido trabajos posteriores los que han aportado más conocimientos sobre sus mecanismos de actuación.

La apoptosis es fundamental tanto durante el periodo embrionario (formación de estructuras tales como los espacios interdigitales, por ejemplo) como en el adulto. Constituye el mecanismo a través del cual se asegura una correcta funcionalidad de todos los tejidos y órganos al eliminar las células defectuosas. Es básica para el control de enfermedades autoinmunitarias al destruir posibles linfocitos autorreactivos y constituye un elemento esencial de la reacción inmunitaria mediada por linfocitos T citotóxicos o por las células NK (del inglés “natural killer”). Cuando una célula sufre una mutación genética o daño irreparable en su ADN sufrirá así mismo los fenómenos apoptóticos, previniéndose así la cancerogénesis.

Existen diferentes factores con capacidad para desencadenar la apoptosis: hiperproliferación, diferenciación anómala, infecciones virales, alteración del ADN por radioterapia o quimioterapia, células citotóxicas, mensajes endocrinos y paracrinós y pérdida de territorialidad.

En la apoptosis están implicados una serie de ligandos y sus correspondientes receptores, los cuales transmiten la señal apoptótica a varias proteasas citoplasmáticas denominadas caspasas (Nagata, 1997; Yuan, 1997), aunque también existe cierta evidencia de la existencia de una apoptosis caspasa-independiente (Miller et al, 1997). Entre los ligandos destacan el de Fas (Fas-L), también denominado de Apo1 (Apo-1-L)

o de CD95 (CD95-L), el TNF α , IL-1 o INF γ o linfotoxina. Estos ligandos son reconocidos por un conjunto de receptores que pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) que se definen por presentar similares dominios extracelulares ricos en cisteína y que incluyen a Fas (Apo1 ó CD95), a TNFR (también conocido como p55 ó CD120a), DR3 (del inglés “**D**eath **R**eceptor **3**” ó Apo3), DR4 y DR5 (Apo2, TRAIL-R2, del inglés “**T**NF-**R**elated **A**poptosis **I**nducing **L**igand”, ó Killer) (Nagata, 1997; Yuan, 1997; Ashkenazi y Dixi, 1998). También existe otro receptor (CAR1) que no pertenece a la superfamilia del TNF y del cual se desconoce su ligando (Ashkenazi y Dixi 1998).

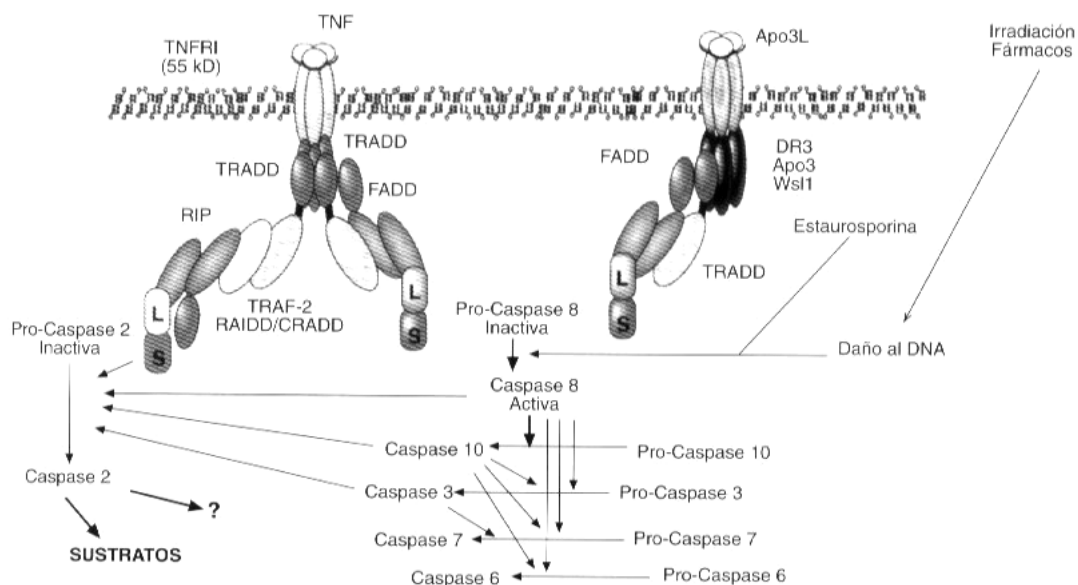


Fig.4. Cascada de activación de caspasas. Reproducido de Lcal Sanjuán LC, “Sistemas de transmisión de señales” en “Oncología Clínica y Molecular”, 59-66.

La señal llega a la cascada de las caspasas que son zimógenos inactivos que se activan por hidrólisis consecutiva.

Como resultado final de esta sucesión de señales se produce la desconexión de los sistemas de reparación del ADN y generalmente, aunque no de forma constante, la activación de una nucleasa que degradará el ADN en fragmentos de tamaño nucleosomal (múltiplo de 160 pares de bases). De hecho, “apoptosis” proviene del griego y significa precisamente “caída con fragmentación”.

Paralelamente a las modificaciones bioquímicas, se producen una serie de cambios morfológicos en la célula tales como la reducción del tamaño, condensación nuclear y citoplasmática, la fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos provenientes de la ruptura nuclear. Dichos restos celulares o cuerpos apoptóticos son fagocitados inmediatamente por los macrófagos que se encuentran en las proximidades, evitándose así la liberación masiva de material intracelular (como ocurre en la necrosis) y la respuesta inflamatoria consecuente (Perona y Lacal, 1999). En la tabla 1 se resumen las diferencias entre apoptosis y necrosis.

Al contrario que la necrosis, la apoptosis está controlada genéticamente. Existen dos grupos de genes implicados en dicha regulación (los pro-apoptóticos y los anti-apoptóticos) que codifican para diferentes proteínas relacionadas con la muerte celular programada. Entre los genes pro-apoptóticos se encuentra bax y entre los anti-apoptóticos Bcl-2 que codifican para proteínas con capacidad de dimerización entre ellas y que dependiendo del dímero producto (bax-bax, bax-bcl-2 ó bcl-2-bcl-2) se activará o inhibirá la apoptosis. Existe otro gen de esta familia, el bcl-X, que puede dar lugar a dos proteínas diferentes: bcl-X_L (supresora de la apoptosis) y a bcl-X_S (inductora de apoptosis), que también se dimerizan con las anteriores (Tarón, 2000).

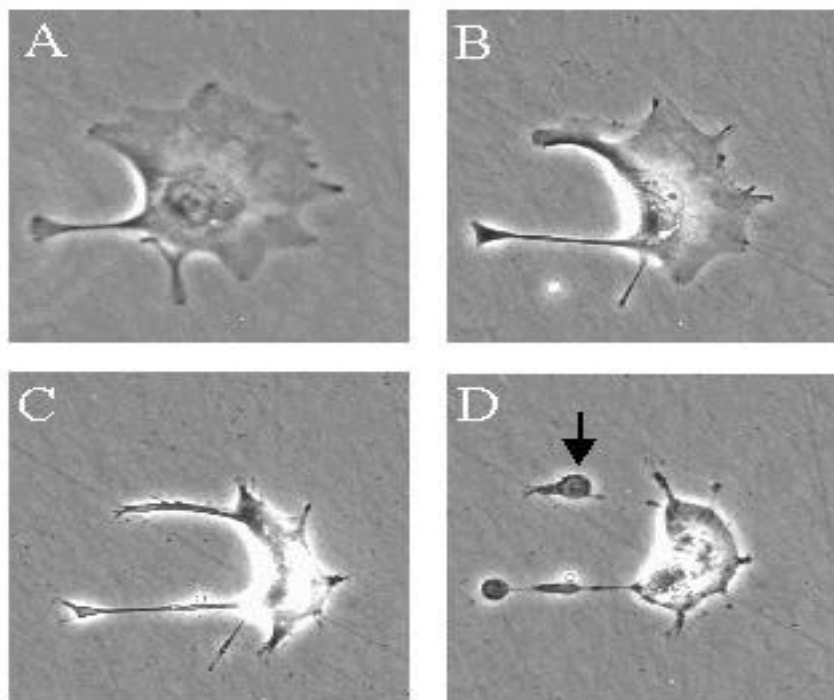


Fig. 5 Cambios morfológicos en el fenómeno de apoptosis de un trofoblasto. A: encogimiento citoplasmático. B: condensación nuclear, adquiriendo la típica morfología en herradura. C: Condensación celular progresiva. D: Formación de cuerpos apoptóticos (Flecha).

Necrosis	Apoptosis
<ul style="list-style-type: none">• Con reacción inflamatoria asociada.• Aumento del volumen celular• Ruptura celular y vertido del contenido celular (lo que induce respuesta inflamatoria).• Organelas celulares alteradas.• Hidrólisis del ADN en fragmentos heterogéneos.• Pequeños agregados de cromatina.• Conduce a la destrucción del tejido.• Causa accidental.	<ul style="list-style-type: none">• Sin reacción inflamatoria.• Disminución de volumen celular.• Fragmentación celular (formación de cuerpos de apoptosis).• Organelas celulares intactas.• Hidrólisis del ADN en fragmentos nucleosómicos.• Grandes masas heterocromáticas perinucleares.• Afecta a determinadas células de forma selectiva.• Programada genéticamente.

Tabla 1. Diferencias entre necrosis y apoptosis. Reproducido de De Castro J, González M “Cinética de la Célula tumoral” en Oncología Clínica Vol. 1, 21-34. 2º Edición.

Paradójicamente, muchas de las proteínas que estimulan el ciclo celular también son inductoras de la apoptosis, como es el caso de la proteína p53.

1.3. P53: GEN Y PROTEÍNA

La proteína p53, producto del gen del mismo nombre, fue identificada inicialmente en 1979 como resultado de dos tipos de estudios.

Por un lado, se observó que existía una proteína celular de 53 kilodaltons (kd), denominada p53, que coprecipitaba con el antígeno T mayor de las células transformadas por el virus simiano SV-40, por lo que se concluyó que p53 interactuaba con el antígeno T mayor del SV-40. Los antígenos T (tanto el menor como el mayor) eran expresados por las células transformadas y eran esenciales tanto para el comienzo como para el mantenimiento del estado de transformación (Chang et al, 1979; Kress et al, 1979; Lane et al, 1979; Linzer et al, 1979; Melero et al, 1979).

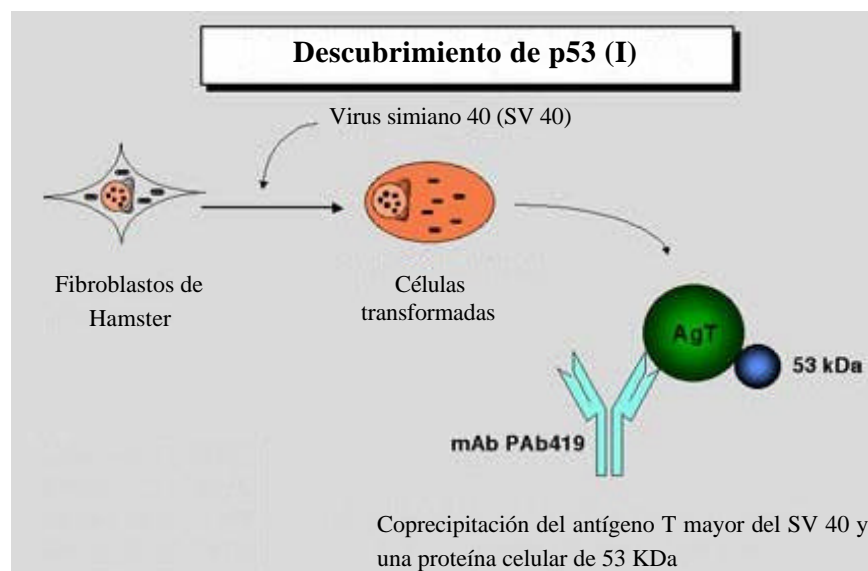


Fig. 6. Descubrimiento de p53 (I).

Por otro lado, De Leo y sus colaboradores describieron una aparente sobreexpresión de la proteína en tumores murinos inducidos químicamente por metilcolorantreno (Meth A) (De Leo et al, 1979).

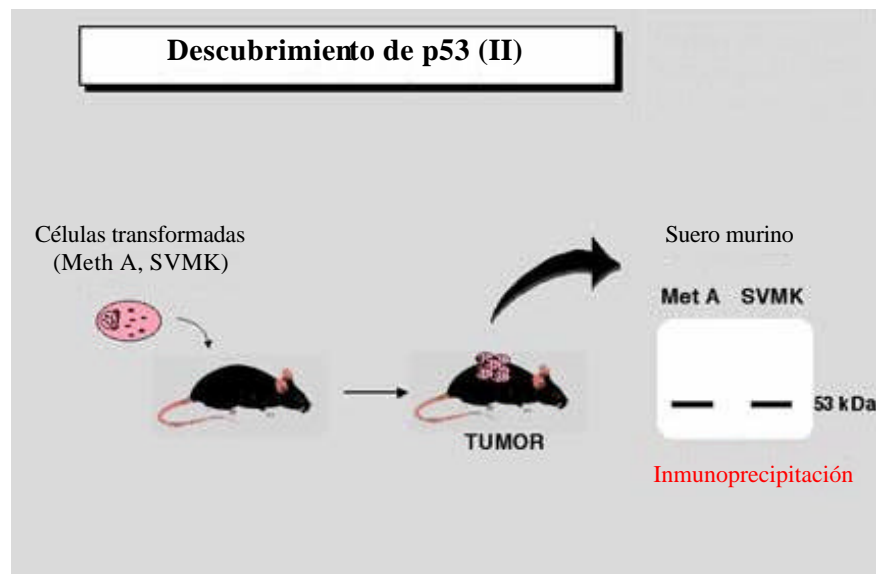


Fig. 7. Descubrimiento de p53 (II).

Además, también observaron que existían niveles altos de proteína p53 en una gran variedad de células transformadas y que este hecho sucedía independientemente de la etiología de dicha transformación, mientras que sus niveles en células sanas eran muy bajos (Kress et al, 1979; Lane et al, 1979; Linzer et al, 1979)

1.3.1. ONCOGEN ó GEN SUPRESOR

Desde 1984 varios grupos observaron como plásmidos de p53 presentaban una serie de propiedades, como la capacidad de immortalizar las células (Jenkins et al, 1984) y la de transformar los fibroblastos embrionarios de la rata en asociación con *ras* (Eliyahu et al, 1984; Parada et al, 1984). También se constató que la superexpresión de p53 confería a las células un gran tumorigenicidad (Eliyahu et al, 1985) y otro trabajo posterior observó una correlación entre la transferencia de un gen p53 clonado y el incremento de la capacidad metastatizante en tumores murinos (Phol et al, 1988). Todos estos rasgos eran similares a los que presentaban los plásmidos con sobreexpresión de *myc* y por tanto sugerían que p53 se trataba, en efecto, de un oncogen similar a *myc*.

Sin embargo, estudios posteriores descubrieron que los plásmidos empleados en los trabajos anteriores eran en realidad variantes mutadas de p53. Esto se debió a que se habían utilizado células transformadas como fuente del ARN codificante de cADN (Eliyahu et al, 1988; Finlay et al, 1988).

De forma inmediata los investigadores se formularon la pregunta lógica: ¿es también la p53 salvaje o sana oncogénica?.

La respuesta fue negativa (Eliyahu et al, 1988 y 1989; Finlay et al, 1988 y 1989). Por lo tanto, se concluyó que el potencial oncogénico sólo se adquiriría como consecuencia de una mutación, evocando un mecanismo compatible con el modelo de activación de un proto-oncogen. Estudios posteriores pusieron de manifiesto que se trata del gen más frecuentemente mutado en tumores humanos (Hollstein et al, 1994; Caron de Fromentel et al, 1992).

Pero, ¿si la p53 salvaje no era un oncogen, cuál era su función?. Esta cuestión se empezó a aclarar gracias a los trabajos de Benchimol y sus colaboradores, en los que

demostraban que las alteraciones genómicas que ocurrían en el gen p53 de las células de la eritroleucemia del ratón inducida por virus eran las responsables de la inactivación de dicho gen y que acontecían durante la progresión tumoral (Mowat et al, 1985; Chow et al, 1987). Así mismo, también se había descrito en alguna serie la pérdida de función de p53 en células de sarcomas humanos secundaria a una mutación adquirida (Masuda et al, 1987). Esto sugería que p53 se podía comportar en realidad como un gen inhibidor de la transformación o gen supresor. La demostración de esta hipótesis se obtuvo al comprobar que los plásmidos de p53 salvaje eran capaces de bloquear “in vitro” la transformación maligna provocada por oncogenes en ratas. Esta actividad inhibitoria era perdida por las células tumorales con p53 mutada (Eliyahu et al, 1989; Finlay et al, 1989).

1.3.2. ESTRUCTURA

El gen p53 está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y tiene un tamaño de aproximadamente 20 kilobases de ADN. Se compone de 11 exones, el primero de ellos no codificante (May y May, 1999), interrumpidos por 10 intrones. Tiene 5 dominios, conservados a lo largo de la evolución: el primero está en el exón 1 y los otros 4 se sitúan entre los codones 129-146, 171-179, 234-260 y 270-287, en los exones 4,5, 7 y 8 respectivamente. Es precisamente aquí dónde se producen la mayoría de las mutaciones oncogénicas.

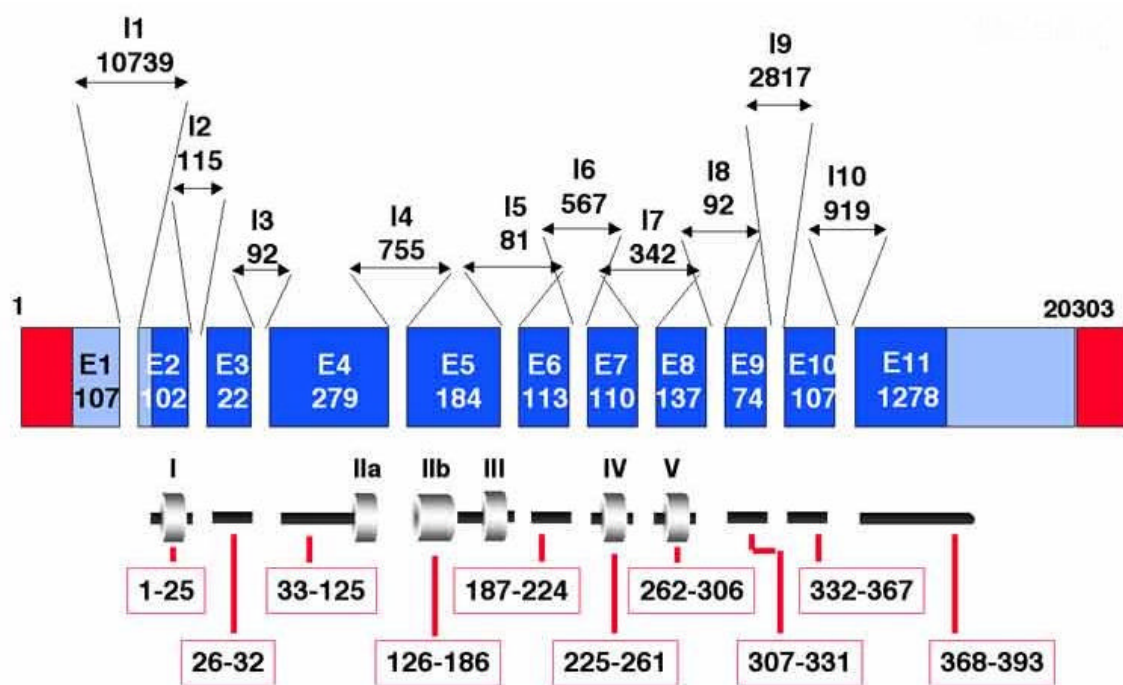


Fig. 8. Estructura del gen p53.

Su producto, la proteína nuclear p53, está compuesto por 393 aminoácidos y posee tres regiones estructurales y funcionales. Sin embargo, conviene señalar que se trata de una proteína flexible compuesta por 4 unidades idénticas y como tal es muy difícil de estudiar mediante cristalografía de rayos-X porque no forma cristales ordenados y si lo hace, las imágenes suelen ser confusas. Por ello, la proteína p53 ha sido estudiada por partes. Los dominios que han podido ser identificados se esquematizan en la siguiente figura.

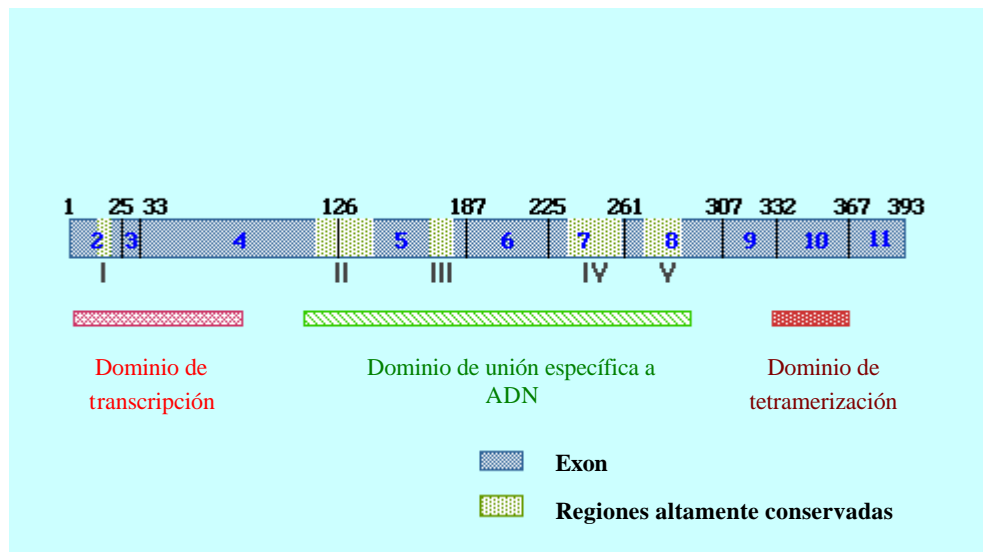


Fig. 9. Estructura organizativa de la proteína p53.

A. Extremo amino-terminal: comprende los aminoácidos 1 a 80, codificado por los exones 2-4. Es una zona ácida, con estructura hélice α . Contiene la zona de activación, el dominio transcripcional (aminoácidos 1 -42). A ella se unen la proteína transportadora de TATA ó TBP (del inglés “**T**AATA-box **B**inding **P**rotein”) y los factores asociados (TAF) a la misma. El TBP es un factor de transcripción general que se une específicamente al promotor TATA-box para la ARN polimerasa II, rico en residuos de timina y adenina.

Esta región también interactúa con el factor de replicación ADN RP-A (del inglés Replication Protein A) y la subunidad p62 del factor basal de transcripción/replicación TFIIID (del inglés “**T**ransforming **F**actor complex **IID**”).

Aquí también se unen la proteína E1B-55 kDa de adenovirus, la proteína mdm-2 humana y la proteína X del virus de la hepatitis B, los cuales actúan como inhibidores de la transactivación. De especial interés es la regulación negativa que ejerce mdm-2,

que se realiza por un doble mecanismo. Por un lado, como se acaba de reseñar, se une a la región transcripcional de p53 impidiendo así su función. Pero, por otro lado, también provoca su rápida degradación. La propia mdm-2 es activada por p53, asegurando un control por retroalimentación negativa o feedback negativo. Precisamente aquí podría residir una de las posibles explicaciones de porque la p53 salvaje o sana es más inestable que la mutada, la cual es incapaz de inducir la expresión de mdm-2. Esta regulación también podría ser determinante en la recuperación celular tras el paro del ciclo celular en G1.

Por último, también existe una región (aminoácidos 63-97) en el extremo amino-terminal rica en residuos de prolina y que parece necesaria tanto para la apoptosis mediada por p53 como para la supresión del crecimiento tumoral.

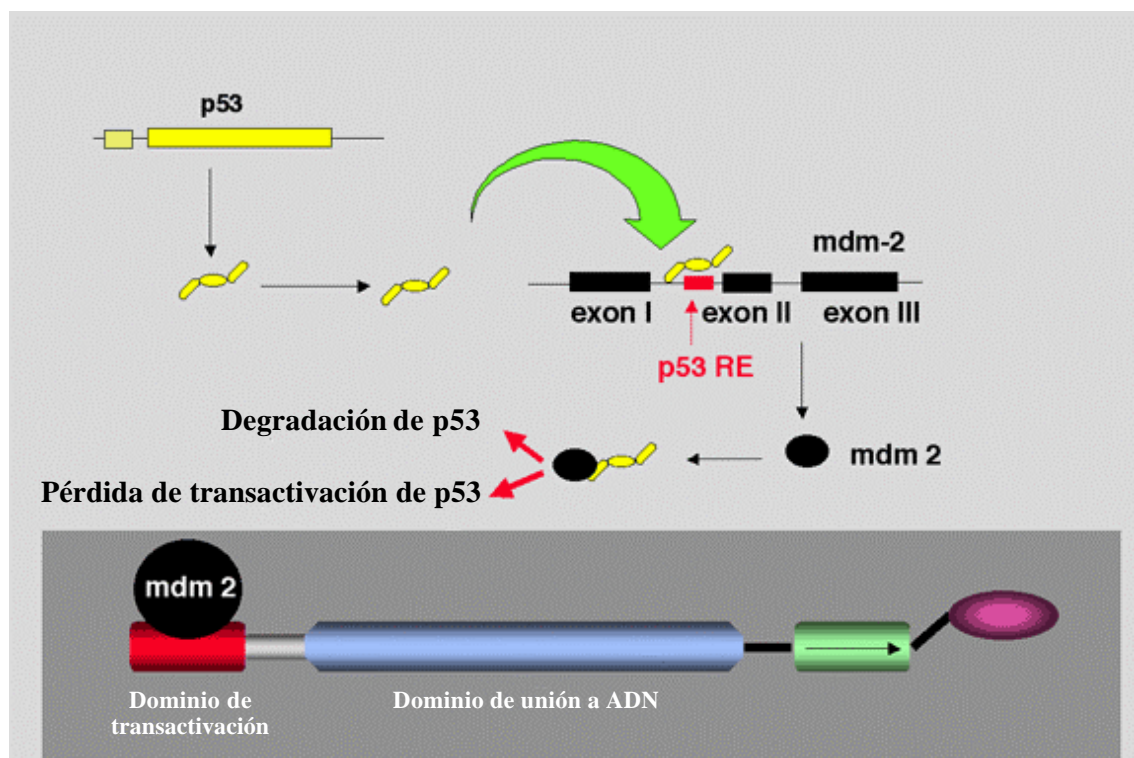


Fig. 10. Inactivación de p53 por mdm-2.

B. Región central: contiene las 4 regiones altamente conservadas a lo largo de las especies (dominios II a V). Está comprendida entre los aminoácidos 102 y 292 y es codificado por los exones 4-9. Es aquí dónde está el dominio de unión al ADN y también al antígeno mayor T del SV-40. La unión al ADN se produce a través de una secuencia de consenso (secuencia de nucleótidos característica que se asocia a la función reguladora de un gen) con una intensa simetría interna consistente en dos copias de 10 pares de bases de 5'-Pu-Pu-Pu-C(A/T)(T/A)GPiPiPi-3', siendo necesaria la integridad de ambas (Pu: base púrica, adenina o guanina; Pi: base pirimidínica, citosina o tiamina). La unión se produce en forma tetramérica (El-Deiry et al, 1992).

Es en esta región precisamente dónde se localizan del 80-90% de las mutaciones de p53. De ellas, el 50% afectan a los residuos Arg₁₇₅, Gly₂₄₅, Arg₂₄₈, Arg₂₄₉, Arg₂₇₃ y Arg₂₄₈.

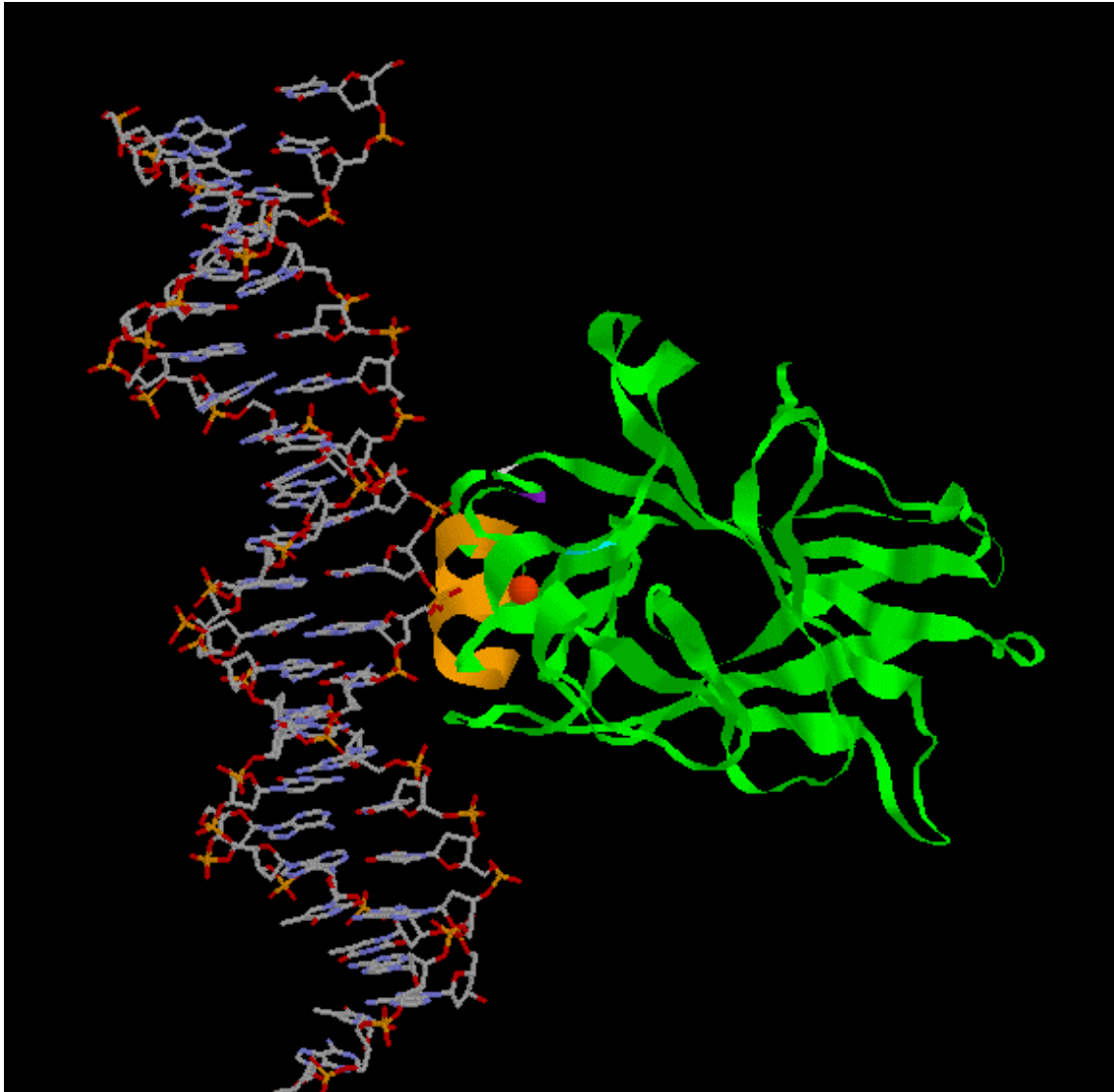


Fig. 11. Una única proteína p53 unida a una cadena de ADN a través de su dominio central (naranja). La pequeña esfera roja representa un átomo de zinc que contribuye a estabilizar la proteína.

Las mutaciones pueden ser de dos tipos.

Las mutaciones de clase I afectan a residuos que directamente contactan con el ADN e incluyen a Arg₂₄₈ y Arg₂₇₃, que son los residuos más frecuentemente mutados de p53. Los productos de esta clase de mutaciones pueden formar complejos con la p53 salvaje y podrían no interferir con su función.

Sin embargo, las mutaciones de clase II implican a residuos que no contactan directamente con el ADN pero que tiene un efecto clave en la estabilización de la estructura de la proteína y por consiguiente en su funcionalidad (residuos de Arg₁₇₅ y Gly₂₄₅, por ejemplo). Así, las mutaciones que provocan una alteración de la estructura de la proteína, ejercen un efecto negativo dominante e inhiben la función de la p53 salvaje.

En las figuras 12 y 13 se muestra el espectro mutacional de p53, tanto en la totalidad de los tumores humanos como en el cáncer de mama. Se puede comprobar como ambos son superponibles, con pequeñas diferencias porcentuales únicamente.

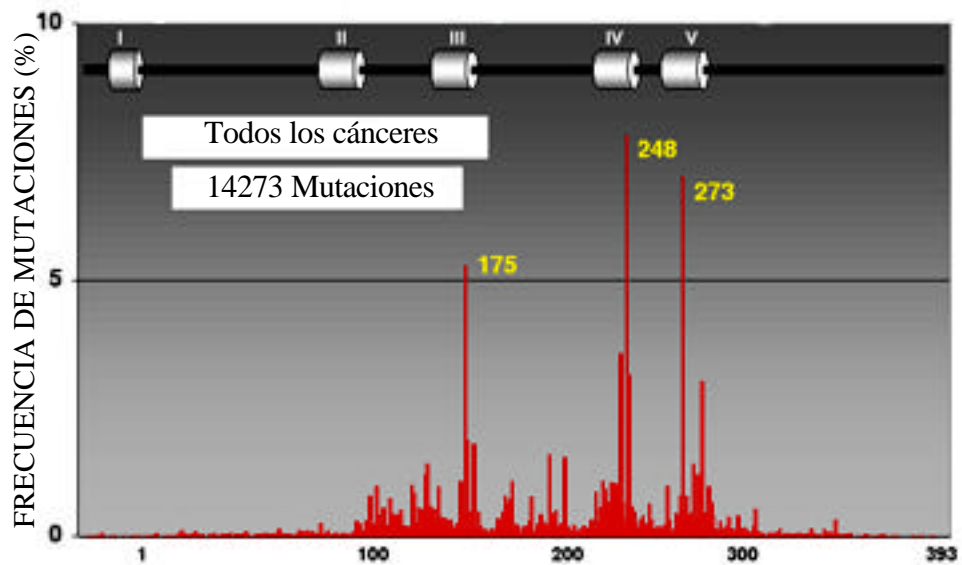


Fig 12. Espectro mutacional de p53 en todos los tumores humanos. Fuente: registro de mutaciones de p53 del IARC (International Agency for Research on Cancer) en <http://www.iarc.fr/p53> (Oliver et al, 2002). Versión R7, Septiembre de 2002.

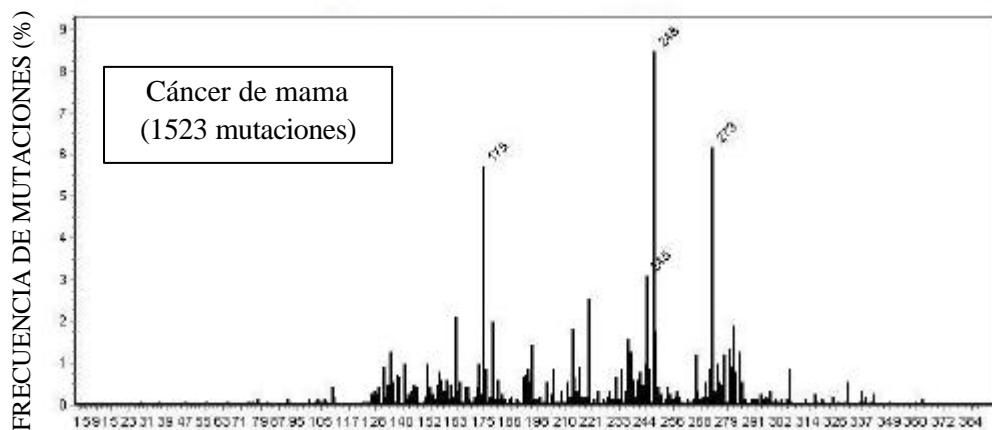


Fig 13. Espectro mutacional de p53 en el cáncer de mama. Fuente: registro de mutaciones de p53 del IARC (International Agency for Research on Cancer) en <http://www.iarc.fr/p53> (Oliver et al, 2002). Versión R7, Septiembre de 2002.

C. Extremo carboxi - terminal: comprende los residuos 300 a 393 y está codificada por los exones 9-11. Consta de tres subregiones: una región bisagra o “linker” entre el dominio central de unión inespecífica a ADN y el extremo carboxi-terminal (aminoácidos 300-318); un dominio de tetramerización (aminoácidos 323-356) y una región rica en residuos básicos (aminoácidos 363-393) adyacente, que podría actuar como un dominio apoptótico, un regulador transcripcional o un detector de daño genómico.

La proteína p53 forma tetrámeros a través del dominio de oligomerización. Esta formación de tetrámeros es necesaria para la correcta activación y función de la proteína “*in vivo*” (no así “*in vitro*”). Se ha demostrado que la proteína p53 requiere un cambio estructural para activar su unión al ADN. La forma latente de p53, que no se une al ADN, es regulada por el extremo carboxiterminal. La unión de p53 al ADN es activada por la fosforilación de los residuos 378 y 392 o por la desfosforilación del residuo 376 o la acetilación de los residuos 373 y 382 o por la delección de este dominio carboxiterminal y/o la unión del anticuerpo PAb421 a los residuos 370-378. Estos datos han llevado a postular que el extremo carboxiterminal determina la conversión de p53 entre formas inactivas y activas para su unión al ADN, regulado por un efecto alostérico (Mendoza-Rodriguez y Cerbón, 2001).

En esta región están los puntos de unión de muchas otras proteínas tales como: algunas helicasas (XPD, XPB), TBP, proteína X del virus de la hepatitis B, etc.

1.3.3. FUNCIÓN

Como ya se ha apuntado anteriormente, la proteína p53 salvaje o fisiológica tiene una serie de funciones esenciales para el correcto funcionalismo celular y que están íntimamente relacionados con su estructura tridimensional.

Esencialmente, se trata de un factor de transcripción que actúa activando o reprimiendo genes específicos que participan en la reparación, muerte celular programada o ambas (Tablas 2 y3).

Genes activados transcripcionalmente por p53		
Gen	Nombre	Función
MDM2	Oncoproteína nº 2 “Mouse Double Minute”	Gen inducible por daño al ADN y parada del crecimiento
GADD45		Gen inducible por daño al ADN y parada del crecimiento. Posible función de reparación
p21/WAF1/Cip1	Inhibidor de la replicación del ADN y de ciclina-CDK.	Regulador del ciclo celular.
Ciclina G		Detección del ciclo celular.
Bax		Inductor de apoptosis.
IGF-BP3	Proteína 3 de unión a IGF	Inhibidor de la vía de IGF
Trombospondina		Inhibidor de la angiogénesis.
FAS/Apo 1		Receptor de superficie celular. Inductor de apoptosis.
GD-AIF		Factor inhibidor de apoptosis
HIC1	Gen cancerígeno relacionado con hipermetilación	
MCK	Creatin Kinasa de Músculo	

Tabla 2. Genes activados transcripcionalmente por p53. Modificado de Núñez Domenech L, Escuín Borrás D, Barnadas Molins A “p53: gen supresor de tumores” en *Manual de Oncología Clínica y Molecular*, 109-117.

Genes reprimidos transcripcionalmente por p53		
Gen	Nombre	Función
PCNA	Antígeno nuclear de Proliferación Celular	Factor de progresividad de la ADN polimerasa.
Bcl-2		Inhibidor de apoptosis.
c-myc		Oncoproteína celular.
GFG	Factor de crecimiento de fibroblastos	
c-fos		Oncogen celular y factor de transcripción de respuesta temprana.
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 Kda	
IL-6	Interleucina 6	Promotor de la diferenciación de células B.
MDR-1	Glicoproteína 1 de resistencia a múltiples drogas	
TK (HSV)	Timidin Kinasa del Virus Herpes Simple	

Tabla 3. Genes reprimidos transcripcionalmente por p53. Modificado de Núñez Domenech L, Escuin Borrás D, Barnadas Molins A “p53: gen supresor de tumores” en *Manual de Oncología Clínica y Molecular*, 109-117.

P53 se activa en respuesta a diferentes señales genotóxicas, tales como radiaciones ultravioletas, agentes químicos y físicos, hipertermia, hipoxia, etc. Estas son sus principales funciones:

I. Detención del ciclo celular. El objetivo es tratar de reparar el daño celular. Al activarse, p53 favorece la expresión de la proteína inhibidora de ciclinas p21. Esta proteína es un potente inhibidor de los complejos ciclina D-CDK 4-6, ciclina E-CDK2 y

ciclina A-CDK1. Tal y como se ha mencionado anteriormente, estos complejos son esenciales para la hiperfosforilación de Rb, consiguiente liberación de los factores de transcripción (E2F, DP) y la progresión del ciclo celular, produciéndose así una detección del ciclo celular en G1-S (De Castro y González, 1998b). Por otra parte, se ha observado que p21 puede formar complejos con subunidades de E2F y así controlar de forma directa la actividad de esta proteína por un mecanismo diferente (Delavaine, Thangue 1999).

P21 además, es capaz de detener la síntesis y reparación del ADN en fase S a través de la inhibición de la proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), que es una subunidad de la ADN polimerasa delta.

P53 también estimula la transcripción de GADD45. El mecanismo por el cual este gen es capaz de detener el ciclo celular no es conocido completamente, pero se sabe que está asociado igualmente a PCNA.

La activación del gen de la ciclina G es también inducido por p53 y parece tener así mismo efecto en la detención del ciclo celular en G1 (May y May, 1999).

También es capaz de unirse al factor de replicación del ADN RPA (del inglés ‘**R**eplication **P**rotein **A**’), inhibiendo de esta forma la entrada de la célula en la fase S.

Pero, p53 no sólo es capaz de detener el ciclo celular en G1-S, sino que como se ha demostrado en ratones, también lo puede hacer en G2 (Cross et al, 1995).

II. Apoptosis. Existen diversos estímulos que pueden causar apoptosis dependiente de p53, tales como el daño de ADN, antígenos virales (antígeno T mayor de SV-40, E1A de adenovirus o E7 de papilomavirus), expresión ectópica de oncogenes nucleares (c-myc), pérdida de factores de crecimiento o de interleucinas, etc. (Mendoza-Rodríguez, Cerbón 2001). Sin embargo, la inducción de apoptosis también puede ocurrir por vías independientes de p53 (Lowe et al, 1993a).

Esta función la puede llevar a cabo por medio de la transcripción génica o por otra vía independiente. Esto ha sido observado en varios tipos celulares, en dónde la apoptosis

mediada por p53 ocurre en ausencia de síntesis de RNA o proteínas (Caelles et al, 1994) o en presencia de p53 con deficiente función transactivadora (Haupt et al, 1995).

Entre los genes cuya expresión es regulada por p53 y que están relacionados con la apoptosis están: IGF-BP3 (del inglés “**I**nulin-like **G**rowth **F**actor-**B**inding **P**rotein **3**”) que al ser activado por p53 codifica para una proteína que se une al factor de crecimiento IGF-1 e impide la unión a sus receptores celulares (IGFR), actuando como inhibidor de la proliferación celular y promotor de la apoptosis; bax, cuyo producto antagoniza la acción anti-apoptótica de bcl-2 ; bcl-2; PIGs o genes inducidos por p53; Fas; FasL y DR5 (del inglés Death Receptor 5 o receptor de muerte 5). Todos ellos son inducidos por p53, salvo bcl-2 que es inhibido.

Los PIGs o genes inducidos por p53 son 13 genes involucrados en el control redox los cuales en última instancia ocasionan un daño oxidativo a la mitocondria, lo que a su vez, activa la cascada de las caspasas y la apoptosis (Polyak et al, 1997).

En resumen, p53 puede activar la cadena de las caspasas vía receptores de la muerte (Fas y DR5) o por medio de la liberación de citocromo C de la mitocondria regulado por los genes inducidos por p53. P53 también puede inducir apoptosis al interferir con la vía de señales mitogénicas o de supervivencia mediadas por IGF.

Pero, ¿ qué es lo que determina que la célula detenga su progresión en el ciclo celular o entre en apoptosis?

Aunque este mecanismo no está del todo esclarecido, se sabe que existen diversos factores relevantes:

- Las células con un genoma inestable y/o en un medio extracelular pobre en factores de supervivencia o con oncogenes activos son más susceptibles de sufrir apoptosis.

- Los niveles bajos de p53 provocan la detección del ciclo celular mientras que concentraciones más altas ocasionan apoptosis.

- La extensión del daño del ADN también es determinante, a mayor extensión más respuesta apoptótica (Chen et al, 1996).

- La interrelación entre las rutas de p53 y Rb también es importante. La inactivación de Rb tendría como consecuencia la imposibilidad para la detención del ciclo celular en G1 y por consiguiente la apoptosis. La explicación podría residir en la liberación de E2F, que sobreexpresado induce apoptosis (Haupt et al, 1995).

Así mismo, se ha demostrado que ambas funciones son genéticamente independientes, ya que una p53 transcripcionalmente incompetente puede inducir apoptosis pero no detención del ciclo, mientras que la inducción de p21, que es la diana transcripcional más importante de p53, puede inducir la detención del ciclo pero no apoptosis.

También ha sido demostrado que para una respuesta apoptótica completa de p53 son necesarios tanto el extremo amino-terminal como carboxi-terminal y que existe sinergismo entre la apoptosis transcripcionalmente dependiente y la independiente (Chen et al, 1996).

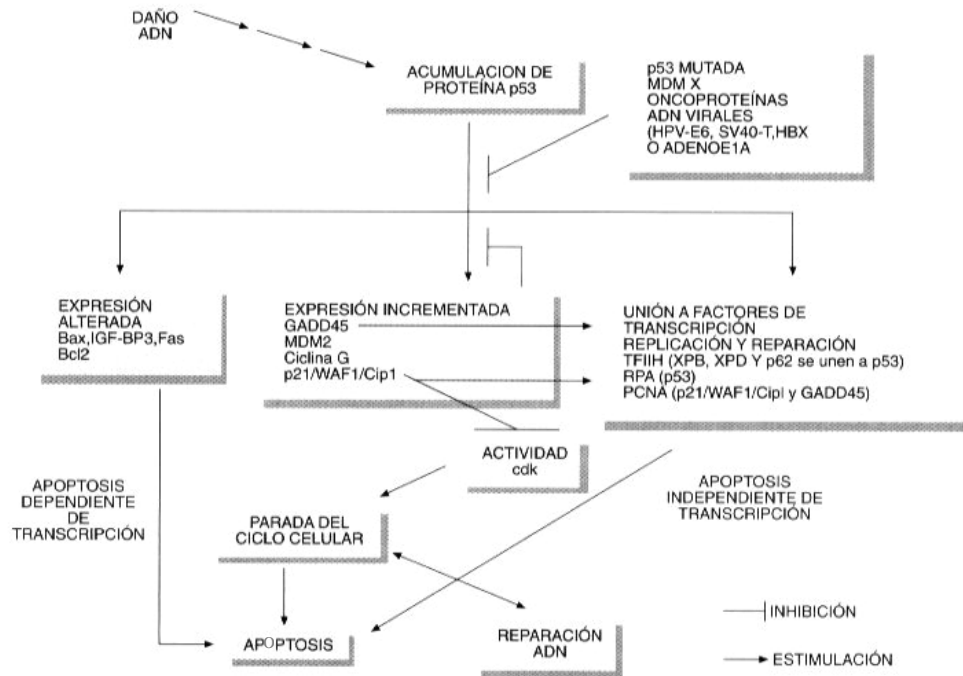


Fig. 14. Paro del ciclo celular, reparación de ADN y apoptosis inducida por daño a ADN. Reproducido de Núñez Doménech L., Escuín Borrás D, Barnadas Molins A. “p53: gen supresor de tumores” en “Oncología Clínica y Molecular”, 109-117.

III. Bloqueo de la angiogénesis. Mediante la estimulación de la producción de sustancias inhibitoras de la angiogénesis como la trombospondina-1 (Dameron et al, 1994).

IV. Unión y activación de proteínas reparadoras de las lesiones de ADN. Tales como XPD y XPB (helicadas de ADN D y B del grupo xeroderma pigmentosum) (Monzó, 1999).

IV. Promoción de la diferenciación celular.

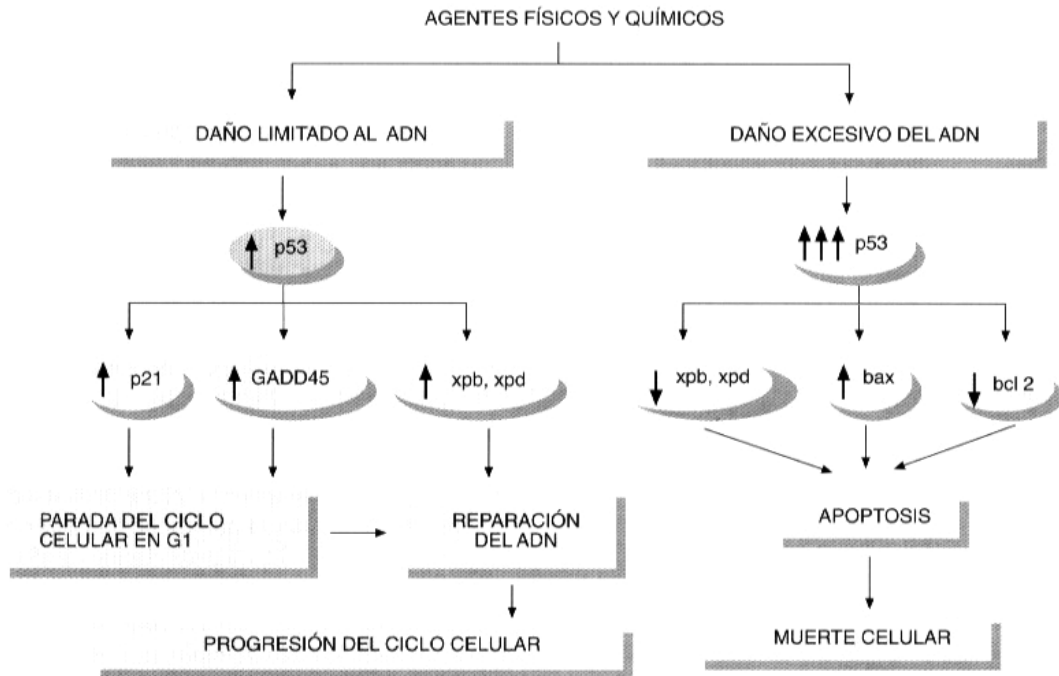


Fig. 15. Funciones de p53 dependiendo de la reparación del ADN. Reproducido de Núñez Doménech L., Escuin Borrás D, Barnadas Molins A. “p53: gen supresor de tumores” en “Oncología Clínica y Molecular”, 109-117.

EN RESUMEN, ANTE UNA LESIÓN DEL ADN, P53 INICIALMENTE PROVOCA LA DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR Y ACTIVA A LAS PROTEÍNAS REPARADORAS. SIN EMBARGO, SI EL DAÑO ES EXCESIVO O IRREPARABLE, ACTIVA LA VIA DE LA APOPTOSIS.

ES POR ELLO QUE HA SIDO DENOMINADA **“GUARDIÁN DEL GENOMA”**

Ahora bien, ¿de qué forma se regula la función de esta proteína esencial para la vida?

Los mecanismos reguladores de la función de p53 son múltiples, complejos y no bien conocidos.

Está demostrado que para que acontezca una activación óptima de p53 en respuesta a radiaciones ionizantes o fármacos radiomiméticos (como la bleomicina por ejemplo) se precisa de la proteína ATM, producto del gen ATM (mutado en la enfermedad de ataxia-telangiectasia), que actúa como una protein-kinasa fosforilando el residuo 15 de serina. Sin embargo, la vía de la apoptosis dependiente de p53 está conservada en los pacientes afectados de ataxia-telangiectasia en respuesta a radiaciones ultravioleta o inhibidores de la topoisomerasa (May y May, 1999).

Se han identificado otra serie de protein-quinasas que actúan fosforilando diversos residuos tanto en el extremo amino-terminal como en el carboxi-terminal, lo cual sería necesario tanto para activar la proteína como para facilitar su unión al ADN. La acetilación del extremo carboxi-terminal también parece clave en la incorporación de p53 al ADN (Gu, Roeder 1997). Esta unión al ADN está así mismo influenciada por el estado redox de la proteína, ya que su oxidación la inhibe y su reducción la favorece (Hainaut et al, 1993).

La inactivación de p53 se puede llevar a cabo por mutaciones o por mecanismos no relacionados, tales como el secuestro de p53 por parte de una proteína viral (antígeno-T mayor de SV-40, E1B de adenovirus, E6 del papiloma humano 16 y 18, antígeno nuclear de Epstein-Barr, antígeno X de hepatitis B) o celular. Otro mecanismo sería el denominado secuestro citoplasmático observado en ciertos tumores (neuroblastoma, por ejemplo) que provocaría la inactivación de p53 al expulsarla del núcleo. Se conoce la existencia de un transporte activo bidireccional a través de la membrana nuclear y una

región de p53, localizada en su dominio de tetramerización, que actuaría como señal de expulsión nuclear. Se ha observado que existen diferencias en la localización intracelular de la proteína salvaje bajo condiciones de crecimiento normales, lo que sugiere que este mecanismo de control podría estar regulado por el propio ciclo celular (Stommel et al, 1999).

Por último, recordar el ya comentado mecanismo de retroalimentación o feedback negativo ejercido por MDM-2, a través del cual se produce tanto el bloqueo de la acción de p53 como su rápida degradación. MDM-2 también está implicada en la expulsión de p53 del núcleo.

1.4. ALTERACIONES GÉNICAS DE P53

1.4.1. MUTACIONES DE P53

Como ya se ha comentado, p53 es el gen más frecuentemente mutado en tumores humanos.

Se han descrito mutaciones en más de 51 tipos de cánceres correspondientes a diferentes tejidos del cuerpo humano tales como cerebro, cervix, colon, esófago, estómago, hígado, laringe, mama, ovario, páncreas, piel, próstata, pulmón, tiroides, vejiga, etc.

De los tumores más comunes, aproximadamente un 60-70% de los carcinomas colorrectales, un 50-70% de los pulmonares y un 20-40% de los de mama portan mutaciones en p53. Así mismo, este gen está ligado a neoplasias sanguíneas y de los ganglios linfáticos tales como la enfermedad de Hodgkin, el linfoma de células T y ciertos tipos de leucemias (Gómez, González 1998).

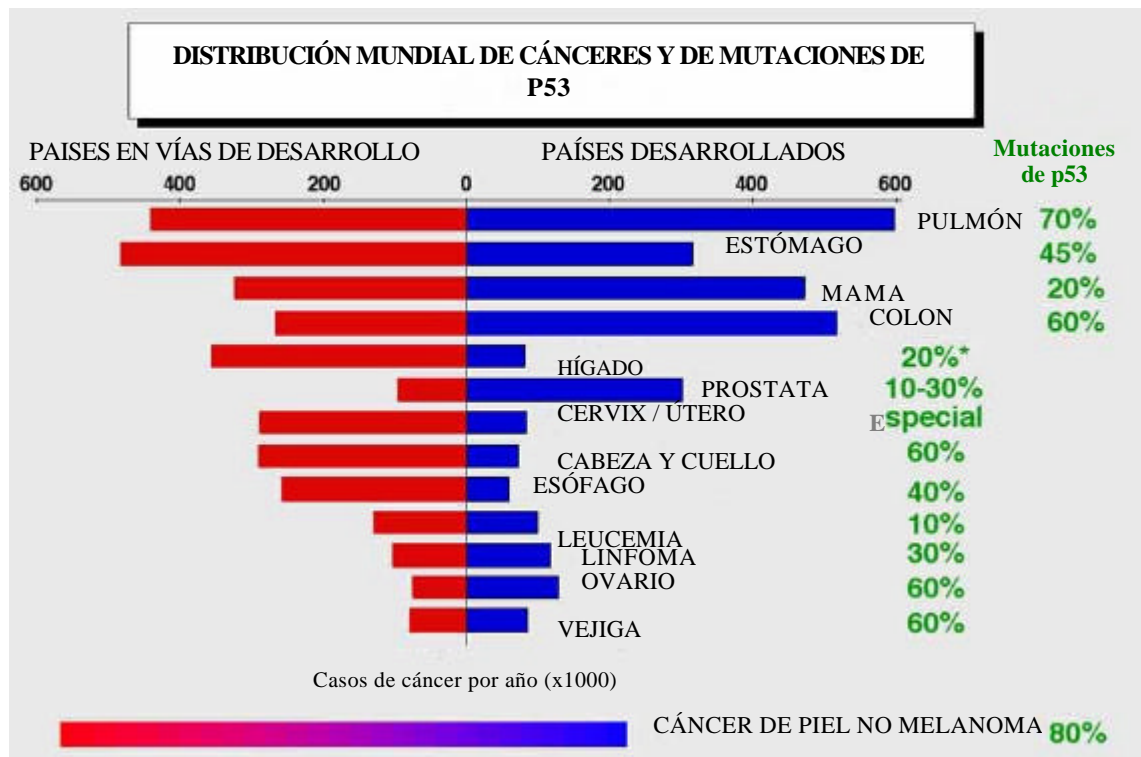


Gráfico 1. Frecuencia de mutaciones de p53 según el tipo de cáncer.

Existen fundamentalmente dos tipos de eventos mutagénicos que pueden afectar al ADN:

-Externos o exógenos: factores que afectan al medio ambiente extracelular. En este caso, el agente mutágeno determina la naturaleza de la lesión (formación de dímeros de timina tras la exposición a radiación ultravioleta, por ejemplo).

-Internos o endógenos: son espontáneos e implican errores de replicación, depurinización, etc. (Soussi et al, 1994).

Globalmente, el tipo más frecuente de mutación genética es la mutación puntual, que supone un cambio de una base nitrogenada por otra, o bien la inserción o la delección de una base nitrogenada. Estas, a su vez, pueden ser de distintos tipos:

-Transiciones: cuando se produce el cambio de una base púrica por otra púrica o el de una pirimidínica por otra pirimidínica.

-Transversiones: cambio de una base púrica por una pirimidínica o viceversa.

-Inserciones o delecciones (frameshift): inclusión o pérdida de un base, con la consecuencia de cambio de la pauta de lectura del código genético.

Los efectos de un mutación puntual en el fenotipo celular pueden ser muy diversos. Podría tratarse de una mutación de sentido diferente o “missense” (cambio de un aminoácido por otro) cuyo efecto en la proteína podría ser: no detectable (mutación nula o silenciosa), pérdida parcial de la función, ganancia de función, alteración de la función, cambio en la estabilidad o pérdida total de la función.

El efecto de la mutación en relación con su función más frecuentemente observado es el efecto dominante negativo. La p53 mutada puede unirse a otras p53 salvajes formando tetrameros, los cuales difieren de los formados por la p53 salvaje en que inhiben al unión al ADN y por consiguiente son afuncionales. Estas mutaciones no conllevan una capacidad oncogénica directa, pero sí una pérdida de la capacidad de control tumoral; es decir, precisan de la acción de otros oncogenes para desarrollar un tumor (Michalovitz et al, 1991; Nuñez et al, 2000).

También podría tratarse de una mutación sin sentido “nonsense” (cambio de un aminoácido por un codón de paro en la síntesis de la proteína) cuyo efecto sería el de paro de síntesis (Monzó, 2000).

Como ya se ha comentado con anterioridad, inicialmente se creía que prácticamente todas las mutaciones de p53 ocurrían en los exones 5-9, en los llamados punto calientes o “hot spots”, pero hoy en día ya se sabe que hasta un 10-15% ocurren en otras regiones. Además, mientras las mutaciones en los exones 5-8 suelen ser de tipo “missense”, las mutaciones que acontecen fuera de ellos son con mayor frecuencia de tipo “nonsense” o “frameshift”.

Estas serían las frecuencias aproximadas de aparición de las mutaciones de p53: mutaciones de sentido diferente (missense) (86%), deleciones / inserciones (8%), mutaciones sin sentido (nonsense) (5%) y mutaciones silenciosas (1%).

El espectro de mutaciones es diferente en función del tipo de tumor. Las **mutaciones missense**, las cuales constituyen el cambio genético más frecuente en tumores humanos, afectan a múltiples tipos de tumores, fundamentalmente a carcinomas colorrectales, de pulmón, de esófago, de estómago, de hígado, de mama y de vejiga. Cada uno, sin embargo, presenta un patrón de mayor frecuencia de transiciones o transversiones. Así, por ejemplo, la transversión GC>TA es muy característica de los hepatocarcinomas asociados a aflotoxina e infección crónica por virus de hepatitis B, sin embargo es excepcional en el carcinoma de colon o en el linfoma de Burkitt (Soussi et al, 1994).

Las **mutaciones nonsense** se encuentran en el 5% de cáncer de pulmón, de esófago y otros.

Las **reordenaciones génicas** se asocian frecuentemente con osteosarcomas, sarcomas de partes blandas, linfomas y leucemias mielogénicas crónicas.

Las **pérdidas alélicas** son un acontecimiento ocasional en diferentes tumores, tales como el colorrectal, de mama, de esófago, linfomas y osteosarcomas.

Aunque de forma mucho más excepcional, las mutaciones también pueden afectar a la línea germinal. Estas se han identificado en pacientes afectos del Síndrome de LiFraumeni (trastorno con patrón de herencia autosómica dominante y que predispone a

padecer diversos tumores), pero también en algunas familias sin los criterios completos de tal síndrome y con predisposición a diferentes cánceres primarios múltiples de presentación precoz, tales como tumores cerebrales multifocales, sarcomas de la infancia y sobre todo, carcinomas de corteza suprarrenal en la infancia (Malkin et al, 1992).

La definición clínica de Síndrome de LiFraumeni reúne los siguientes criterios: Sarcoma diagnosticado antes de los 45 años y un familiar de primer grado con cáncer antes de los 45 años o un familiar de segundo grado con sarcoma diagnosticado a cualquier edad o cualquier cáncer antes de los 45 años. No se han detectado mutaciones de p53 en la línea germinal en una serie de familias con Síndrome de LiFraumeni, lo que sugiere la implicación de otros genes.

El espectro mutacional de p53 en la línea germinal es similar al de las mutaciones somáticas en los cánceres esporádicos y tienden a producirse en los exones 5 a 9.

1.4.2 CONSECUENCIAS DE LAS MUTACIONES

A) Generales

Las consecuencias que se derivan de las mutaciones de p53 parecen obvias:

- ❑ Imposibilidad para la apoptosis dependiente de p53 y pérdida del control celular.
- ❑ Posibilidad de génesis de un elevado número de tumores.
- ❑ Curso evolutivo tumoral con capacidad de progresión hacia formas de mayor grado de malignidad y de recurrencia, ya identificado en algunas neoplasias, tales como astrocitomas grado II (Sidransky et al, 1992), tumores de colon

(Rosen et al, 1997), carcinomas de cabeza y cuello y pulmón (Califano, Sidransky 1999) y los tumores mamarios (Dickson, Lippman 1997).

- Mayor capacidad metastatizante. La capacidad angiogénica es clave para el desarrollo de metástasis (Folkman, 1995). Por lo tanto, la pérdida de la capacidad antiangiogénica mediada por la trombospondina-1, podría posibilitar una más fácil diseminación del tumor.

- Se ha comunicado una aparente mayor resistencia de la neoplasia a la quimioterapia, hormonoterapia y radioterapia, que sería debida, en parte, a que estas estrategias terapéuticas intentan inducir muerte celular programada, la cual se vería seriamente comprometida con la pérdida de función de p53 (Lowe et al, 1993b; Hamada et al, 1996; Berns et al, 1997). No obstante, como se comentará más adelante, es preciso seguir realizando estudios para definir el papel exacto de los diferentes marcadores biológicos en este sentido.

- Por todo lo anterior, es un factor independiente reconocido de mal pronóstico y menor supervivencia a los 5 años (Thor et al, 1992; Starzynska et al, 1992; Bradford et al, 1997; Jones et al, 1997; Wolf et al, 2001).

Por otra parte, en las células sanas los niveles de p53 son tan extremadamente bajos que son prácticamente indetectables. Esto es debido a que la proteína es rápidamente degradada tras su síntesis, fenómeno en el que juega un papel determinante la mdm-2, por lo que tiene una vida media de menos de 20 minutos (Lacal, 1999).

Sin embargo, el resultado de una mutación puntual de p53 suele acarrear un cambio de conformación y un incremento en su estabilidad. Como consecuencia se produce un acúmulo intracelular de la proteína y la posibilidad de ser detectado por

inmunohistoquímica (Soussi et al, 1994). Esta técnica se basa en el empleo de anticuerpos contra antígenos específicos o porciones de ellos (epitopo), mayormente de naturaleza proteica, asociados a células ya sea en secciones tisulares (depositadas en porta-objetos de microscopio óptico) ya sea en suspensión o tras la disgregación de sólidos. En el primer caso, la unión de los anticuerpos a las células es valorada al microscopio, por lo general mediante un procedimiento indirecto, utilizando anticuerpos marcados con moléculas fluorescentes o con enzimas.

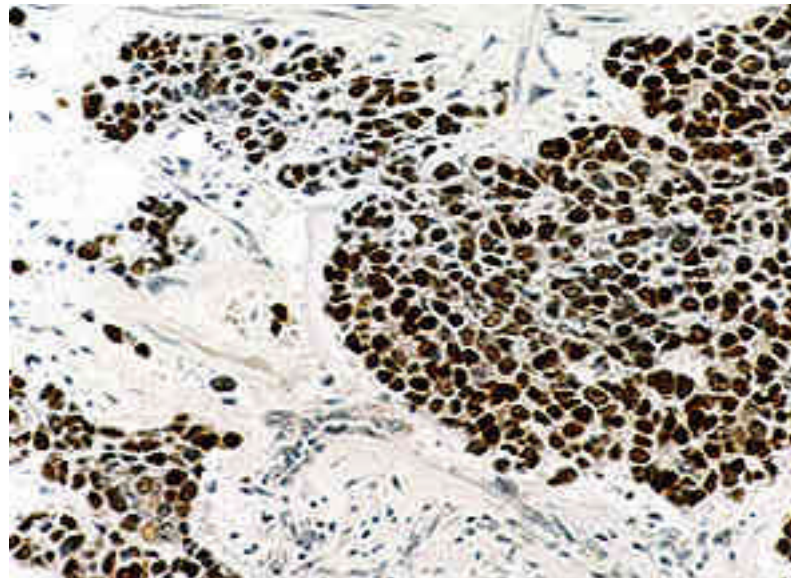


Fig. 16. Tinción inmunohistoquímica de la proteína p53 en un ganglio linfático axilar infiltrado por una carcinoma de mama. Sección en parafina.

En el caso de las células en suspensión, la expresión del antígeno es medida usando citometría de flujo, que cuenta el número de células que se han hecho fluorescentes por anticuerpos marcados directa o indirectamente (Skar, Costa 1997).

Aunque parece haber una buena correlación entre la mutación de p53 y la acumulación de la misma, esto está sujeto a varias matizaciones:

- a) No todas las mutaciones se traducen en un resultado positivo por inmunohistoquímica. Sí que existe una fuerte correlación entre las mutaciones “missense” que afectan a los exones 5-9 y su detección por inmunohistoquímica. Sin embargo, esto no se ha observado así en las mutaciones del tipo “non-sense”, “frameshift”, deleciones o inserciones o en las mutaciones tipo “missense” situadas fuera de los exones 5-9. Esto podría ser debido a que el producto de este tipo de mutaciones es una proteína truncada e inestable que no puede ser detectada por inmunohistoquímica al tratarse de células con mutaciones en las secuencias de ARN y que por consiguiente no pueden transcribirse correctamente (Soussi et al, 1994). Este hecho ya ha sido comunicado en cáncer de pulmón, ovario y mama (Bodner et al, 1992; Casey et al, 1996). Las mutaciones de este tipo se estima que acontecen en menos del 15% del total (Soussi et al, 1994).

Así mismo, la p53 salvaje parece tener una influencia en la estabilización de la proteína en las células con mutaciones en la misma, ya que se han identificado algunos tumores que aún teniendo una determinada mutación tipo missense no son detectables por inmunohistoquímica. En estos tumores se puede identificar un alelo de p53 salvaje. Sin embargo, existían otros tumores con positividad inmunohistoquímica portadores del mismo tipo de mutación, pero en este caso carentes del alelo de p53 salvaje (Casey et al, 1996).

- b) Una positividad inmunohistoquímica no siempre es la consecuencia de una mutación. Se ha observado un intenso acúmulo citoplasmático de p53, con escasísima positividad nuclear, en pacientes con cáncer de mama cuya secuenciación de ADN mostraba p53 salvaje, carente de mutación alguna. De aquí se deduce que ciertos tipos de tumores podrían inactivar a p53 a través de un secuestro citoplasmático, alejándola de su lugar de acción en el núcleo celular, pero sin necesidad de estar mutada. De la misma forma, también se observó una intensa positividad citoplasmática en tejido mamario sano de mujeres que están en la lactancia, lo que sugiere un mecanismo empleado en algunas situaciones fisiológicas específicas con el fin de permitir una proliferación celular transitoria (Moll et al, 1992). En efecto, este mecanismo puede explicar, por lo menos en parte, la discrepancia observada en los tumores mama entre la positividad por inmunohistoquímica, que va de un 20% a un 62% según las series (Thor et al, 1992; Allred et al, 1993; Poller et al, 1993; Isola et al, 1992; Lipponen et al, 1993, Bartek et al, 1990; Davidoff et al, 1991; Horak et al, 1991; Ostrowski et al, 1991) y el porcentaje de detección de mutaciones por secuenciación de ADN, que es sustancialmente menor y que oscila entre el 15% y el 35% según las series (Coles et, 1992; Kovach et al, 1991; Thorlacius et al, 1993; Andersen et al, 1993; Osborne et al, 1991).

No es ésta la única situación fisiológica en la que se ha demostrado un acúmulo de p53. Tras la exposición de piel sana a dosis de radiaciones ultravioleta capaces de provocar una quemadura solar moderada se detecta por inmunohistoquímica un incremento de los niveles de p53 a las 2 horas, con un pico a las 24 horas, tornándose nuevamente indetectables a las 360 horas. En este caso, el incremento transitorio de los niveles de p53 se produce ante un estímulo genotóxico y se trata de una p53 salvaje (Hall et al, 1993).

Igualmente, se han detectado patrones inmunohistoquímicos positivos similares en ciertas patologías cutáneas benignas, tales como nevus melanocíticos o psoriasis (Eeles et al, 1993).

- c) Existen diferentes patrones de positividad inmunohistoquímica según el tipo de anticuerpo monoclonal empleado. El anticuerpo empleado debe reunir una serie de características como alta especificidad, ausencia de reacción cruzada con otras proteínas celulares y una elevada afinidad por el antígeno independientemente del método de fijación tisular empleado. La técnica sobre tejido fresco congelado no plantea excesivos problemas, pero normalmente las muestras suelen estar preparadas para su examen histológico convencional, es decir, fijadas y embebidas en parafina. En estos casos, la desparafinización previa necesaria para realizar la inmunohistoquímica, puede destruir la integridad antigénica. Por este motivo, no es apropiado el empleo de ciertos anticuerpos como PAb122 o PAb1801 para analizar muestras fijadas en parafina; sí se pueden y se deben emplear otros, tales como DO1, DO7 y HR231. Además, la sensibilidad y especificidad de cada anticuerpo no es la misma. Por ello, una estrategia para aumentar la potencia de la técnica es la de emplear de forma simultánea varios anticuerpos capaces de reconocer diversos epitopos de la proteína: DO1 ó DO7 que reaccionan con el extremo amino-terminal junto con HR231 ó PAb122 que lo hacen con el extremo carboxi-terminal (Soussi et al, 1994). Con todo, la técnica de inmunohistoquímica (empleando únicamente DO7) ha sido validada como un método fiable para la detección de mutaciones de p53 en cáncer de mama (Bartley, Ross 2002).

Teniendo presentes todas estas consideraciones, sin embargo, se pueden resumir y esquematizar de la siguiente manera las diferencias entre p53 sana y salvaje:

<i>P53 SALVAJE</i>	<i>P53 MUTADA</i>
VIDA MEDIA CORTA (MINUTOS)	VIDA MEDIA LARGA (HORAS-DÍAS)
SIN ACÚMULO INTRACELULAR	SE ACUMULA
CONCENTRACIÓN INTRACELULAR INDETECTABLE	DETECTABLE MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA
AUSENCIA DE PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA	ES PRESENTADA POR EL MHC, TANTO LA SECUENCIA MUTADA (TUMOR ESPECÍFICA) COMO LA NO MUTADA (TUMOR ASOCIADA)

Tabla 4. Diferencias entre la proteína p53 sana y la mutada. MHC: Sistema Mayor de Histocompatibilidad.

B) Cáncer de mama

Las consecuencias de una mutación de p53 en pacientes con cáncer de mama son esencialmente las mismas que para el resto de tumores, pero presentan una serie de particularidades que se enumeran brevemente a continuación:

- Mayor posibilidad de evolución de un carcinoma in situ a un infiltrante (Poller et al, 1993).

- Relación estadísticamente significativa entre el acúmulo de p53 y el estado de receptores hormonales negativo, hecho este desfavorable para las pacientes con cáncer de mama y que según la Conferencia de Consenso Internacional sobre el tratamiento primario del cáncer de mama (21-24 Febrero, 2001. St. Gallen, Holanda) convierte a una paciente sin afectación axilar en una paciente de moderado-alto riesgo (Thor et al, 1992).

- Relación estadísticamente significativa entre el alto grado nuclear y acúmulo de p53 (Thor et al, 1992).

- Factor independiente de menor supervivencia global y libre de metástasis (Thor et al, 1992). En pacientes sin afectación axilar la supervivencia global a los 8 años es de un 56% en aquellas pacientes cuyos tumores presentan acúmulo de p53 frente a un 81% en aquellos que no lo hacen (Isola et al, 1992). De forma análoga, también se ha observado una menor supervivencia libre de enfermedad en el cáncer de mama del varón con acúmulo de p53 (Wang-Rodriguez et al, 202).

- Frecuente asociación a la sobreexpresión de proteína c-erbB-2, que parece tratarse un factor predictivo de resistencia al tratamiento hormonal y citotóxico. (Isola et al, 1992; Tetu et al, 1998; Hamilton et al, 2000).

- Se ha visto relacionado con una mayor expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico, factor angiogénico de mal pronóstico (Horak et al, 1991).

- Asociación a tumores de mayor tamaño (más de un centímetro) y afectación axilar al diagnóstico (Andersen et al, 1993).

- Han sido muchos los trabajos que han intentado definir exactamente el papel que juega p53 en la resistencia a los tratamientos oncológicos, con resultados dispares. Un estudio europeo no encontró buena correlación entre la expresión de p53 y la respuesta al tratamiento con doxorubicina y paclitaxel empleados en monoterapia en pacientes con cáncer de mama metastásico (Hamilton et al, 2000). Del mismo modo, otro estudio encontró que el beneficio, en términos de supervivencia, que proporciona la quimioterapia adyuvante tipo CMF (ciclofosfamida, metotrexate y 5-Fluorouracilo) es independiente del estado de p53 (Dublin EA et al, 1997).

Otro estudio aleatorizado llevado a cabo en 1716 pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama con receptores hormonales positivos y sobre expresión de p53, HER2 y el factor de crecimiento epidérmico valoró el tratamiento adyuvante con tamoxifeno. El objetivo principal era la supervivencia libre de enfermedad. El resultado fue que estas pacientes se beneficiaban del tratamiento hormonal y que por consiguiente la sobre expresión de los mencionados marcadores tumorales no podía de ninguna manera contraindicar el tratamiento adyuvante con tamoxifeno (Knoop et al, 2001). De forma análoga, otro estudio que valoró el tratamiento adyuvante con tamoxifeno tanto en pacientes premenopáusicas como posmenopáusicas, demostró que el beneficio del tratamiento hormonal en pacientes con tumores con receptores hormonales positivos no depende del estado de p53 (ni tampoco de Her-2-neu) (Berry et al, 2000).

Existen también, sin embargo, otra serie de estudios que apoyan la hipótesis de la quimio, hormono y radioresistencia asociada a acúmulo de p53 (Aas et al, 1996; Tetu et al, 1998; Clashen et al, 1998; Mottolese et al, 2000).

Con todo y tras revisar la literatura, se puede concluir que hoy por hoy no existe una adecuada evidencia que apoye el empleo de la sobreexpresión de p53 en tumores de mama para seleccionar la estrategia terapéutica, ya sea hormonal, quimioterápica o radioterápica (Hamilton y Piccart, 2000).

1.5. ESTRATEGIAS TERAPEÚTICAS BASADAS EN P53

Pero, ¿Cómo aprovechar los conocimientos adquiridos a cerca de esta proteína vital para el control celular y que llegó a ser designada como “molécula del año” en 1993?

Dado que es una mutación en el gen la que parece estar implicada en la génesis, mantenimiento y progresión de la neoplasia, la aproximación terapéutica más investigada ha sido el intento de reemplazar dicho gen mutado por una copia salvaje sana.

En los primeros estudios preclínicos, se empleó la transferencia mediada por plásmidos de p53 y se observó una reducción del número de colonias con mutaciones de p53 (Barker et al, 1990; Casey et al, 1991). Posteriormente se observaron respuestas objetivas (con reducción del volumen tumoral medido por TC y descensos significativos de la alfa-fetoproteína) en pacientes con hepatocarcinoma a los que se les inyectaron plásmidos de p53 en la arteria hepática (Habib et al, 1996).

Otra estrategia empleada ha sido la del empleo de retrovirus conteniendo ADNc de p53. En el primer ensayo clínico llevado a cabo en pacientes con cáncer no microcítico de pulmón en los cuales se empleo la inyección directa intratumoral de un vector de retrovirus conteniendo el gen 53 salvaje, se observó que el 66% de los pacientes presentaban apoptosis, la mitad de los cuales presentó además regresión tumoral. La tolerancia al tratamiento fue buena (Roth et al, 1996a).

Sin embargo, en un intento de mejorar la eficiencia de la transferencia génica, se empezaron a emplear adenovirus recombinantes conteniendo ADNc de p53. Se demostró en varios tipos de células tumorales (mama, próstata, ovario, páncreas, neuroblastoma,...) que las células infectadas de esta forma presentan una detención del

ciclo celular y que además estos vectores son más citotóxicos en las células que expresan una mutación de p53, mientras que las células normales son generalmente resistentes a los dichos efectos (Katayose et al, 1995).

Existen ya numerosos trabajos en fase clínica que han demostrado que este tipo de tratamiento es seguro y aplicable. En cuanto a la efectividad, también se han comunicado respuestas discretas en pacientes con cáncer no microcítico de pulmón, cabeza y cuello, vejiga, próstata y mama.

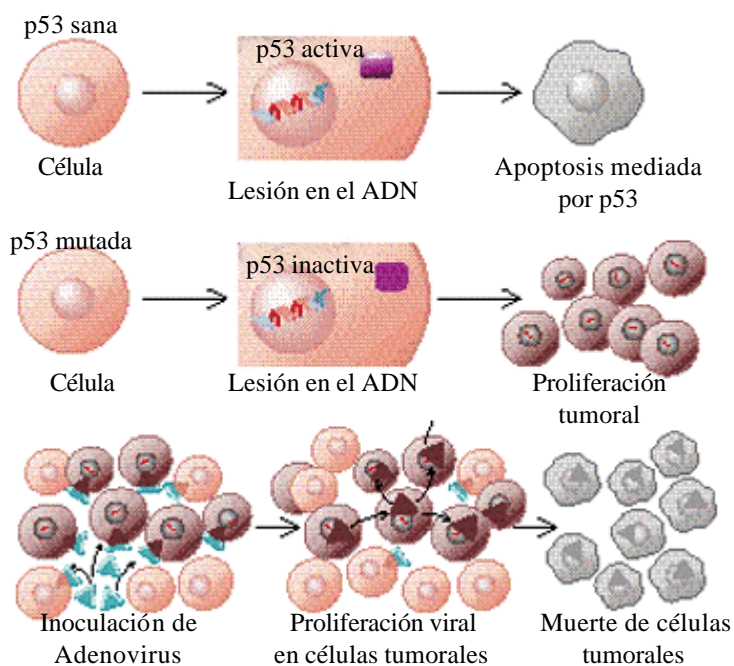


Fig. 17 Terapia génica mediante adenovirus recombinates conteniendo ADN de p53.

El principal inconveniente parece ser el que la capacidad infectiva de los adenovirus mediante inyección intratumoral directa sólo afectaría a un 5-10% de todas las células y que fundamentalmente tendría aplicación a nivel del control de la enfermedad a nivel locoregional.

Del mismo modo, se ha demostrado en cáncer de mama, pulmón y colón, que las células infectadas son más quimio y radiosensibles con un asumible perfil de toxicidad (Seth et al, 1997; Roth et al, 1996a; Nemunaitis et al, 1999; Spitz et al, 1996; Kuball et al, 2002; Clayman et al, 1998).

Otra línea de investigación emplea los adenovirus selectivos de replicación ONYX-015, que son defectivos en E1B. Parece ser que estos adenovirus podrían infectar selectivamente las células defectivas en p53 sana, induciendo en ellas apoptosis. Se han empleado ya en hepatocarcinomas, tumores de cabeza y cuello, colorrectales con metástasis hepáticas, metástasis pulmonares de tumores sólidos, páncreas y otros. Se ha comprobado que la terapia es bien tolerada ya sea vía intratumoral, intraperitoneal, intraarterial o intravenosa. La efectividad es modesta, con tasas de regresión tumoral de 0-14%, aunque con un posible sinergismo con la quimio y radioterapia (Kim, 2001).

Aunque todavía los resultados de todas estas investigaciones de viroterapia son muy modestos, existe un gran interés por parte de los científicos por seguir ahondando en este campo y hay muchos ensayos en marcha, por lo que es esperable que en los próximos años se conozcan novedades importantes.

Por último, existe otra línea de investigación basada en p53 y que es la inmunoterapia, la cual será analizada en los próximos capítulos.

1.6. INMUNOLOGÍA DE P53

1.6.1. INMUNIDAD HUMORAL: ANTICUERPOS ANTI-P53

Ya en 1979, De Leo demostró en animales que la respuesta humoral en tumores inducidos por metilcolantreno como el MethA era dirigida contra p53 (De Leo et al, 1979) y mientras que otros autores la describieron en pacientes con tumores del SV40 (Melero et al, 1979; Kress et al, 1979).

Crawford fue el primero en describir la existencia de anticuerpos contra p53 humana en el 9% de los pacientes con cáncer de mama (Crawford et al, 1982) y posteriormente Caron de Fromentel hizo lo propio en niños con una gran variedad de cánceres (linfomas B sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcomas, etc.), con una media del 12% pero alcanzando hasta el 20% en el linfoma Burkitt (Caron de Fromentel et al, 1987).

1.6.1.1. Detección de anticuerpos

Los primeros trabajos emplearon la inmunoprecipitación o el análisis de Western blot y posteriormente la técnica de ELISA.

1.6.1.2. Anticuerpos anti-p53 y frecuencia de mutación

Se ha demostrado que los anticuerpos anti-p53 son un marcador específico de neoplasia y que existe una buena correlación entre los mismos y las mutaciones de p53. De ese modo, los pacientes con tumores con altas tasas de mutaciones de p53 también presentan una elevada frecuencia de anticuerpos específicos, con la única excepción de los gliomas. Estos últimos, presentan mutaciones de p53 en el 40% de las ocasiones, pero no expresan anticuerpos (Rainov et al, 1995). Una posible explicación de este comportamiento sería que el cerebro es un órgano con cierto privilegio inmunitario que

no permite el desarrollo de una respuesta humoral. También podría ser que exista una insuficiente presentación antigénica en el supuesto caso de que p53 no pueda atravesar la barrera hematoencefálica. Es posible también que exista cierta inmunosupresión yatrógena, ya que la mayoría de estos pacientes son habitualmente tratados con dexametasona. En el extremo opuesto están, junto con los controles sanos, los tumores testiculares, melanomas y hepatomas, los cuales no presentan mutaciones en p53 y por tanto tampoco desarrollan una respuesta humoral específica, por lo que estos pacientes no presentan anticuerpos anti-p53. (Soussi T ,2000; Fleischhacker et al, 1994; Lubbe et al, 1994).

1.6.1.3. Relación entre los anticuerpos anti-p53, mutaciones de p53 y acúmulo de p53.

Se sabe que sólo el 20-40% de los pacientes que presentan mutaciones de p53 tiene además anticuerpos anti-p53 en su suero y que la acumulación de la proteína es clave en el desarrollo de los mismos.

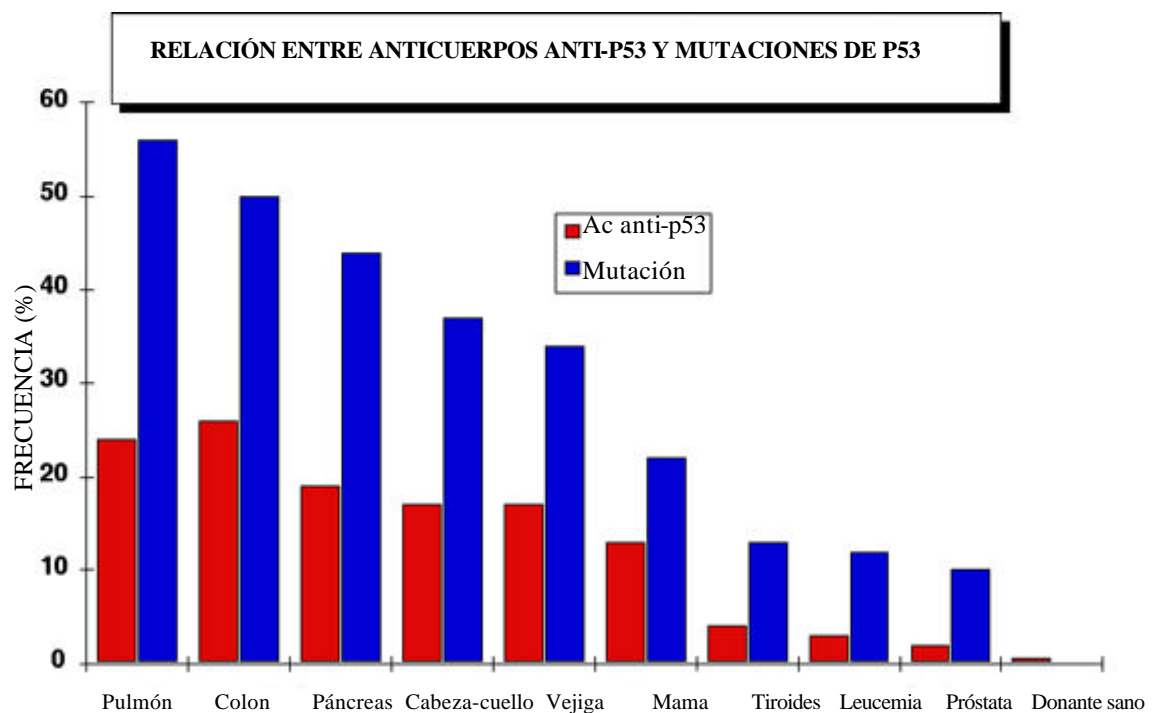


Gráfico 2. Relación entre anticuerpos anti-p53 y mutaciones de p53. Tomado de Lubin R, 1995a.

Es conocido el hecho de que sólo las mutaciones “missense” pueden generar una respuesta humoral (Winter et al, 1992). Pero, también se ha demostrado que a pesar de padecer el mismo tipo de tumor con idéntica mutación y acúmulo de p53, algunos pacientes desarrollan respuesta humoral y otros no, con lo que parece obvio que existen otros factores implicados, como podrían ser las moléculas HLA I y II. Incluso se ha observado que los niveles de anticuerpos varían en el mismo paciente en función del momento evolutivo de la enfermedad y carga tumoral, con lo que un paciente que inicialmente no tenía anticuerpos los podría presentar ante la recidiva de la enfermedad o fracaso del tratamiento.

Se han identificado anticuerpos en pacientes con tumores con p53 salvaje. Este hecho puede obedecer a diferentes causas. Podría tratarse de un falso positivo o bien que el tumor fuera muy heterogéneo y el fragmento analizado no fuera portador de la mutación, pero sí otra zona. También podría existir una metástasis indetectable con una mutación de p53 asociada a un tumor primario con p53 no mutado.

1.6.1.4. Especificidad de los anticuerpos anti-p53

Se ha demostrado que los anticuerpos reconocen epitopos inmunodominantes localizados en la región amino terminal y carboxiterminal y que sólo unos pocos reconocen mutaciones presentes en la región central (Schlichtholz et al, 1994).

Por otra parte, el nivel de anticuerpos en un organismo sano es muy bajo, lo que sugiere una mínima tolerancia a la p53 endógena.

La especificidad de los anticuerpos está entorno al 95%, pero sin embargo tiene una sensibilidad baja, ya que solo el 20-40% de los pacientes con mutaciones de p53 desarrollan anticuerpos específicos.

El análisis isotópico de los anticuerpos pone de manifiesto son sobre todo IgG1 e IgG2, aunque algunos tienen una respuesta fundamentalmente de IgA y otros tienen también respuesta IgM, pero en ningún caso esta es la única (Lubin et al, 1995a).

También se ha observado que los cambios conformacionales de p53 son claves en la generación de la respuesta humoral. Así, anticuerpos capaces de reconocer la región central de p53 mutada y con cambios conformacionales, no son capaces de reconocer la región central de p53 sana. Esto es debido a que la región central de p53 salvaje tiene una estructura muy compacta y es muy hidrofóbica, lo que la hace muy poco inmunogénica (Legros et al, 1994).

1.6.1.5. Anticuerpos anti p53 y parámetros clínicos.

En conjunto, los diferentes estudios existentes, sugieren una asociación entre los anticuerpos anti-p53 y tumores poco diferenciados con una menor supervivencia,

aunque otros no encuentran dicha relación. Por ello, son necesarios más trabajos para confirmarlo (Soussi, 2000).

1.6.1.6. Anticuerpos y seguimiento

Existe una buena correlación entre la evolución del título de anticuerpos anti p53 específicos y la respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón (Zalcman et al, 1998), colon (Hammel et al, 1997) y ovario (Gaducci et al, 1998).

En el cáncer de mama, también es posible detectar una reaparición de los anticuerpos años después de la terapia inicial, varios meses antes de la detección de la recidiva (Soussi, 2000).

1.6.1.7. Poblaciones de alto riesgo de cáncer

Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos anti-p53 suelen ser del tipo IgG, lo que indica una respuesta secundaria tras una prolongada inmunización antes del diagnóstico. Por ello, es razonable pensar que se podrían utilizar como un indicador precoz de transformación maligna en ciertos tumores.

Esto se demostró por primera vez en pacientes muy fumadores que desarrollaron cáncer de pulmón y en los cuales se detectó una elevación de los anticuerpos anti-p53 antes que cualquier otra manifestación clínica de la enfermedad (Lubin et al, 1995b).

De igual modo se han identificado elevaciones del título de anticuerpos anti p53 en trabajadores de ciertas industrias expuestos a diversos carcinógenos varios años antes de desarrollar un angiosarcoma hepático (Trivers et al, 1995). Este hecho también ha sido identificado en pacientes afectos de enfermedad pulmonar obstructiva crónica antes de desarrollar cáncer de pulmón (Trivers et al, 1996); en pacientes con esófago de Barrett (Cawley et al, 1998); y en pacientes con leucoplasia oral (Ralhan et al, 1998).

1.6.2. INMUNIDAD CELULAR

1.6.2.1. Antígenos tumorales reconocidos por linfocitos T

Los linfocitos T no reconocen directamente a los antígenos, sino que lo hacen a través de las moléculas del Sistema Mayor de Histocompatibilidad. Estas moléculas de HLA son glucoproteínas de membrana compuestas por dos cadenas y se clasifican en dos categorías: moléculas de clase I y de clase II. Los genes que codifican para estas proteínas se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6.

Las moléculas de clase I se encuentran en la membrana de todas las células del organismo y están compuestas por una cadena pesada (α) de unos 45.000 daltons de peso molecular y por una cadena ligera constante (β_2 -microglobulina), cuyo peso molecular es de 12.000 daltons. Cada molécula HLA I forma cuatro dominios extracelulares: dos externos, pertenecientes a la cadena pesada (dominios α_1 y α_2), y dos internos, correspondientes al tercer dominio de la cadena pesada (α_3) y a la β_2 -microglobulina. Finalmente, la cadena pesada atraviesa la membrana celular y termina en una región intracitoplasmática por el extremo carboxiterminal.

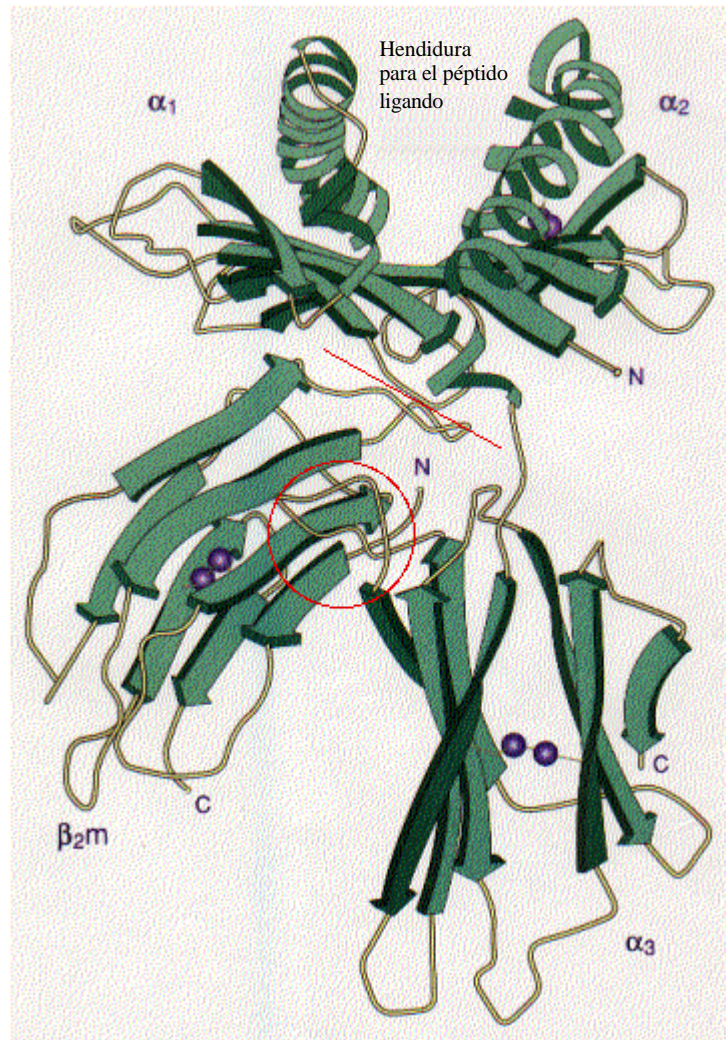


Fig. 18 . Molécula HLA clase I.

Los antígenos HLA de clase II se encuentran en la superficie de las células del sistema mononuclear fagocítico y los linfocitos B. Constan de una cadena pesada (α) de unos 33.000 daltons y una cadena ligera (β) de unos 28.000 daltons. Estas proteínas también poseen dos dominios extracelulares externos (α_1 y β_1) y dos internos (α_2 y β_2). En este

caso, además, son las dos cadenas las que atraviesan la membrana celular para terminar en una región intracitoplasmática.

En ambos tipos de moléculas HLA, los dominios externos se disponen para conformar una especie de canal o hendidura que constituye el lugar de unión de los distintos péptidos.

La función específica de las moléculas de HLA es la de combinarse con los antígenos “naturales” en forma de péptidos, formando un combinado que puede ser reconocido por el receptor de los linfocitos T. El receptor de los linfocitos cooperadores (CD4) reconoce el antígeno en combinación con moléculas de clase II, mientras que los linfocitos T citotóxicos (con fenotipo CD8) lo hacen en combinación con moléculas HLA I (Núñez, 1993).

Reconocimiento de antígeno por linfocitos T: Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

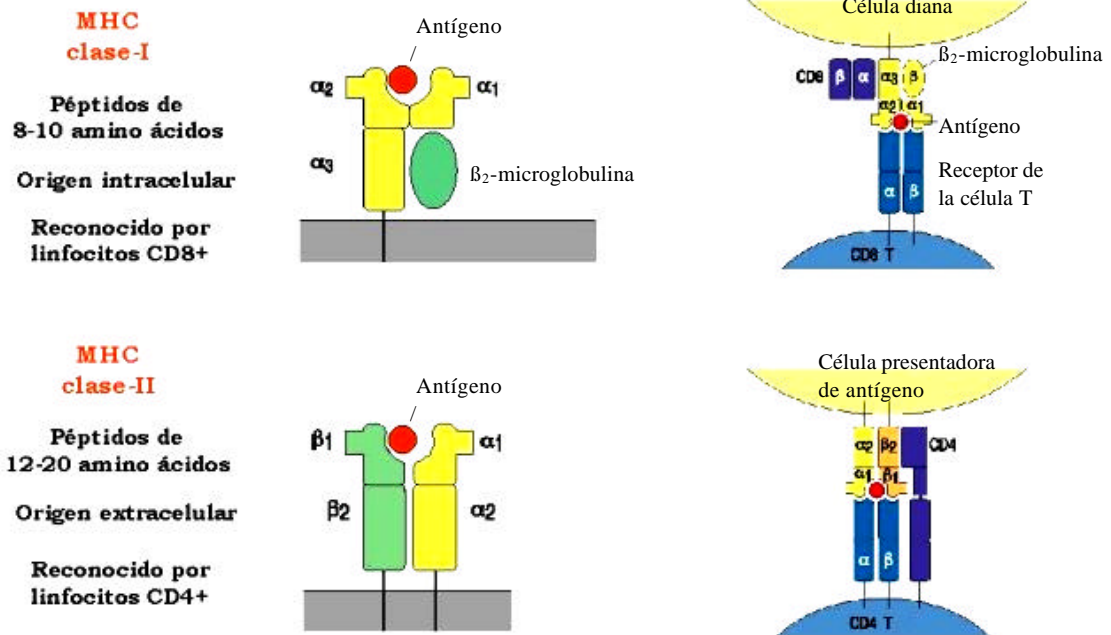


Fig. 19 . Presentación antigénica a través de las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad clase I y II.

Es conocida la existencia de diversos antígenos tumorales que son reconocidos, en su mayoría, por linfocitos T citotóxicos. Estos péptidos, que derivan en muchos casos de proteínas propias y están sobreexpresados en las células tumorales, son procesados intracelularmente y presentados a través de las moléculas HLA de clase I (Voss et al, 2000).

La lista de estos antígenos susceptibles de ser reconocidos por linfocitos T se va ampliando cada día, pero entre ellos caben destacar:

-Antígenos codificados por los genes MAGE, BAGE y GAGE. Son antígenos denominados tumor-específicos ya estos genes se hayan expresados en una amplia variedad de tumores, tales como melanoma, mama, vejiga, pulmón, cabeza y cuello y sarcomas, y en únicamente dos tejidos sanos, la placenta y el testículo. Estos parecen comportarse realmente como antígenos específicos de tumor, dado que el testículo carece de moléculas HLA I y II, por lo que no se produce tolerancia inmunológica frente a ellos.

-Antígenos de diferenciación. Estos antígenos se encuentran tanto en melanocitos sanos como en células de melanoma, dónde están sobreexpresados. Son antígenos tumor-asociados. Se han identificado cuatro: tirosinasa, Melan- A / MART-1(del inglés “**M**elanoma **A**ntigen **R**ecognized by **T** cells”), gp100 y gp45 (Boon y Van der Bruggen, 1998).

-Antígenos virales: tales como VPH-E6/7 en pacientes con carcinoma de cervix y VEB en pacientes con cáncer de cavum.

-Antígenos asociados a transformación: **p53**, CEA, AFP, Her-2/neu, ciclina 1, mdm2,...

Estos antígenos pueden identificarse a través de dos métodos:

-Inmunología directa: consiste en identificar el antígeno expresado por el tumor partiendo del linfocito antitumoral.

-Inmunología inversa: el primer paso sería identificar proteínas sobreexpresadas por el tumor, para luego identificar péptidos inmunógenos capaces de unirse a moléculas de

HLA y poder ser presentados a los linfocitos T, generando así respuesta inmune celular específica.

1.6.2.2. Linfocitos anti-p53

La existencia de anticuerpos IgG anti-p53 en algunos pacientes indica que en un momento de la evolución de la enfermedad hubo una respuesta mediada por linfocitos colaboradores CD4 anti-p53. Estos anticuerpos se dirigen contra los dominios N-terminal y C-terminal y no tienen capacidad de distinción entre la proteína mutada y la no mutada (Crawford L et al, 1982).

De entre todos los antígenos capaces de generar una cierta respuesta inmunológica específica, p53 es uno de los candidatos más atractivos desde el punto de vista de la inmunoterapia.

Como se ha señalado anteriormente, el gen p53 es el gen más frecuentemente mutado en los tumores humanos y sus mutaciones más frecuentes son del tipo “missense”, las cuales ocurren mayoritariamente en los denominados “puntos calientes” (fundamentalmente dentro de 6 codones: 175, 245, 248, 249, 273 y 282).

P53 en condiciones normales tiene una vida media muy corta y además es una proteína fundamentalmente nuclear, lo que la convierte en poco accesible a la maquinaria proteolítica citoplasmática. Como consecuencia de ello, no es procesada ni incorporada a las moléculas clase I del HLA y por consiguiente no es presentada al sistema inmunológico (Yanuck M et al, 1993). Sin embargo, cuando muta, se estabiliza y se acumula en el interior de la célula. Al acumularse, es susceptible de ser procesada y fragmentada en pequeños péptidos de unos 8-10 aminoácidos. Algunos de estos péptidos tienen la capacidad de unirse y ser presentados a través de las moléculas de

HLA clase I a los linfocitos T y generar así una respuesta inmunológica (Houbiers et al, 1993; Zeh et al, 1994; Noguchi et al, 1994; Theobald et al, 1995).

Es importante destacar que cuando la proteína p53 mutada se estabiliza y se acumula, es procesada toda ella, tanto el péptido que contiene la mutación puntual como el resto de péptidos no mutados. Este hecho es crucial para la comprensión de la inmunoterapia basada en p53. De este modo, cabe imaginar una doble respuesta inmune celular: una dirigida contra la región mutada y otra contra la región no mutada o salvaje que se encuentra sobre expresada en el tumor. La potenciación de esta respuesta inmunológica sería la base para el desarrollo de vacunas antitumorales tanto de forma profiláctica como terapéutica.

La primera de ellas es tumor-específica, ya que únicamente se dirige contra células tumorales que sobreexpresen p53 producto de una mutación concreta. Esto fue demostrado por primera vez por Houbiers “in vitro” (Houbiers et al, 1993) y poco después por Noguchi “in vivo”, quien empleó ratones afectados de sarcoma Meth A. Este tumor presenta una mutación puntual de p53 del tipo missense en el codon 234, producto de la cual se genera un péptido tumor-específico. Este investigador comprobó que la inmunización con este péptido era capaz de desarrollar una respuesta inmune específica mediada por linfocitos T. Es más, también demostró que ratones sanos inmunizados previamente con este epítipo eran capaces de desarrollar resistencia a una posterior transfección de células Meth A viables portadoras de idéntica mutación. Sin embargo, estos linfocitos T citotóxicos no fueron capaces de eliminar un sarcoma Meth A ya establecido (Noguchi et al, 1994).

Posteriormente, Mayordomo y col demostraron que empleando células dendríticas (que son las células presentadoras de antígeno profesionales más potentes) cultivadas en presencia de GM-CSF (factor estimulante de crecimiento de colonias granulomonocitarias) e IL-4 (interleukina 4) como adyuvantes, no sólo se produce una

mejor inmunización en ratones sanos, sino que también se generan linfocitos T citotóxicos con capacidad antitumoral directa y capacidad de inducir la regresión de tumores establecidos en ratones afectos de sarcoma Meth A (Mayordomo et al, 1995).

Sin embargo, este tipo de inmunoterapia dirigida específicamente contra una mutación puntual concreta tiene un gran inconveniente y es que deberíamos analizar cada tumor por separado, secuenciándolo e identificando su mutación puntual para luego poder generar una respuesta inmune específica. Además, no todas las mutaciones ocurren en epitopos inmunogénicos (Vierboom et al, 1997).

Pero, como se ha apuntado, cuando p53 muta se acumula toda la proteína, siendo la mayor parte de la misma proteína salvaje. La vacuna ideal contra el cáncer sería aquella que tuviera como diana un antígeno reconocido por linfocitos T citotóxicos asociado frecuentemente a las neoplasias humanas y que pudiera ser presentado por una molécula de HLA clase I expresada en una gran mayoría de pacientes.

El alelo de la molécula de HLA clase I más frecuente en la raza caucásica es el HLA-A2.1 (presente aproximadamente en la mitad de las personas). Por ello, se ha puesto especial interés en identificar los péptidos de p53 salvaje de las regiones altamente conservadas capaces de incorporarse a la molécula HLA-A2.1. y por tanto ser inmunógenos (Nijman HW et al, 1994).

Por tanto, es coherente el pensar que también existirá reacción inmunológica contra la dicha región no mutada, que sería tumor-asociada. Esto fue demostrado por el propio Mayordomo en 1996. Empleando un péptido de p53 con capacidad inmunógena (p53₂₃₂₋₂₄₀) presentado por células dendríticas cultivadas en un medio rico en GM-CSF e IL-4, desarrolló unos linfocitos T citotóxicos con reactividad cruzada y con capacidad de provocar regresión tumoral en 3 tipos de sarcoma de ratón antigénicamente diferentes. Estos tumores, conocidos por CMS3, CMS4 y CMS5, presentan una mutación tipo

“missense” en los codones 242, 194 y 155 de p53 respectivamente, es decir, fuera del epítipo 232-240 con el que se había realizado la inmunización. Sin embargo, estos linfocitos no fueron capaces de reaccionar contra los otros dos tipos de sarcomas que fueron analizados, Meth A y CMS1, los cuales expresan una mutación missense de p53 en los codones 234 y 239, respectivamente, es decir justo en el lugar del epítipo empleado para la inmunización (Mayordomo et al, 1996).

Esto mismo ha sido confirmado, también “in vitro”, por posteriores trabajos que emplearon otros péptidos de p53 HLA A.2 restringidos, tales como el 149-157 (Liu et al, 2000) y el 65-73 (Brafoed et al, 2000).

Esta línea de investigación es mucho más prometedora dado que nos aproximamos más al concepto de vacuna “universal”. Si bien es cierto que esta inmunización en principio fracasaría frente a tumores cuya mutación de p53 se encontrara precisamente en el epítipo empleado para la inmunización, la solución pasaría por realizar una inmunización múltiple, es decir, generando varios linfocitos T citotóxicos dirigidos específicamente contra epítopos diferentes.

Poco después, se pudo demostrar que “in vitro” es posible generar linfocitos T citotóxicos humanos selectivos para el epítipo p53₂₆₄₋₂₇₂ partiendo de linfocitos T obtenidos mediante aféresis de sangre periférica de donantes sanos. Estos linfocitos son capaces de reconocer y lisar líneas celulares de carcinomas de cabeza y cuello que sobre expresan p53 (Ropke et al, 1996), melanomas y carcinomas de mama (Gnjatic et al, 1998).

La conclusión que se extrae de estos estudios es que el reconocimiento de un determinado epítipo de p53 salvaje por parte de los linfocitos T citotóxicos humanos no viene restringido por el tipo de tejido de tumoral, lo cual los hace aplicables potencialmente a tumores de muy diferente naturaleza histológica. A pesar de todo, se

constató que a partir de la sangre de la mayoría de los donantes no era posible generar linfocitos específicos y que el acúmulo de p53 en el tumor no necesariamente estimulaba en todos los casos la citólisis mediada por linfocitos T, la cual podría ser debida a un deficiente procesamiento y consiguiente presentación antigénica (Chikamatsu et al, 1999).

Posteriormente, también se demostró que es posible el generar de igual modo linfocitos T citotóxicos específicos frente al mismo epítipo procedentes de pacientes afectos de carcinomas de cabeza y cuello usando células dendríticas autólogas (Hoffmann et al, 2000).

Paradójicamente, en este trabajo se constató que ninguno de los tumores de los 3 pacientes que fueron capaces de generar dichos linfocitos tenía la capacidad de presentar adecuadamente el epítipo (dos tenían el genotipo p53 wt y por tanto sin acúmulo secundario y el otro una mutación missense en el codón 273, la cual evita la presentación de p53₂₆₄₋₂₇₂ bloqueando su procesamiento) (Theobald et al, 1998). Por contra, los pacientes que no fueron capaces de generar los linfocitos tenían tumores con acúmulo de p53 mutada y por tanto con capacidad potencial de presentación del epítipo. Aunque con un número muy escaso de pacientes (7), este estudio parecía sugerir que “in vivo” los linfocitos T citotóxicos específicos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ podrían jugar un papel en la eliminación de las células tumorales que expresan dicho epítipo y en la inmunoselección de variantes celulares carentes del mismo, lo que en definitiva contribuiría al escape del sistema inmunológico por parte del tumor en pacientes con cáncer de cabeza y cuello.

Para comprobar dicha hipótesis, el mismo grupo desarrolló un estudio en el que se analizó la frecuencia de aparición de precursores de células T específicas frente a p53₂₆₄₋₂₇₂ en 30 pacientes afectos de carcinoma de cabeza y cuello y 31 donantes sanos empleando la técnica de tetrámeros de péptidos-moléculas de HLA. Encontraron que las

frecuencias más elevadas de estos linfocitos T (muchos de ellos con fenotipo de linfocitos de memoria), las presentaban los pacientes cuyos tumores no acumulaban p53 y tenían el genotipo p53 salvaje. Más aún, en los pacientes cuyos tumores acumulaban p53 la frecuencia de linfocitos T específicos era tan baja que no difería significativamente de la de los donantes sanos. Estos hallazgos son compatibles con la teoría de la inmunoselección, que implica que las células T específicas eliminarían precozmente aquellas células tumorales que sobreexpresan p53, mientras que las células tumorales que no fueran capaces, por diversos motivos, de procesar ni presentar el epítipo, adquirirían una ventaja de crecimiento. Esto también explicaría la alta frecuencia de linfocitos T de memoria identificados en estos pacientes. (Hoffmann et al, en prensa).

Estos sorprendentes hallazgos revelan las complejas interacciones entre el sistema inmune y el tumor, cuyos mecanismos hoy en día son prácticamente desconocidos.

1.6.2.3. La Autoinmunidad Potencial

A la vista de estos importantísimos resultados, la siguiente cuestión resulta inevitable: ¿Se producen a la par fenómenos de autoinmunidad frente a la p53 no mutada de las células sanas?

En modelos animales, la respuesta es que no se ha demostrado (Vierboom et al, 1997; Mayordomo et al, 1996; Roth et al, 1996b). Los mecanismos implicados en esta tolerancia no son todavía bien conocidos, pero existen varias explicaciones posibles.

Es bien conocido que la forma de auto-tolerancia más importante es la delección tímica, mediante la cual son eliminados mediante apoptosis los linfocitos que reconocen péptidos propios (Kappler et al, 1987). Sin embargo, este proceso es altamente dependiente tanto de la avidéz del reconocimiento de la célula T como de la cantidad de

péptido presentada (Ashton-Rickardt et al, 1994; Sebzda et al, 1994). Como consecuencia, algunas células T que reconocen epítomos propios con una avidéz inferior a un determinado umbral, pueden salir a sangre periférica (Oehen et al, 1994; Liu et al, 1995).

Además del control tímico central, la ausencia de un medio ambiente inmunoestimulante apropiado en la periferia, puede conducir a anergia (Webb et al, 1990). Por ello, incluso en presencia de un antígeno determinado, las células T podrían ignorarlo. Así, se ve como también en la periferia es importante tanto la avidéz de la célula T por el antígeno como la cantidad del mismo.

P53 se sobreexpresa en varios tejidos normales tales como el timo, bazo y las células linfohematopoyéticas (Rogel A et al, 1985). De esta forma, los linfocitos con gran afinidad por p53 son eliminados mediante la selección tímica. Sin embargo, existen linfocitos que reconocen la p53 salvaje con baja afinidad en sangre periférica (Hernández et al, 2000) y que han sido identificados en donantes sanos (Röpke et al, 1995). Por tanto, se puede afirmar que existe una cierto grado de tolerancia fisiológica a p53 y que la inmunización se realizaría movilizandó el repertorio de linfocitos T citotóxicos específicos de baja afinidad existentes previamente. La especificidad por el tumor parece que se mantiene debido que la concentración de p53 en los tejidos sanos es bajísima y los linfocitos son de baja afinidad, con lo que existe una lisis tumoral sin fenómenos de autoinmunidad (Morgan et al, 1998; Vierboom et al, 1997; DeLeo, 1998). De hecho, estos linfocitos tampoco son capaces de lisar células neoplásicas con niveles normales de p53 (Gnjatic et al, 1998).

2. JUSTIFICACIÓN

La inmunoterapia contra el cáncer está en fase de desarrollo.

Recientemente se ha descrito la existencia de una respuesta inmunológica específica mediada por linfocitos T citotóxicos anti-p53 en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Hoffmann TK, en prensa).

Estos linfocitos T, dirigidos contra el epítipo 264-272 de la proteína p53 parecen desempeñar una función de inmunoselección, ya que podrían eliminar clones de células tumorales con sobreexpresión de la proteína.

Este hallazgo, unido al hecho de que la proteína p53 está sobre expresada en la mitad de todos los tumores humanos, podría tener una importancia decisiva para el desarrollo de vacunas antitumorales específicas anti-p53, las cuales podrían ser aplicadas en una gran variedad de tumores de estirpe muy diferente.

Para ello, es importante comprobar si existe una respuesta inmunológica específica mediada por linfocitos anti-p53 en distintas neoplasias, susceptible de ser potenciada.

Por eso, el presente trabajo pretende verificar si, de forma análoga a lo descrito en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, en pacientes con cáncer de mama existe una respuesta inmunológica celular específica anti-p53 mediada por linfocitos citotóxicos.

3. OBJETIVOS

Principal:

1. Demostrar “in vivo” la existencia de linfocitos T citotóxicos específicos anti-p53 en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama.

Secundarios:

1. Correlacionar la frecuencia linfocitos T anti-p53 en sangre periférica con el “status” de p53 en el tumor.
2. Seleccionar pacientes con cáncer de mama para inmunoterapia.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se reclutaron pacientes con cáncer de mama tanto en el Servicio de Oncología Médica como en la Unidad de Mama del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza, así como en el Servicio de Oncología del Hospital San Jorge de Huesca.

Las pacientes debían presentar una recidiva neoplásica fácilmente accesible que requiriera confirmación histológica o lesión primaria intervenida o biopsiada.

Una vez prestado el debido consentimiento informado, a cada paciente se le realizó una extracción de sangre y tejido tumoral.

El tejido tumoral se dividía en dos partes: una, introducida en formol, para su análisis histopatológico convencional y la otra, conservada en fresco, se almacenó a -80° centígrados, para su futuro análisis por secuenciación de ADN.

Tanto la sobreexpresión de p53 como otros factores pronósticos fueron analizados en el tejido tumoral en los laboratorios de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Zaragoza y del Hospital San Jorge de Huesca.

El análisis de sangre fue de dos tipos: uno sirvió para tipar el HLA de la paciente y el otro para analizar los linfocitos anti-p53. Una vez centrifugada la sangre y obtenidas las células mononucleares en condiciones de máxima asepsia, se guardaron en tubos de criopreservación a -80° .

Finalmente, tanto el fragmento de tumor como las células mononucleares fueron transportados con nieve carbónica a -60°C a su destino final, el laboratorio de inmunología de la Universidad de Pittsburgh, dónde se realizó la detección de linfocitos anti-p53 específicos.

4.1. POBLACIÓN

4.1.1. UNIVERSO POBLACIONAL

Todas las pacientes se reclutaron en la Comunidad Autónoma de Aragón.

La población aragonesa, según el Censo de 1995, consta de 1.205.663 habitantes, lo que supone un 3% de la población española, mientras que el territorio aragonés representa un 9.4% del total. Esto significa que el peso demográfico de Aragón en el conjunto nacional es débil.

La densidad de población es de 25 habitantes/km², siendo, tras Castilla - La Mancha, la menor de España. Pero, debido a un saldo migratorio interregional negativo y la concentración en Zaragoza de las migraciones intrarregionales, la ciudad de Zaragoza supone en cantidades globales la mitad de la población de Aragón.

En el decenio 1981-91, al contrario de lo que ocurrió en el conjunto de España, la población aragonesa descendió un 0.7%. Sin embargo, esta evolución no fue homogénea. Al analizar la estructura demográfica, se observa que el grupo de edad que disminuyó de manera considerable fue el juvenil (menores de 25 años), un 16.3% (72.000 personas). Por el contrario, la población madura (25-64 años) aumentó un 3.7%. Sin embargo, donde el aumento fue realmente importante fue en la población mayor (> 65 años), que supuso un incremento del 25% (42.000 personas).

Por tanto, la evolución de la población aragonesa puede calificarse de regresiva con un índice de envejecimiento del 17.9% (superior a la media nacional, que es del 13.8%). Este índice es aún más acusado en las provincias de Huesca y Teruel por la emigración juvenil. Producto de este fenómeno de envejecimiento, la tasa de mortalidad también ha

aumentado hasta situarse en el 9.5 por mil. Además, el descenso de la tasa de natalidad, que en 1994 se situó ya en un 7.8 por mil, está provocando un crecimiento vegetativo negativo. Por todo ello, la pirámide de población muestra una figura en forma de hucha, propia de las poblaciones con carácter regresivo (Gráfico 3).

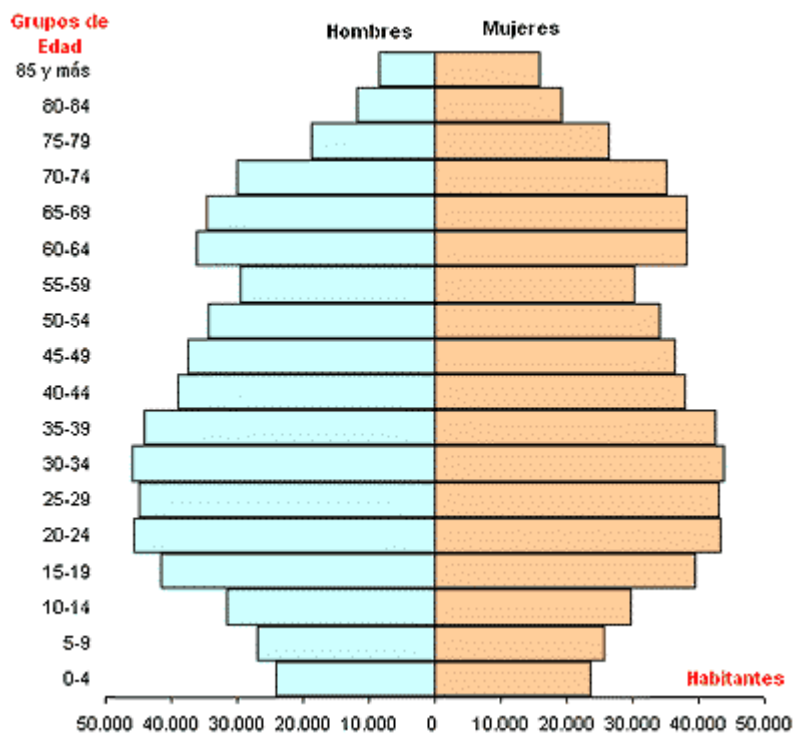


Gráfico 3. Pirámide de población de Aragón, 1996.

Pero, de forma paralela al incremento en el número de personas mayores, hay mayor longevidad, por lo que el grado de sobreenvjecimiento (población de 80 años o más) ha

aumentado también de forma considerable, representando el 22.4% de la población mayor de 65 años.

Todas las pacientes incluidas en el presente estudio fueron reclutadas en los Hospitales Clínico Universitario de Zaragoza y San Jorge de Huesca, ambos pertenecientes a la red pública de hospitales del Servicio Aragonés de Salud (SALUD).

En la actualidad, el sistema sanitario de la Comunidad Autónoma de Aragón se divide en cinco áreas de salud:

Área I: corresponde a la gran mayoría de la provincia de Huesca.

Área II: comprende la mayor parte de la ciudad de Zaragoza y la zona sur y este de la provincia.

Área III: constituida por la zona oeste de la ciudad de Zaragoza y la parte central y oeste de la provincia.

Área IV: la mayor parte de la provincia de Teruel.

Área V: nordeste de la provincia de Zaragoza y zona norte de la capital. También se incluyen en este área varios municipios del sur de Huesca.

Sin embargo, conviene señalar que se acaba de aprobar una resolución según la cuál próximamente existirán 3 áreas sanitarias más, hasta totalizar 8 en toda la Comunidad Autónoma. Esas 3 nuevas áreas serán las de Barbastro, Calatayud y Alcañiz, las cuales se disgregarán de las áreas I, III y IV, respectivamente.

Mapa Sanitario de Aragón, Septiembre-1998

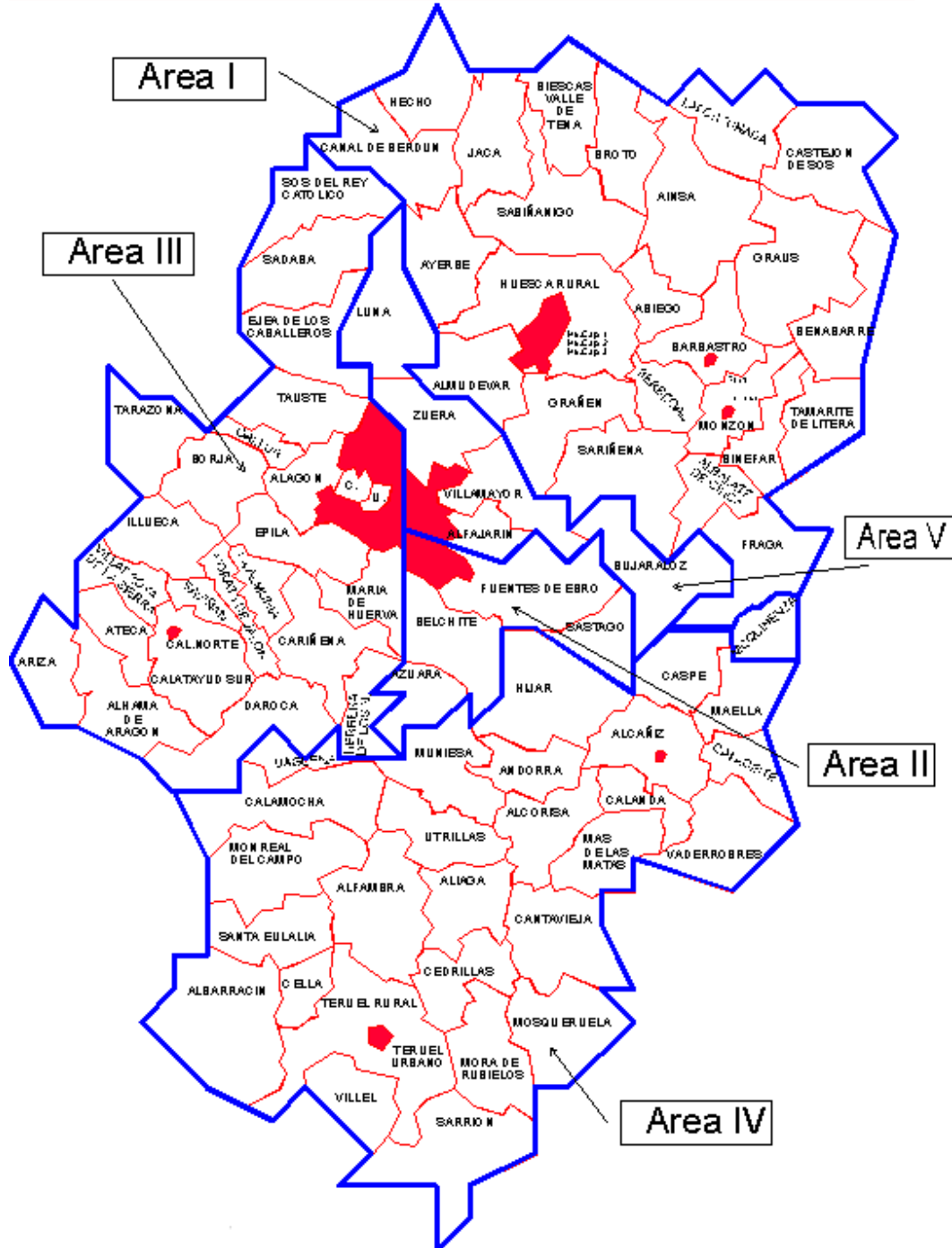


Fig. 20. Áreas sanitarias de la Comunidad Autónoma de Aragón.

El Hospital Clínico de Zaragoza es el Hospital de referencia de los sectores 3 y 6 del área III, mientras que el Hospital San Jorge lo es del sector 1 del área I. El sector 7 del área III tiene como Hospital de referencia al Hospital de Calatayud (Ernest Lluch), para el que a su vez el Hospital Clínico de Zaragoza actúa como centro de referencia, y el sector 2 del área I al Hospital de Barbastro.

El Sector 1 del área 1 es el sector de Huesca y tiene una población de 115.431 habitantes según el censo de 1991. Esta población es mayoritariamente rural (65.755), mientras que la población urbana (Huesca capital) no alcanza los 50.000 (49.676).

El área III comprende 25 zonas rurales (sector 3) de la provincia de Zaragoza (187.920 habitantes) y 7 zonas de salud urbanas de Zaragoza capital (sector 6). En total, tiene una población de 294.570 habitantes con un marcado carácter rural (63%), de las cuales el 50.23% son mujeres.

La esperanza de vida de en la provincia de Zaragoza es de 77 años, menor que la de la Comunidad en general, siendo en los hombres de 73.7 años y en las mujeres de 80.2 años.

La tasa de incidencia del cáncer de mama en la provincia de Zaragoza y Huesca es de 34.7 y 46.4, respectivamente, por 100.000 habitantes y ajustada a la población mundial (Registros de Tumores de Poblaciones Nacionales, periodo 1972-1982. Dr Zubiri).

En España, la tasa de mortalidad por cáncer de mama es de un 9.16 por 100.000 habitantes (Anuario de Estadísticas Sanitarias Mundiales, 1983 y 1985).

En Estados Unidos, según datos del Instituto Nacional del Cáncer y del Instituto Nacional de Salud, la tasa de incidencia anual ajustada por edad de cáncer de mama en mujeres de raza blanca es de 108.8 por 100.000 habitantes, con una tasa de mortalidad de 27.3 por 100.000 habitantes (periodo 1984-1988).

4.1.2. UNIVERSO MUESTRAL. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Sobre el universo poblacional descrito se consideró como candidato a participar en el presente estudio a aquellos pacientes que cumplieran los siguientes criterios de inclusión.

- **Criterios de inclusión:**

- Paciente con cáncer de mama primario, metastásico o recidivado comprobado histológicamente.
- Edad igual o superior a 18 años.
- Consentimiento informado.
- Ausencia de infección activa o neutropenia en el momento de realizarse la extracción de sangre.
- Ausencia de un segundo tumor concomitante.

- **Criterios de exclusión:**

- Incumplimiento de alguno de los criterios de inclusión.

4.2. TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio descriptivo transversal en una serie de casos.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tanto los estadísticos descriptivos (medias, medianas, desviaciones típicas, percentiles) como los análisis estadísticos con resultados tanto gráficos como numéricos (T-student, prueba exacta de Fisher, regresión lineal simple-coeficiente de correlación de Pearson) se realizaron empleando el programa G-stat, versión 1.2.

Se trata de un programa completo de análisis estadísticos multiplataforma programado en JAVA y desarrollado por el departamento de Biometría de GlaxoSmithKline®.

La variable linfocitos es una variable cuantitativa continua. Además, se aplicó el test de Kolmogorov (contraste de bondad de ajuste), según el cual se pudo suponer que además seguía una distribución normal. Por tanto, para el contraste de hipótesis sobre medias de linfocitos se empleó la prueba de t-Student.

En el contraste de hipótesis para el rechazo de la hipótesis nula (H_0) se estableció el nivel de significación del 95% ($p < 0.05$).

4.4. ESTADIFICACIÓN DEL TUMOR

Para la estadificación del tumor se empleó la quinta edición de la “Clasificación TNM de los tumores malignos” de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) (Wiley-Liss, Inc., Nueva York, 1997), que era la vigente durante el periodo en el cual transcurrió el estudio. Sin embargo, conviene reseñar que desde el 1 de Enero del año 2003 está en vigor la sexta edición, la cual presenta algunas pequeñas modificaciones sobre la anterior.

La clasificación del cáncer de mama, consta de dos subclasificaciones: una clínica (que se realiza basándose en la exploración física) y otra patológica (basándose en los resultados histológicos y que se designa con la letra “p”). Las categorías de tamaño tumoral (T) y metástasis a distancia (M) coinciden en ambas, no así la afectación de ganglios linfáticos regionales (N). Los detalles se resumen en las siguientes tablas.

Tumor primario (pT y T)	
Tx	El tumor primario no puede evaluarse.
T0	No hay evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : carcinoma ductal <i>in situ</i> , carcinoma lobulillar <i>in situ</i> o enfermedad de Paget del pezón sin tumor subyacente.
T1	Tumor con tamaño igual o inferior a 2 cm. T1mic: Microinvasión de 0.1 cm o inferior. T1a: Tumor superior a 0.1 cm pero inferior a 0.5 cm. T1b: Tumor mayor de 0.5 cm pero no mayor de 1cm. T1c: Tumor mayor de 1cm pero no mayor de 2 cm.
T2	Tumor mayor de 2 cm pero no mayor de 5 cm.
T3	Tumor con tamaño superior a 5cm.
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión a la piel o pared torácica. T4a: Tumor fijo a la pared torácica. T4b: Edema, infiltración o ulceración de la piel, incluyendo piel de naranja; o presencia de nódulos satélites dentro de la misma mama. T4c: T4a y T4b. T4d: Carcinoma inflamatorio.

Tabla 5. Clasificación TNM. Tamaño del tumor primario.

Ganglios regionales (N)	
Nx	No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales.
N0	Ausencia de metástasis ganglionar regional.
N1	Metástasis en ganglio(s) axilar ipsilateral móvil.
N2	Metástasis en ganglio(s) axilares ipsilaterales fijos entre sí o a otras estructuras.
N3	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) de la mamaria interna ipsilateral.

Tabla 6. Clasificación TNM. Afectación clínica de ganglios linfáticos.

Ganglios regionales (pN)	
PNx	No pueden evaluarse los ganglios linfáticos.
PN0	Ausencia de metástasis ganglionar regional.
PN1	Metástasis en ganglio(s) axilar ipsilateral móvil. pN1a: Micrometástasis, todas inferiores o iguales a 0.2cm. pN1b: Metástasis ganglionares, alguna mayor de 0.2cm. pN1bi: Metástasis de 1 a 3 ganglios, cualquiera mayor de 0.2 cm pero todas menores de 2 cm. pN1bii: Metástasis en 4 o más ganglios, cualquiera mayor de 0.2 cm pero todas menores de 2 cm. pN1biii: Invasión ganglionar extracapsular, con tamaño ganglionar de menos de 2 cm. pN1biv: Metástasis ganglionares, al menos una mayor de 2cm.
PN2	Metástasis en ganglios(s) axilares ipsilaterales fijos entre sí o a otras estructuras.
PN3	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) de la mamaria interna ipsilateral.

Tabla 7. Clasificación TNM. Afectación anatomopatológica de ganglios linfáticos.

Metástasis a distancia (pM y M)	
Mx	Las metástasis a distancia no pueden evaluarse.
M0	No hay metástasis a distancia.
M1	Metástasis a distancia (incluyen ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales).

Tabla 8. Clasificación TNM. Afectación metastásica.

Finalmente y basándose en la conjunción de las tres categorías (T, N y M) resulta un estadio de enfermedad que se especifica en la tabla siguiente.

Estadio	T	N	M
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
Estadio IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1,2	M0
	T4	Cualquier N	M0
Estadio IIIB	Cualquier T	N3	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M0

Tabla 9. Estadificación del cáncer de mama.

4.5. RECOGIDA DE MUESTRA DE SANGRE

Procedimiento: se coloca el brazo del paciente sobre una superficie plana y dura y se le anuda un compresor de caucho por encima del codo para provocar la ingurgitación de las venas del antebrazo por éstasis. A continuación se desinfecta la zona con un algodón impregnado en alcohol y se realiza la venopunción con un tubo de doble aguja (VACUTAINER®) para insertar posteriormente los tubos de vacío de forma sucesiva. Finalmente, se retiran el compresor y portatubos, realizando una fuerte compresión en la zona de punción mediante un algodón seco fijado con el esparadrapo.

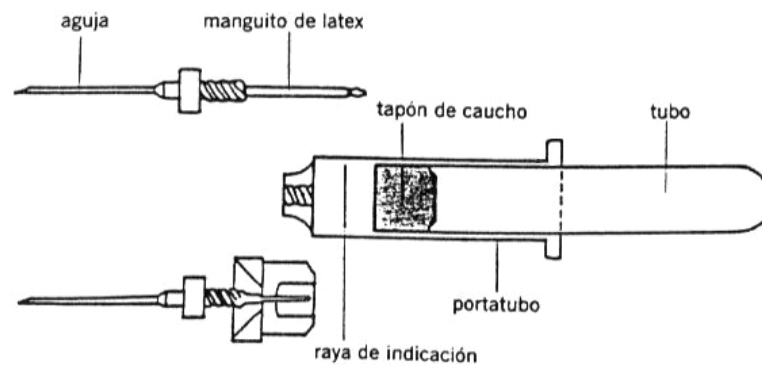


Fig. 21. Tubo de doble aguja para extracción de sangre.

4.6. TIPAJE DE HLA

Únicamente se realizó el tipaje HLA de Clase I (locus A, B y C).

Para ello, se recoge una muestra de 10 mililitros de sangre del paciente en un tubo de vacío heparina de sodio como anticoagulante (0.3 ml; 1000 U/ml) y posteriormente se diluye en un volumen igual de suero salino estéril.

El siguiente paso es el aislamiento de los linfocitos. Este procedimiento se explica con detenimiento en el apartado 4.8.1..

La cantidad de linfocitos que se pueden obtener a partir de 10 ml en personas sanas es de $10\text{-}20 \times 10^6$. Una vez obtenidos los linfocitos, se le añade 1ml de RPMI (medio de cultivo del **R**oswell **P**ark **M**emorial **I**nstitute, Buffalo, NY) 1640 ajustando la concentración de linfocitos entre 1.5 y 2×10^6 /ml.

Para hacer el tipaje serológico de HLA se emplea la técnica de linfocito-toxicidad, desarrollada por Terasaki.

La prueba se realiza en microplacas de 60 o 72 pocillos. Se selecciona un panel de antisueros (anticuerpos monoclonales) contra los diversos antígenos HLA A, B y C.

Los linfocitos se añaden a la placa y se incuban durante media hora. Durante la incubación los anticuerpos de los antisueros se fijan a los antígenos celulares específicos, formando complejos antígeno / anticuerpo.

La detección de estos inmunocomplejos se realiza añadiendo complemento de conejo durante una hora. Así se conforma un complejo lítico que tiene como resultado la lisis de los linfocitos diana. En los pocillos donde no hay reacción antígeno / anticuerpo no se produce lisis de las células.

Finalmente, para la detección de los linfocitos lisados se procede de la siguiente manera. A cada pocillo se añade naranja de acridina y bromuro de ethidio. Estos reactivos son cancerígenos, por lo que hay que tomar precauciones para su manipulación.

El naranja de acridina pasa a través de la membrana celular fijándose en el ADN celular. Cuando se expone a los rayos ultravioleta aparece con una coloración verde fluorescente.

El bromuro de ethidio penetra únicamente el interior de la célula si la membrana está lesionada, dando una reacción una naranja cuando se expone a la luz ultravioleta.

Por tanto, las células vivas aparecen con fluorescencia verde y las muertas con fluorescencia naranja. La técnica necesita que se le añada tinta china para eliminar el fondo fluorescente.

La valoración de la técnica se realiza contando el número de células vivas y muertas.

El sistema de cuantificar células es el siguiente:

0 = negativo.

1 = 10-20%.

2 = 20-40%, positivo dudoso.

4 = 40-60%, positivo débil.

6 = 60-80%, positivo.

8 = 80-100%, positivo fuerte.

4.7. ANÁLISIS DEL TEJIDO TUMORAL

Se analizaron muestras de tejido tanto del tumor primario como de recidivas accesibles.

Por un lado, se recogió una pequeña muestra de tumor que fue inmediatamente congelada en fresco a -80°C . En esta muestra está previsto realizar en el futuro la secuenciación del gen p53 en cada tumor, para verificar si ciertos tipos de mutaciones concretos se asocian a un mayor o menor concentración de linfocitos T específicos anti-p53. Así mismo, está previsto realizar la visualización y cuantificación *in situ* de los linfocitos anti-p53 en el propio tumor.

Por un lado, se analizó la sobreexpresión de p53 en el tumor. Para ello, una pequeña porción del tejido, nada más ser extirpado de la paciente, era introducido en formol y remitido al Servicio de Anatomía Patológica, tanto del Hospital Clínico de Zaragoza como San Jorge de Huesca. Una vez allí, cada muestra era embebida en un bloque de parafina.

A continuación, sobre cada bloque de parafina, se realizaban secciones de 5 micras de espesor empleando un microtomo tipo Leica Biocunt Jung.

Con el fin de aumentar la adherencia de las secciones a los portaobjetos y evitar su desprendimiento durante las técnicas inmunohistoquímicas, fueron utilizados portaobjetos gelatinados. Posteriormente las preparaciones requerían una fase de procesado al microondas.

4.7.1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PARA EL GELATINADO DE LOS PORTAOBJETOS

Se calientan 100ml de agua destilada a 40°C y se disuelven 0.50gr de gelatina. Después, se añaden 0.40gr de alumbre de cromo. A continuación se introducen los portaobjetos en el interior de la solución preparada, se sacan y se dejan secar apoyados en una rejilla a temperatura ambiente.

4.7.2. PROCESADO DE LAS PREPARACIONES AL MICROONDAS

Este proceso se lleva a cabo en tres fases consecutivas:

-Colocar las preparaciones en recipientes de plástico termo-resistentes, las cuales contienen tampón citrato 10mM, pH 6.5.

-Procesar las preparaciones en horno microondas en tres ciclos de 5 minutos, cada uno de ellos a 750. (Las preparaciones no deben secarse durante la incubación).

-Dejar enfriar las reacciones a temperatura ambiente durante 20 minutos.

A continuación, se procedía a realizar las técnicas de rutina y de inmunohistoquímica sobre las secciones.

4.7.3. TÉCNICAS DE RUTINA

Se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina para el examen histológico de rutina, siguiendo los habituales procesos de tinción.

El objetivo de esta técnica era el obtener la confirmación de la presencia de células malignas en la muestra.

4.7.4. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Por técnicas inmunohistoquímicas se determinaron tanto el estado de p53 como otros marcadores pronósticos en el tumor.

Antes de comenzar con las técnicas inmunohistoquímicas se procede a un desparafinado de las secciones.

Para ello, se colocan los portaobjetos en canastillas especiales para los mismos y se les hace pasar por baños de xilol y por una serie de alcoholes en orden decreciente de graduación.

Posteriormente se introduce en agua destilada y para terminar se da un baño de una solución tamponada de fosfatos (PBS: phosphate buffered saline). El PBS tiene como objeto el estabilizar el pH en 7.2.

Tras el desparafinado, ya se pueden aplicar las técnicas de inmunohistoquímica. La metodología fue la habitual.

-En primer lugar se debe inhibir la actividad enzimática endógena de los tejidos a analizar. Una vez que las secciones han sido desparafinadas, el siguiente paso va a ser

incluirlas en una solución de 100cc de alcohol metílico con 1.5cc de agua destilada durante 30 minutos.

-Hidratación progresiva:

- Alcohol 70° durante 5 minutos.
- Agua destilada durante 5 minutos.

Técnica de avidina-biotina peroxidasa

En este trabajo se empleó la técnica de avidina-biotina peroxidasa que se resume brevemente a continuación.

-Procesado en microondas.

-Incubación en suero de conejo normal, diluido en PBS 1/5 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

-Se decanta.

-Se añade el anticuerpo monoclonal específico (anticuerpo primario) y se incuba durante 60 minutos en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

-Se elimina el sobrante y se hacen tres lavados de 5 minutos cada uno, con PBS disuelto en agua.

-Se secan las preparaciones a mano y se procede a la incubación durante 30 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado (anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulinas de

ratón ligado a biotina) que se incluye en el kit. Este paso también se realiza en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

-Se elimina el sobrante y se hacen tres lavados con tampón PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.

-Incubación con el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC) durante 30 minutos en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Este complejo debe prepararse 30 minutos antes de su uso, añadiendo 5 ml de PBS, una gota del reactivo A (avidina) y una gota del reactivo B (biotina ligada a peroxidasa), en ese orden, agitándolo después.

-Se elimina el sobrante y se lava con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.

-Revelado:

Se añade un cromógeno (la diaminobencidina), peróxido de hidrógeno y un reactivo líquido incluido en el kit.

Se lava con agua y se mira al microscopio óptico (Olympus AH-2 Vanox-T).

A continuación se especifican los anticuerpos empleados, tanto primarios como secundarios.

Anticuerpos primarios

- **Análisis de sobreexpresión de p53**

Se empleó un anticuerpo monoclonal anti-p53, clon D0-7 (Novocastra™, Benton Lane, Newcastle). Este anticuerpo reconoce un epítipo en el extremo amino terminal de la proteína, entre los aminoácidos 35-45, reaccionando contra la proteína salvaje y la mayoría de las mutaciones de p53.

Tras la inmunotinción, las muestras fueron examinadas por microscopía de luz. Los resultados se expresaron según la escala siguiente:

-: ausencia de tinción.

+/-: tinción débil o equívoca.

+: tinción inequívoca.

El tumor fue considerado p53 positivo cuando más del 10% de las células tumorales mostraban una intensidad de tinción inequívoca.

- **Análisis otros marcadores**

Además del estado de la proteína p53 en el tumor, se determinaron otra serie de marcadores en el tumor. Para ello, se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales:

Receptores de estrógenos: clon 6F11 (Novocastra™, Benton Lane, Newcastle). Dilución 1/40. Se consideró receptores de estrógenos positivo la detección de cualquier grado de positividad (débil, intensa ó muy intensa) en más del 10% de las células.

Receptores de progestágenos: clon 1A6 (Novocastra™, Benton Lane, Newcastle). Dilución: 1/40. Al igual que en el caso anterior, se consideró receptores de progesterona positivo la detección de cualquier grado de positividad (débil, intensa ó muy intensa) en más del 10% de las células.

Factor de crecimiento epidérmico: clon EGFR 113 (Novocastra™, Benton Lane, Newcastle). Dilución 1/10.

Oncoproteína c-erbB-2: clon A0485 (Herceptest™-Dako, Carpinteria, California). Prediluido. Este anticuerpo es altamente específico ya que no muestra positividad cruzada contra otras proteínas análogas tales como las tirosin quinasas de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, HER-3 ó HER-4). La escala empleada para determinar el “status” del tumor fue la siguiente:

-: ausencia de tinción.

+: tinción débil afectando únicamente a una porción de la membrana celular.

++: tinción débil pero afectando a la totalidad de la membrana citoplasmática en al menos el 10% de las células.

+++ : tinción intensa afectando a la totalidad de la membrana citoplasmática en al menos el 10% de las células.

Se consideró c-erbB-2 positivo cuando se detectaba una tinción equivalente a ++ ó +++.

Tanto la ausencia de tinción (-) y como la tinción débil (+) fueron consideradas como resultado negativo.

Antígeno nuclear ki 67: clon M1B1 (Novocastra™, Benton Lane, Newcastle). Dilución: 1/15.

Anticuerpos secundarios

En todos los casos se emplearon los siguientes anticuerpos secundarios:

-Complejo Avidina-Biotina (ABC).

Incluye el Kit para preparación del complejo avidina-biotina peroxidasa:

Reactivo A (Avidina), diluido en PBS con pH en 7.2.

Reactivo B (Biotina ligada a peroxidasa), diluido igualmente en PBS.

-Diaminobencidina.

Cromógeno usado en la solución final del revelado.

4.8. DETECCIÓN DE LINFOCITOS ANTI-P53 ESPECÍFICOS

4.8.1. AISLAMIENTO DE LOS LINFOCITOS

4.8.1.1. Recogida de la muestra.

Se procedía a la extracción de 50 ml de sangre de la paciente que era recogida en 5 tubos de ACD (citrato).

4.8.1.2. Isolación de células mononucleares de sangre periférica.

Todo el proceso de preparación de la muestra para su análisis se realizó en condiciones de máxima asepsia y en el interior de una campana de flujo laminar ubicada en el laboratorio de inmunología (Modelo BIO-II-A de Telstar S.A.). Todo el material empleado para cada muestra era inmediatamente desechado en un contenedor biológico al concluir.

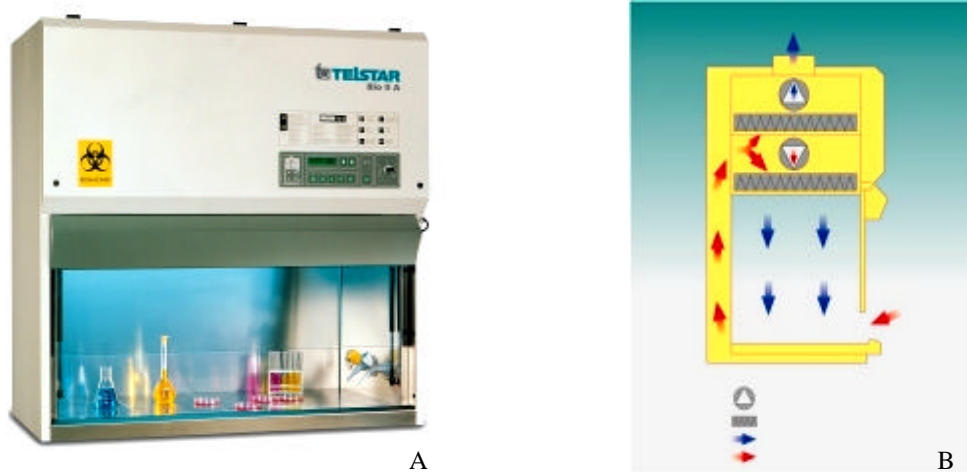


Fig. 22. A. Campana de flujo laminar (Modelo BIO-II-A, Telstar S.A). **B.** Esquema de funcionamiento.

La campana de flujo laminar o cabina de seguridad biológica asegura la ausencia de contaminación de las muestras durante su manipulación, al obtener un área delimitada de aire limpio y estéril. Esto se consigue mediante el principio de barrido continuo por flujo descendente de aire ultrafiltrado en régimen laminar.

- El primer paso consistía en centrifugar la sangre para separar el suero de las células sanguíneas, que era pipeteado (pipeta modelo Matrix Cellmate, LP italiana SPA) y almacenado en 2 tubos contenedores de 15ml (Falcon™) a -80°C en un frigorífico de ultracongelado (Modelo QLT 1885-V12, Advantage).

El suero se empleará en el futuro para analizar la frecuencia de aparición de anticuerpos anti-p53 y correlacionarlos con los linfocitos T específicos anti-p53.

Inicialmente se realizó a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. Sin embargo, tras analizar las primeras doce muestras se decidió centrifugar únicamente a 1200 rpm (equivalente a 250 xg). El motivo de esta modificación en la técnica fue que se comprobó que se producía cierta hemólisis que podía dificultar el posterior análisis. Se empleó una centrifugadora modelo CR 312 de la empresa Jouan.

- Para proceder a la isolación de las células mononucleares, se tomaba la sangre a la que se le había retirado el suero y se le añadía suero salino (agua con cloruro sódico al 9%). En 4 tubos contenedores de 50 ml por muestra se rellenaba con ficol, Histopaque®-1077 (Sigma Diagnostics®), hasta la mitad (25 ml) y con sumo cuidado se pipeteaba la sangre con suero fisiológico encima. El Histopaque®-1077 es una solución de un polisacárido (polisucrosa) y un medio de contraste radio-opaco (diatrizoato sódico) de una densidad de 1077 +/- 0.001 g/ml.

Estos 4 tubos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 25 minutos a temperatura ambiente con las primeras doce muestras. Pero, al igual que se hizo en la

primera fase, en lo sucesivo también se redujeron las revoluciones a 1400 (equivalente a 400 g) y el tiempo a 20 minutos. Se evitó centrifugar a temperaturas inferiores a 10°, para evitar una agrupación celular que dificultara la recogida. En la figura 22 se muestra el normograma empleado para calcular las revoluciones por minuto requeridas en función de la fuerza de centrifugación relativa recomendada (g) por el fabricante.

Al centrifugar, los eritrocitos y los granulocitos forman agregados con el polisacárido y sedimentan rápidamente. Así, se obtiene una capa inferior donde se encuentran los hematíes, los polimorfonucleares sedimentados y el Histopaque®, y una zona superior donde se encuentra el plasma, tal y como se representa en la figura 23. Entre ambas, queda una fina interfase que es donde se encuentran los linfocitos y las otras células mononucleadas.

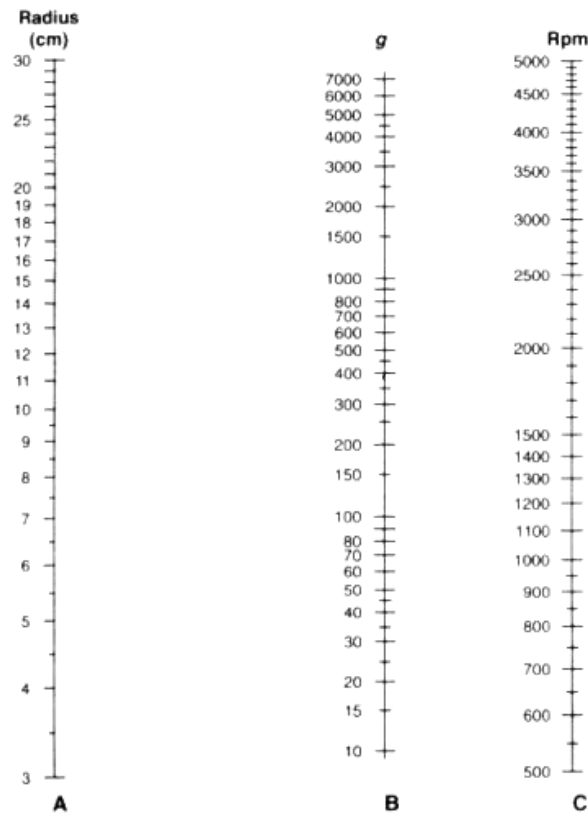


Fig. 23. Normograma para el cálculo de las rpm teniendo en cuenta la fuerza de centrifugación relativa.

A: Radio(cms): distancia entre el eje de la centrifugadora y el extremo distal del portatubos.

B: Fuerza relativa de centrifugación.

C: rpm. Se obtiene trazando una línea recta que pase por Ay B.

Esta corona celular es aspirada cuidadosamente con una pipeta Pasteur, intentando recoger la mayor parte posible, pero evitando que se mezcle con los hematíes de la zona inferior, para depositarla en otro tubo contenedor de 50ml. Ahora, se le añade nuevamente suero fisiológico hasta rellenarlo completamente.

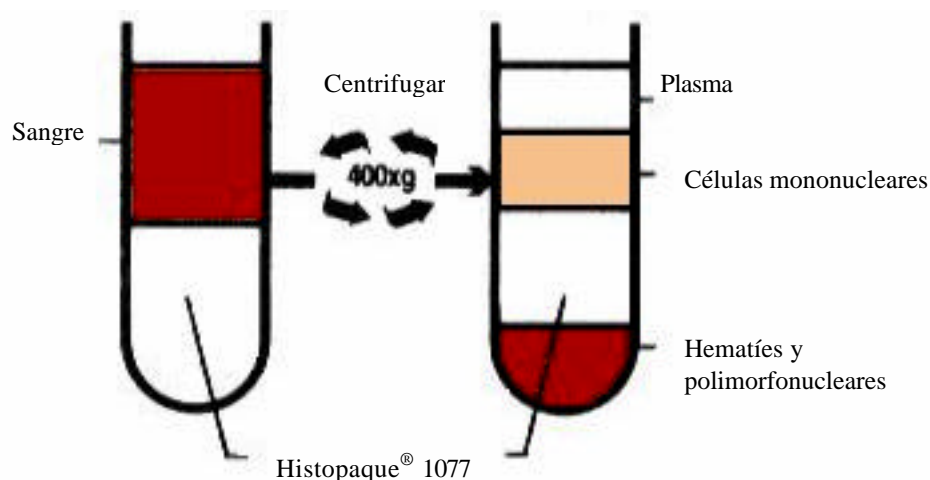


Fig. 24. Esquema de la metodología seguida para la isolación de células mononucleares de sangre periférica.

- La mezcla de células mononucleares y suero fisiológico obtenida fue centrifugada a 2500 rpm durante 7 minutos en las primeras doce muestras y a 1200 rpm (equivalente a 250xg) durante 7 minutos en las sucesivas, por el motivo ya expuesto.

El resultado es que los linfocitos junto con las restantes células mononucleares ahora se quedan en el fondo, formando una pequeña pastilla, denominada “pellet”, que es su término anglosajón. Se retira el sobrenadante, se añade nuevamente suero fisiológico hasta arriba y se vuelve a centrifugar durante otros 7 minutos más.

- Tras retirar otra vez el sobrenadante, se le añade 1ml de dimetilsulfóxido al 10% (0.9ml de suero fisiológico y 0.1ml de dimetilsulfóxido) ($\text{DMSO}=(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, Merck) al “pellet”, se introduce en un tubo de criopreservación de 1.8ml

(Nunc™) y se congela a -80°C . Para garantizar un correcto análisis de la muestra se debían haber obtenido como mínimo 5 millones de células viables por cada vial.

El proceso de congelado debe ser lento para proteger las membranas celulares y no debe alcanzar la temperatura máxima de congelado (-80°C) en un tiempo inferior a 2 horas. El DMSO protege a la célula durante la congelación, evitando su cristalización y la rotura de sus membranas.

C. Transporte de las muestras

Se realizó en una caja de material aislante llena de nieve carbónica, capaz de mantener una temperatura de -60° durante 24 horas.

4.8.2. DETECCIÓN DE LINFOCITOS: TÉCNICA DE TETRÁMEROS.

4.8.2.1. Descongelación

Al llegar a su destino, se procedía a la descongelación de las células.

Este es un paso extremadamente delicado, ya que el DMSO a temperatura ambiente es un tóxico celular. Por ello, las muestras se introducen en un baño de agua que está a 37°C durante un minuto y rápidamente se le añade medio de cultivo (10ml por muestra). De esta forma, se obtiene una dilución del DMSO al 1%, limitando mucho su toxicidad celular. Ahora se procede a centrifugar la muestra a 1200rpm durante 7 minutos, de forma que se consigue un nuevo “pellet” de células mononucleares viables y un sobrenadante de DMSO y medio de cultivo que es rápidamente desechado.

Finalmente, las células eran introducidas en un medio de cultivo, quedando ya listas para su análisis final.

4.8.2.2. Técnica de Tetrámeros

En este trabajo, se analizó la frecuencia de aparición de linfocitos citotóxicos específicos frente a dos epítomos de p53 restringidos a HLA-A2.1, que fueron el p53₂₆₄₋₂₇₂ y el p53₁₄₉₋₁₅₇ y, mediante la técnica de tetrámeros.

El tetrámero es un complejo molecular formada por una 4 moléculas recombinantes del sistema mayor de histocompatibilidad HLA-A2.1 asociadas a un determinado péptido y conjugadas con un fluorocromo. En este caso, el fluorocromo fue la ficoeritrina (PE), la cual se une a las moléculas de HLA a través de otras tantas moléculas de biotina (iTAg™ MHC Tetramers. Immunomics).

A cada HLA-A2.1 se une el nonapéptido a estudio, en este caso el p53₂₆₄₋₂₇₂ y el p53₁₄₉₋₁₅₇. Este tetrámero se unirá al linfocito T citotóxico que posea receptores específicos frente al péptido. Esta unión, además, no depende del estado funcional del linfocito T, por lo que se unirán todos los que existan.

Los tetrámeros, por lo tanto, se añaden al medio de cultivo dónde están los linfocitos procedentes de las pacientes y se incuban con ellos.

Finalmente, los linfocitos se monitorizan por citometría de flujo.

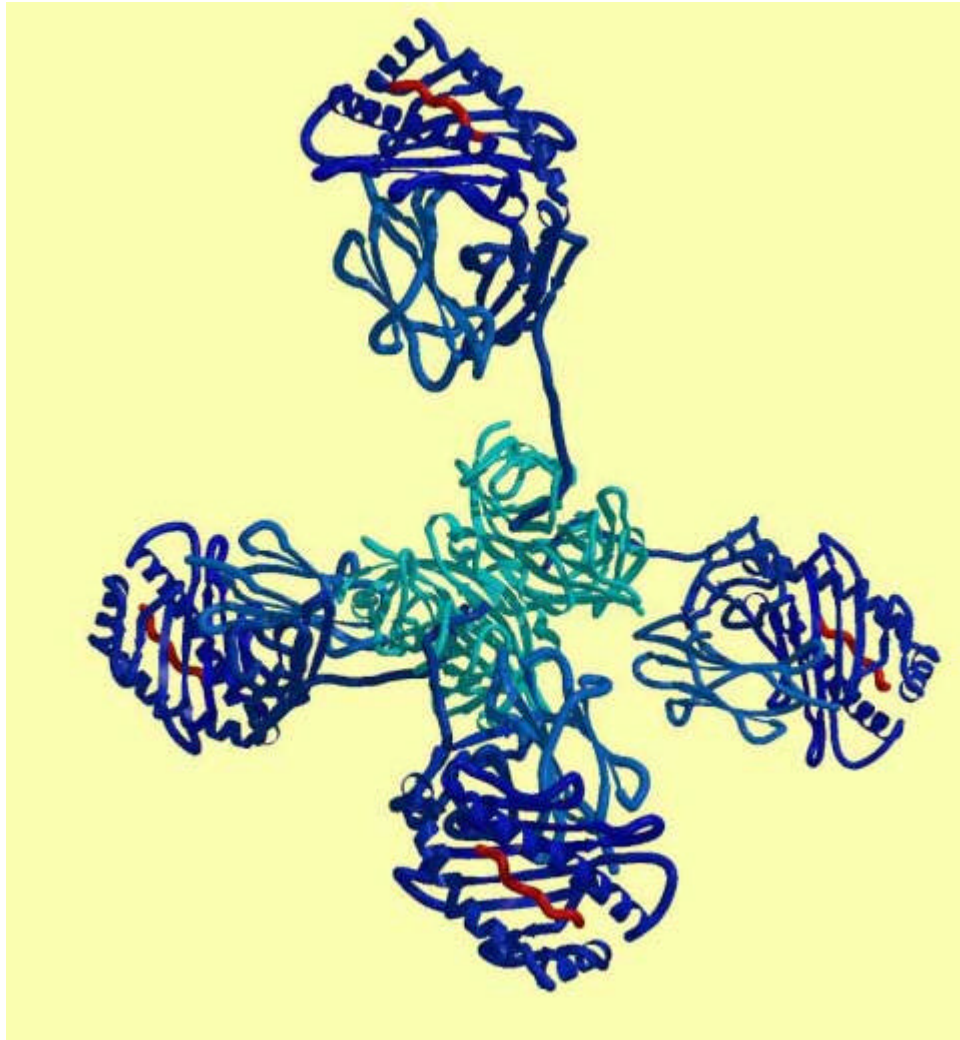


Fig. 25. Imagen tridimensional de un tetrámero de HLA. Verde: fluorocromo. Azul: moléculas de HLA. Rojo: péptido.

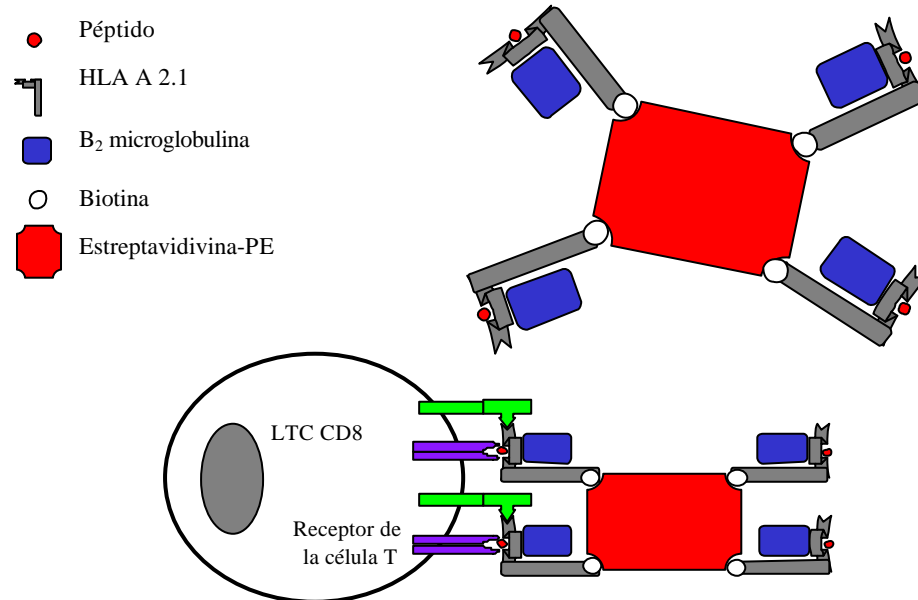


Fig. 26. Representación esquemática del tetrámero péptido-HLA y su unión al linfocito T citotóxico específico CD8.

4.8.2.3. Citometría de flujo

La citometría de flujo consiste en la medición de las propiedades físico-químicas de células o partículas en suspensión a través de un flujo laminar y una fuente de luz (láser).

Las células han de encontrarse en suspensión para ser captadas por el sistema de fluidos del citómetro de flujo. Cuando las condiciones son adecuadas, la muestra fluye en un núcleo central sin mezclarse con el líquido de arrastre (flujo laminar).

El lugar dónde tiene lugar el encuentro entre las células en flujo laminar y el haz de luz láser es la cámara de flujo.

Las células que vienen en pequeños grupos traídas por el líquido de arrastre, se disponen en línea dentro de la cámara de flujo para poder ser analizadas individualmente, gracias a la adecuada presión de la misma. Así, se centran en el haz de luz láser. Por tanto, la cámara de flujo es quien define las características del flujo, el enfoque hidrodinámico y es el lugar dónde se produce la interpretación entre el haz focalizado del láser y la muestra, en el llamado punto de interrogación.

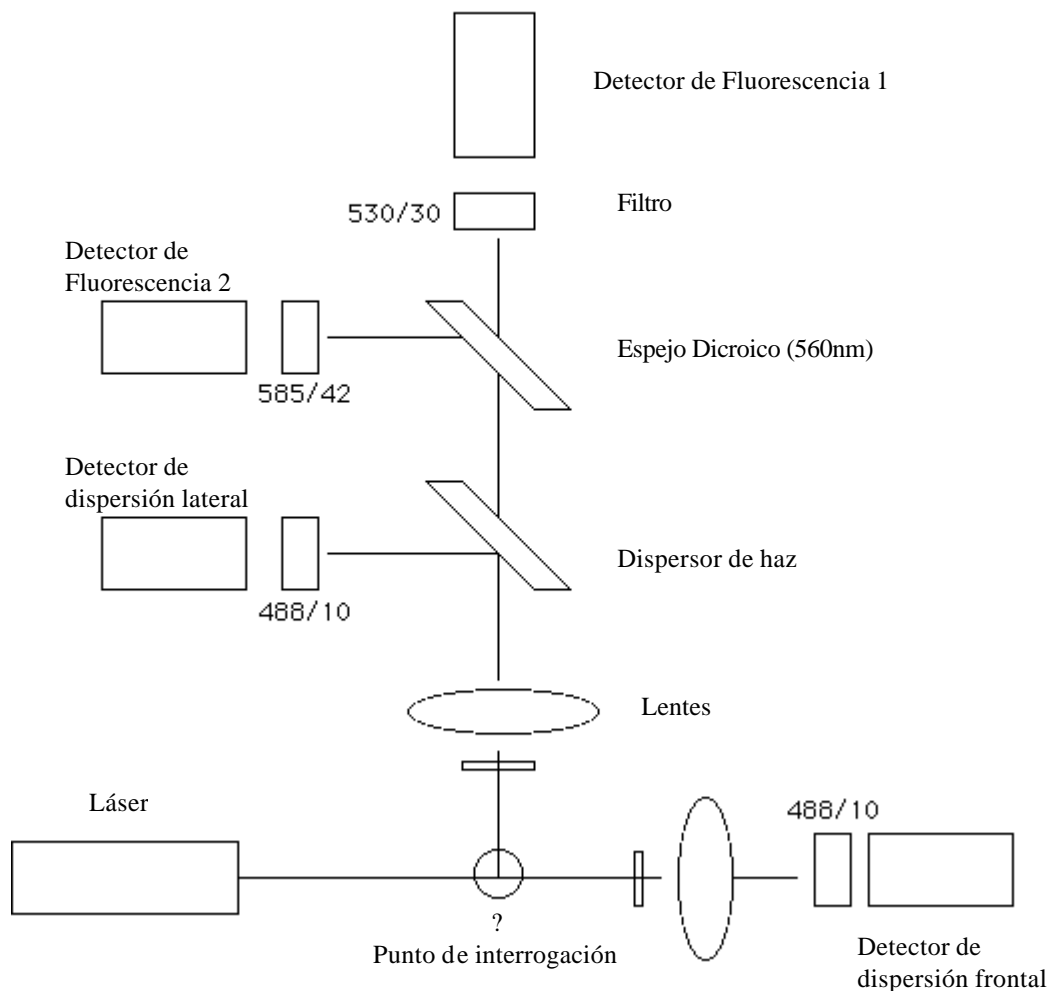


Fig. 27. Plano simplificado del típico citómetro analítico de flujo.

Las fuentes de luz láser utilizadas pueden diferenciarse por su sistema de refrigeración (aire o agua) o por su potencia (baja y alta (citómetros con función de separación celular)). El láser más utilizado es el Argón que emite a 488nm, refrigerado por aire y de baja potencia.

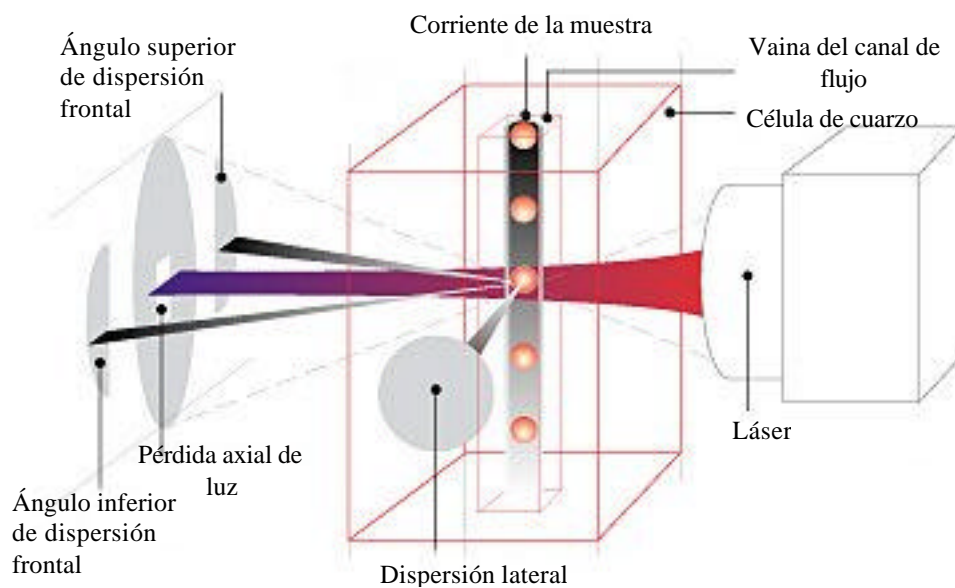


Fig. 28.Esquema de funcionamiento de un citómetro de flujo en tres dimensiones.

El citómetro de flujo analiza tamaño celular y complejidad estructural:

Tamaño celular: cuando el haz impacta con la célula en la cámara de flujo, provoca una dispersión de la luz frontal (Forward Scatter). Esta luz frontal dispersada y refractada da la información proporcional al tamaño celular.

Complejidad estructural: cuando el haz impacta con la célula en la cámara de flujo, también provoca una dispersión lateral de la luz a 90° (Side Scatter) y nos informa sobre la estructura celular interna o complejidad estructural.

Gracias a la información de tamaño celular y complejidad estructural, confrontando ambos parámetros en un “dot plot” (parcela de puntos), se pueden identificar tres grupos celulares:

- Pequeño tamaño y baja complejidad: linfocitos.
- Mayor tamaño y complejidad: monocitos.
- Tamaño similar al anterior o ligeramente mayor pero con mucha mayor complejidad: polimorfonucleares.

Pero, el citómetro, además de tamaño y complejidad celular, mide la cantidad de fluorescencia emitida por la luz dispersada a 90° tras el impacto del haz láser con la célula en la cámara de flujo.

La fluorescencia emitida por cada fluorocromo o colorante debido a la excitación del láser es normalmente detectada por un único canal de fluorescencia. La especificidad de la detección está controlada por la selección de longitudes de onda por parte de los espejos y filtros ópticos del citómetro.

Los filtros ópticos están contruidos a partir de materiales que absorben o reflejan ciertas longitudes de onda y se usan para eliminar y separar la luz recogida.

Los fluorocromos para anticuerpos más utilizados son el Isocianato de Fluoresceína (FITC) que emite a 525 nm, R-Phycoeritrin (PE) cuya emisión es a 578 nm y el Peridin Chlorophyll Protein (PerCP) que emite a una longitud de onda de 675nm. También hay otros fluorocromos para marcar ADN.

Dependiendo del citómetro de flujo, de la cantidad de fuentes láser y de los fluorocromos se pueden leer simultáneamente 2,3 o más fluorescencias en una misma célula.

Tan importante como los fluidos y la óptica en un citómetro son la electrónica y sus detectores de señal, como fotodiodos y fotomultiplicadores que convierten la señal luminosa en impulsos eléctricos. Los fotodios capturan la señal de dispersión frontal (FSC), mientras que los fotomultiplicadores tienen una gran sensibilidad y recogen las débiles señales de dispersión lateral (side scatter) y de fluorescencia.



Fig. 29. Citómetro de flujo Coulter-Epics XL™ y su sistema informático.

Sistema informático. Gracias a la informática podemos establecer criterios de selección para estudiar las distintas inmunofluorescencias. Estos criterios de selección se

denominan “gates”. La informática nos permite estudiar y presentar los datos como histogramas, parcelas de puntos, parcelas de densidad, parcelas de contorno, representaciones en 2 o 3 dimensiones, etc.

Para diferenciar las distintas poblaciones linfocitarias, el primer paso es definir los CD (Cluster Differentiation antigen) que se define como la estructura antigénica expresada en la superficie celular, caracterizada por ser reconocida por, al menos, dos anticuerpos monoclonales diferentes y tener definido el peso molecular. Cada uno de los antígenos individualizados se denomina CD seguido de un número de identificación.

Las poblaciones linfocitarias básicas son:

- Linfocitos T cooperadores: CD3+, CD4+.
- Linfocitos T citotóxicos: CD3+, CD8+.
- Linfocitos B: CD19+.
- Linfocitos asesinos naturales o NK (natural killer): CD3-, CD16+, CD56+.

Todos los linfocitos tienen el marcador CD45+ y son negativos para el marcador CD14, propio de los monocitos.

Por lo tanto y como se ha comentado anteriormente, a las células mononucleadas aisladas de las pacientes se les añadían los tetrámeros de HLA y se incubaban así durante 30 minutos a temperatura ambiente en un medio de cultivo de suero salino y albúmina bovina.

Seguidamente, se añadían los diferentes anticuerpos anti-CD durante otros 30 minutos a una temperatura de 4°C. Los anticuerpos empleados fueron: CD14-FITC (RMO52, Immunotech™, Miami, FL), CD3-ECD (HIT3a, Beckman Coulter™, Miami, FL) y el CD8-PC5 (SFCI21Thy2D3(T8), Beckman Coluter™, Miami, FL).

Tras la incubación, las células eran lavadas, desechando el medio de cultivo, y resuspendidas en 1 ml de formaldehído en suero salino al 0.5%.

Finalmente, se procedía a su análisis mediante citometría de flujo.

Dada la baja frecuencia de eventos esperados, se analizaron 10^6 eventos por cada muestra. Así, se pudo estimar la frecuencia verdadera de linfocitos específicos con un bajo margen de error.

Cabe señalar que el análisis de una muestra para linfocitos específicos contra los 2 péptidos (p53₂₆₄₋₂₇₂ y p53₁₄₉₋₁₅₇) requiere, el análisis de 2 millones de linfocitos CD8. Asumiendo las pérdidas de células durante el proceso de isolación de las células mononucleadas de sangre periférica y las debidas a la congelación y descongelación de la muestra, se requieren de 20 a 40 ml de sangre como mínimo por paciente. En este estudio se extrajeron 50ml. A pesar de ello, la probabilidad de obtener un insuficiente recuento celular no es despreciable.

Para el análisis de las muestras se empleo un citómetro de 4 colores de inmunofluorescencia y doble láser ajustado a la mínima velocidad (máximo de 1000 eventos por segundo) a fin de permitir un análisis lo más preciso posible, modelo Coulter-Epics XL (Beckman Coulter™, Miami, FL). El sistema de refrigeración del láser es de aire. Los datos fueron analizados en tiempo real usando un potente sistema informático (Beckman-Coulter System II software).

El resultado de la cuantificación de los linfocitos específicos para los tetrámeros se expreso como frecuencias (1/1000, por ejemplo) o como frecuencias recíprocas (1000, siguiendo con el ejemplo anterior).

Como control positivo se emplearon dos líneas de linfocitos T citotóxicos específicos contra los epítotos p53₂₆₄₋₂₇₂ y p53₁₄₉₋₁₅₇ de la proteína salvaje (Hoffmann et al, 2000).

Como control negativo se empleó la población HLA A2 negativa, cuyo resultado es inespecífico por definición al tratarse de dos epítomos restringidos a HLA A2+. El punto de corte para discriminar un resultado positivo de uno negativo se estableció, por tanto, en el percentil 99 de la frecuencia de linfocitos específicos de los sujetos HLA A2-. Como se analizaron dos péptidos, se eligió el percentil 99 superior de las dos series como punto de corte para ambas poblaciones de linfocitos T.

5. RESULTADOS

5.1. PACIENTES

Desde Marzo/01 hasta Enero/02 43 pacientes con cáncer de mama que fueron atendidas en los Servicios de Oncología del Hospital Clínico de Zaragoza y del Hospital San Jorge de Huesca prestaron su autorización para participar en el estudio y fueron estudiados.

Tras determinación del HLA y de la factibilidad de la toma de biopsia se seleccionaron 23 pacientes. De los 20 pacientes que no fueron finalmente seleccionados, 15 eran HLA A2-. En los otros 5 casos el motivo de no-inclusión fue que la enfermedad no se consideró lo suficientemente accesible, la cual requería someter a la paciente a una intervención innecesaria y de riesgo. En 3 de ellas se llegó a determinar el HLA, que fue positivo para el locus A2.

De las 23 pacientes seleccionadas, 16 eran HLA A2+ y 6 eran HLA A2-, las cuales se emplearon como controles negativos. En un caso el HLA no se pudo finalmente conocer por motivos que se explicaran más adelante.

De todas ellas, 15 pacientes (65.21%) pertenecían al Hospital Clínico de Zaragoza y 8 (34.78%) al de Huesca.

La edad mediana de los pacientes de la muestra fue de 72 años (rango: 44-89) y la media de 69.73 años, con una desviación típica de 13.27.

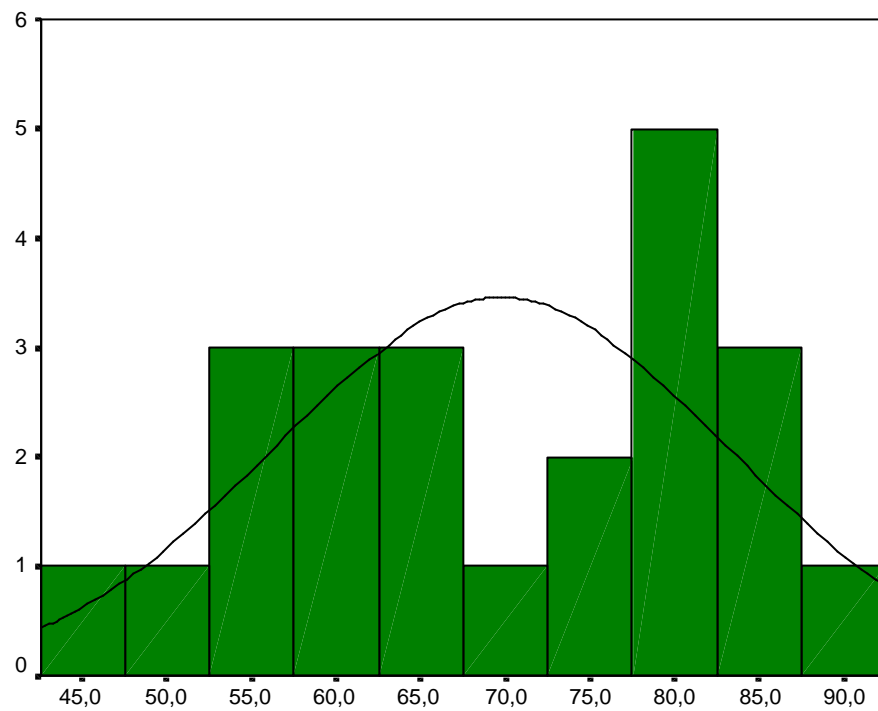


Gráfico 4. Histograma de edad de la muestra.

La distribución por sexos fue de 22 mujeres (95.65%) y 1 hombre (4.34%).

Todos los pacientes eran de raza blanca.

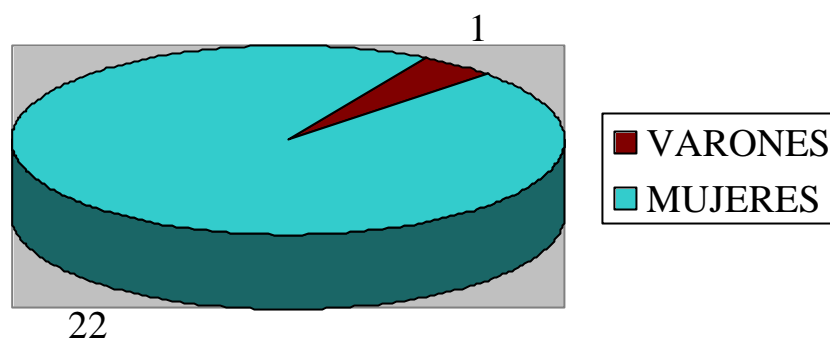


Gráfico 5. Distribución por sexo de los pacientes estudiados.

Todas las pacientes fueron diagnosticadas de cáncer de mama en el periodo comprendido entre Octubre de 1983 y Enero de 2002.

<i>Periodo</i>	<i>Nº casos diagnosticados (%)</i>
< 1999	5 (21.73%)
1999-2000	4 (17.39%)
2001	12 (52.17%)
2002	2 (8.69%)

Tabla. 10. Número de casos diagnosticados según periodo de tiempo.

De los 23 tumores, 19 (82.60%) fueron carcinomas ductales infiltrantes, 2 (8.69%) carcinomas lobulillares infiltrantes, 1 (4.34%) carcinoma papilar infiltrante y 1 (4.34%) fue un carcinoma cuyo subtipo no fue especificado en el informe anatomopatológico.

En el gráfico 6 se muestran las frecuencias relativas de los diferentes tipos de carcinoma mamario que se observaron. Tal y como ocurre en la población general, el carcinoma ductal infiltrante fue el tipo más frecuente.

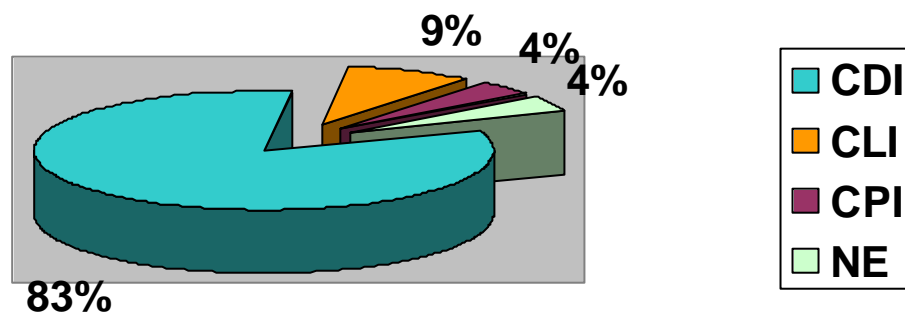


Gráfico 6. Distribución por tipos de tumor. CDI: carcinoma ductal infiltrante; CLI: carcinoma lobulillar infiltrante; CPI: carcinoma papilar infiltrante; NE: tipo de carcinoma no especificado.

En un 47.82% (n=11) de los casos el grado histológico de malignidad fue medio o grado II. El resto de la distribución se resume en la tabla 11.

Grado histológico	Nº Casos (%)
I	0 (0%)
II	11 (47.82%)
III	5 (21.73%)
NE	7 (30.43%)

Tabla. 11. Grado histológico. NE: no evaluado o no evaluable.

La distribución por estadios al diagnóstico y en el momento de la inclusión en el estudio se muestra en las tablas y gráficos siguientes.

ESTADIO	Nº CASOS (%)
I	2 (8.69%)
IIA	5 (21.73%)
IIB	6 (26.08%)
IIIA	2 (8.69%)
IIIB	3 (13.04%)
IV	5 (21.73%)

Tabla 12. Distribución de casos por estadios al diagnóstico en valores absolutos y porcentajes relativos.

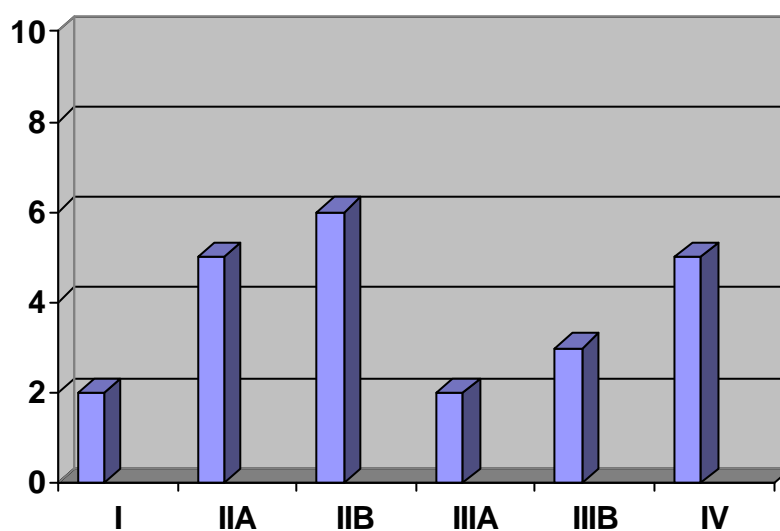


Gráfico 7. Distribución por estadios al diagnóstico en valores absolutos.

ESTADIO	Nº CASOS (%)
I	1 (4.34%)
IIA	4 (17.39%)
IIB	4 (17.39%)
IIIA	0 (0%)
IIIB	2 (8.69%)
IV	12 (52.17%)

Tabla 13. Distribución de casos por estadios a la inclusión en valores absolutos y porcentajes relativos.

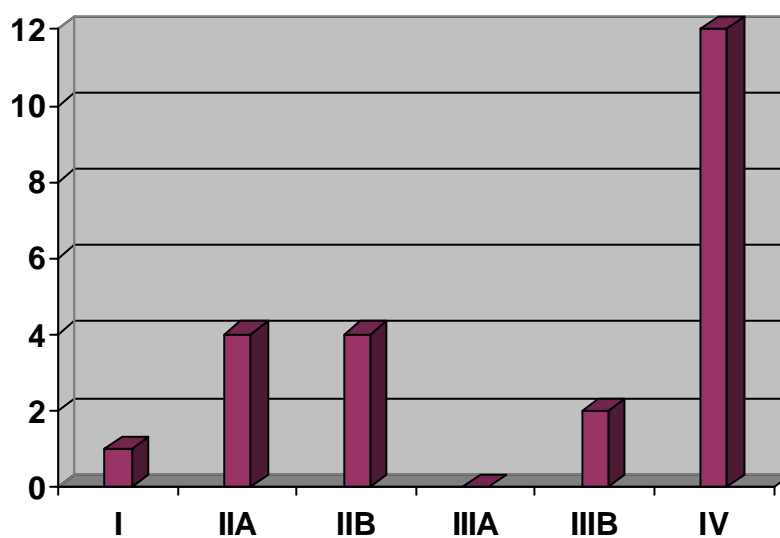


Gráfico 8. Distribución por estadios en el momento de la inclusión en valores absolutos.

En la tabla 14 se muestran la edad media y mediana de edad y la distribución por sexos en función del estadio en el momento de la inclusión en el estudio.

ESTADIO	N	Media	Mediana	Rango	Mujer	Hombre
I	1	61	-	-	1 (100%)	0 (0%)
IIA	4	74.5	79	54-86	3 (75%)	1 (25%)
IIB	4	68.25	73.5	44-82	4 (100%)	0 (0%)
IIIA	0	-	-	-	0 (0%)	0 (100%)
IIIB	2	57	57	56-58	2 (100%)	0 (0%)
IV	12	71.5	72.5	51-89	12 (100%)	0 (0%)

Tabla 14. Edad media, mediana de edad y distribución por sexos en función del estadio a la inclusión. Nota: En la columna de la media correspondiente al estadio I, al existir únicamente un caso, se muestra el valor del mismo.

De las 23 pacientes, 12 (52.17%) tenían metástasis en el momento de entrar en el estudio.

En la tabla 15 se muestra el número de localizaciones metastásicas.

n° de localizaciones metastásicas	n° pacientes
1	7
2-3	2
>3	3

Tabla 15. Número de localizaciones metastásicas de los pacientes.

En el gráfico 9 se señala cual fue la localización predominante de la enfermedad diseminada. En los casos en los cuales existía más de un órgano afecto se señaló aquel cuya afectación confiere peor pronóstico a la enfermedad. Para ello, se siguió la escala, de mejor a peor pronóstico:

- Linfocutánea.
- Ósea.
- Pleuropulmonar.
- Hepática.

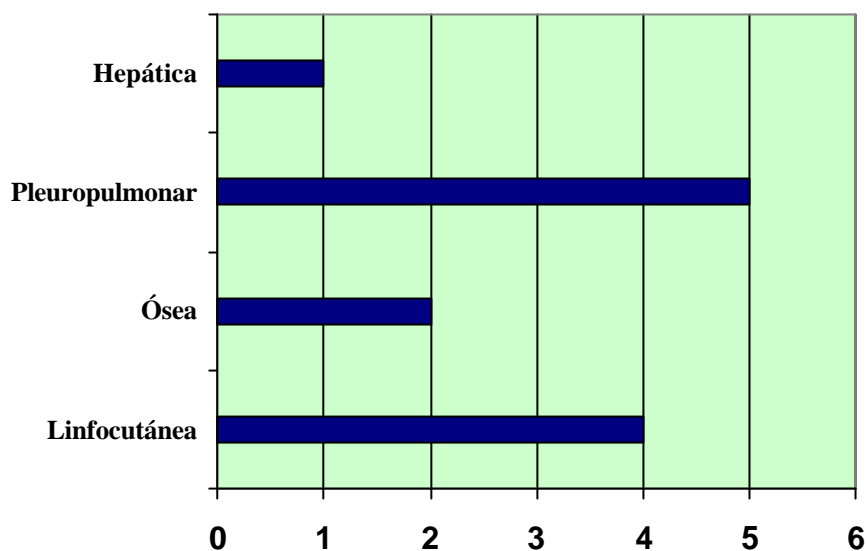


Gráfico 9. Lugar predominante de la enfermedad metastásica (valores absolutos).

Debido a que se trata de un estudio inmunológico, se puso especial énfasis en que los pacientes no estuvieran inmunodeprimidos más allá de lo inevitable debido a su enfermedad.

En el momento de hacerse la inclusión 3 pacientes estaban recibiendo tratamiento citotóxico, asociado a hormonoterapia en 2 casos. No obstante, la cifra tanto de leucocitos totales como de linfocitos era rigurosamente normal en el momento de hacerse la extracción para el estudio.

En un caso, la extracción de sangre para el análisis de linfocitos T se realizó al cabo de 7 semanas de haber recibido tratamiento con altas dosis de quimioterapia con trasplante autólogo de células madres de sangre periférica. El recuento hematológico era rigurosamente normal, aunque se acepta que pudiera existir cierto grado de inmunosupresión cualitativa que no fue confirmada.

Otro paciente recibía de forma concurrente un tratamiento experimental de mantenimiento con vacunas de mucopolisacáridos. Este hecho se consideró irrelevante de cara a la determinación de linfocitos anti-p53 y en todo caso se esperaría un efecto de amplificación al tratarse de un tratamiento potenciador del sistema inmunológico.

En el gráfico 10 se resumen los tratamientos oncológicos concomitantes que estaban recibiendo las pacientes.

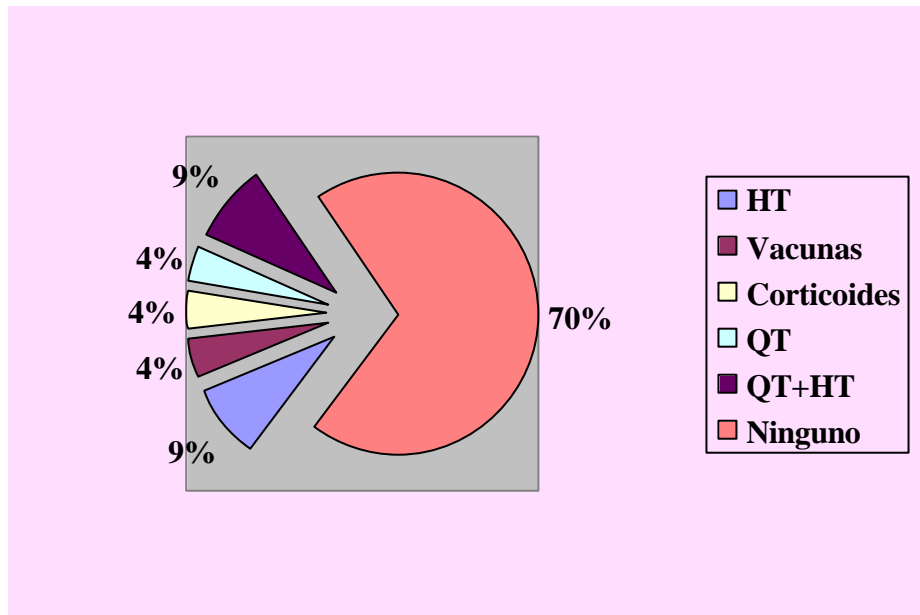


Gráfico 10. Tratamientos oncológicos que recibían las pacientes a la inclusión en el estudio.

5.2 TIPAJE HLA

El tipaje HLA de clase I se les realizó a todas las pacientes que prestaron su autorización para participar en el estudio, excepto a una de ellas. El motivo de esta violación del protocolo fue que la muestra no fue válida para su análisis por haber transcurrido más de 24 horas desde la extracción y no haberse conservado en buenas condiciones. Posteriormente, se desestimó la repetición de la misma porque se obtuvo un bajo recuento celular en el análisis de linfocitos.

En el gráfico 11 se especifican las frecuencias de los diversos alelos de HLA A, B y C que se obtuvieron.

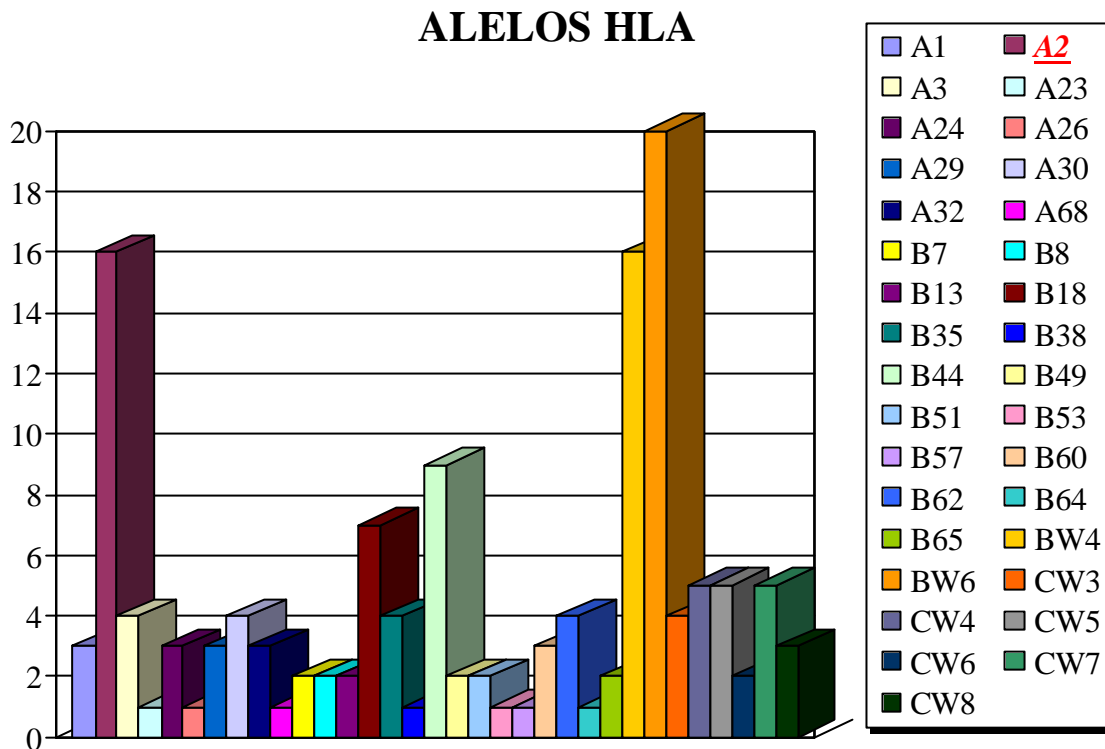


Gráfico 11. Frecuencias de los alelos HLA A, B y C de los pacientes.

Se identificaron 33 alelos diferentes. Entre ellos, el que se presentó con mayor frecuencia fue el BW6, que lo hizo en 20 casos (90.90% de las 22 pacientes a las que se les pudo determinar el HLA).

El alelo A2 estaba presente en 16 casos, lo que representa un 72.72% del total de las 22 pacientes de la muestra. Lógicamente, este porcentaje es superior al encontrado en la población general, en la que es del 50% aproximadamente, ya que se trata de una población seleccionada y sesgada precisamente por este parámetro.

En los gráficos y tablas siguientes se representan las frecuencias de los alelos obtenidos según los locus A, B ó C.

ALELOS HLA A

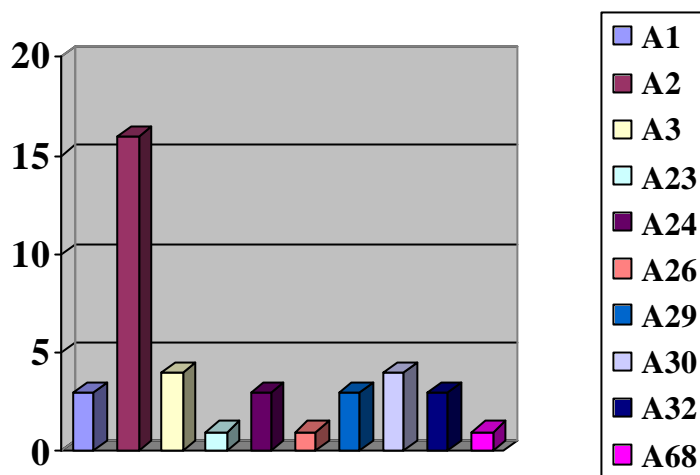


Gráfico 12. Frecuencia de aparición de bs alelos HLA A en valores absolutos.

Locus HLA A	nº
A1	3
A2	16
A3	4
A23	1
A24	3
A26	1
A29	3
A30	4
A32	3
A68	1

Tabla 16. Locus HLA A.

ALELOS HLA B

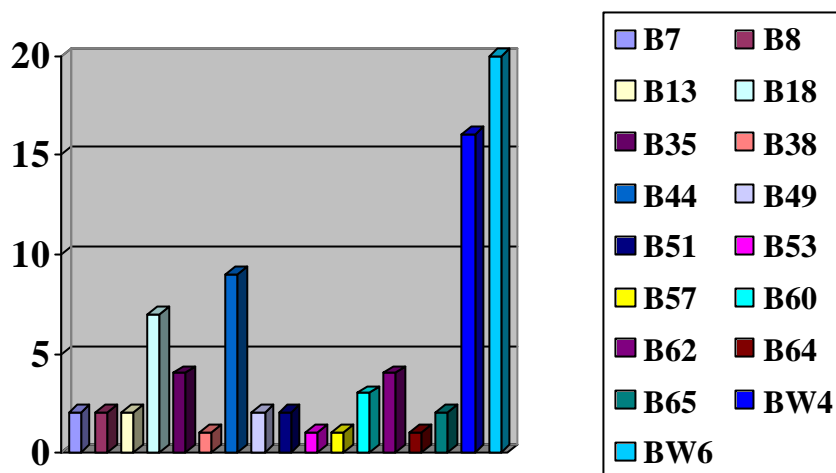


Gráfico 13. Frecuencia de aparición de los alelos HLA B en valores absolutos.

Locus HLA B	nº	Locus HLA B	nº
B7	2	B8	2
B13	2	B18	7
B35	4	B38	1
B44	9	B49	2
B51	2	B53	1
B57	1	B60	3
B62	4	B64	1
B65	2	BW4	16
BW6	20		

Tabla 17. Locus HLA B.

ALELOS HLA C

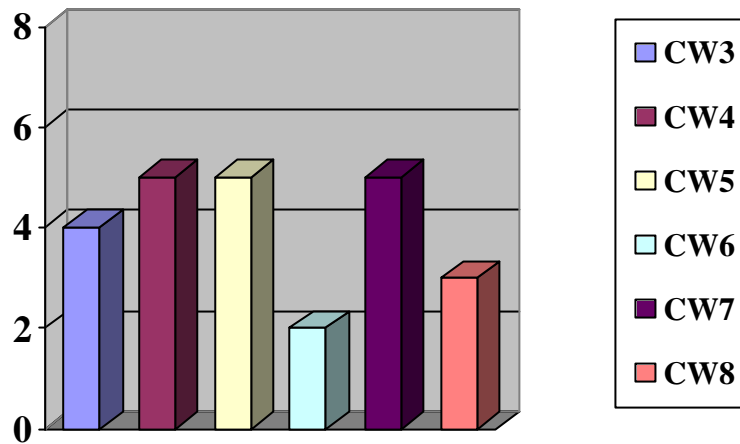


Gráfico 14. Frecuencia de aparición de los alelos HLA C en valores absolutos.

Locus HLA C	nº
CW3	4
CW4	5
CW5	5
CW6	2
CW7	5
CW8	3

Tabla 18. Locus HLA C.

Como ya se ha señalado, la presencia del alelo HLA A2+ es requisito indispensable para la presentación antigénica de los dos epítomos de la proteína p53 a estudio (el 264-272 y el 149-157).

Por ello, las pacientes con tipaje HLA A2-, que son incapaces de realizar la presentación antigénica de dichos péptidos de p53 característica de los pacientes HLA A2+, fueron incluidos en el estudio como controles negativos y garantía de fiabilidad de la técnica.

A continuación y como detalle meramente descriptivo, se representan la distribución de edad, sexo y estadio de ambas subpoblaciones (pacientes HLA A2- y HLA A2+).

Mediana	Media	DT	Rango
70	69.31	13.46	44-87

Tabla 19. Descriptivos de la variable edad de los pacientes HLA A2+. DT: desviación típica.

De los 16 pacientes HLA A2+, 15 eran mujeres (93.75%) y 1 era varón (6.25%). En este subgrupo la edad mediana fue de 70 años (rango 44-87) con una media de 69.31.

La distribución por estadios se muestra en el gráfico 15.

DISTRIBUCIÓN POR ESTADIOS EN LOS PACIENTES HLA A2+

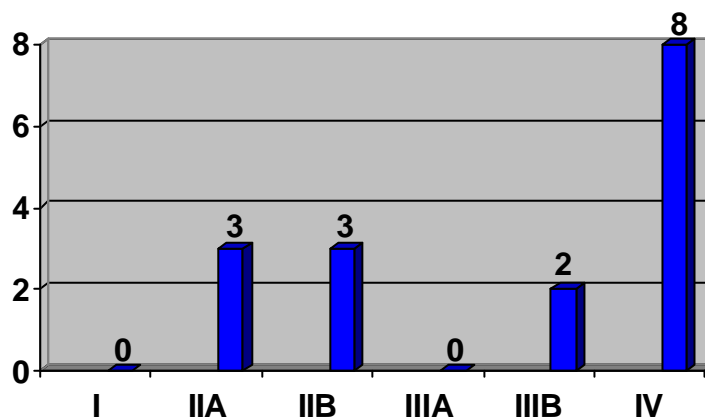


Gráfico 15. Distribución por estadios en pacientes HLA A2+.

En el subgrupo de los pacientes cuyo tipaje HLA A2- todos los casos eran mujeres (6 casos, 100%). La mediana de edad fue de 66.5 años (rango 51-89), mientras que la media era de 68.83.

Mediana	Media	DT	Rango
66.5	68.83	14.33	51-89

Tabla 20. Datos demográficos de las pacientes HLA A2+.

La distribución por estadios en este subgrupo se muestra en el gráfico 16. Al igual que ocurrió con el grupo de pacientes HLA A2+ el estadio más frecuente fue el IV.

DISTRIBUCIÓN POR ESTADIOS EN LOS PACIENTES HLA A2-

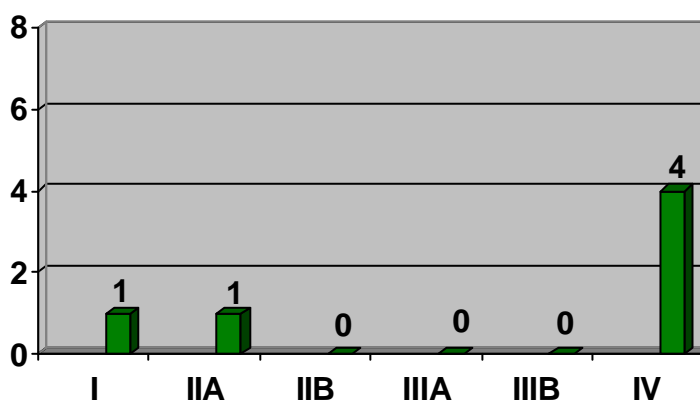


Gráfico 16. Distribución por estadios en pacientes HLA A2-.

5.3. ANÁLISIS DEL TEJIDO

Se analizaron tanto la sobreexpresión de proteína p53 como el estado de otros marcadores pronósticos en el tejido tumoral de 23 pacientes.

En 13 pacientes (56.52%) se analizó el tumor primario en la pieza de mastectomía, mientras que en otros 3 casos más (13.04%) se realizó el análisis del tumor primario procedente de una biopsia quirúrgica diagnóstica. En los 7 casos restantes se analizaron las recidivas presentes en los siguientes órganos: piel (4 casos, 17.39%), pleura (1 caso, 4.34%), líquido pleural (1 caso, 4.34%) y ganglio linfático (1 caso, 4.34%).

Tejido analizado	nº casos
Pieza de mastectomía	13
Recidiva cutánea	4
Tumor 1º (biopsia)	3
Pleura (biopsia)	1
Adenopatía (citología)	1
Líquido pleural (citología)	1

Tabla 21. Tejido tumoral analizado para determinar los marcadores pronósticos.

Lamentablemente, en los dos casos en los que se había realizado una citología (tanto de líquido pleural como de ganglio linfático) no se pudo determinar ningún marcador, ni tan siquiera la sobreexpresión de p53, dada la dispersión de la celularidad de la muestra.

Por lo tanto, sólo se pudieron analizar correctamente 21 muestras de tejido tumoral (91.30%).

A continuación se muestran las frecuencias de detección de cada marcador pronóstico estudiado. Nótese como el “status” de p53 como el de los receptores hormonales se analizó en todos los pacientes. El estado del resto de marcadores es variable, debido a que la determinación o no de los mismos se dejó a criterio del patólogo responsable en cada caso.

p53

El análisis de p53 en el tumor, por tanto, se efectuó en los 21 pacientes. La frecuencia de sobreexpresión de p53 se resume en el gráfico 17.

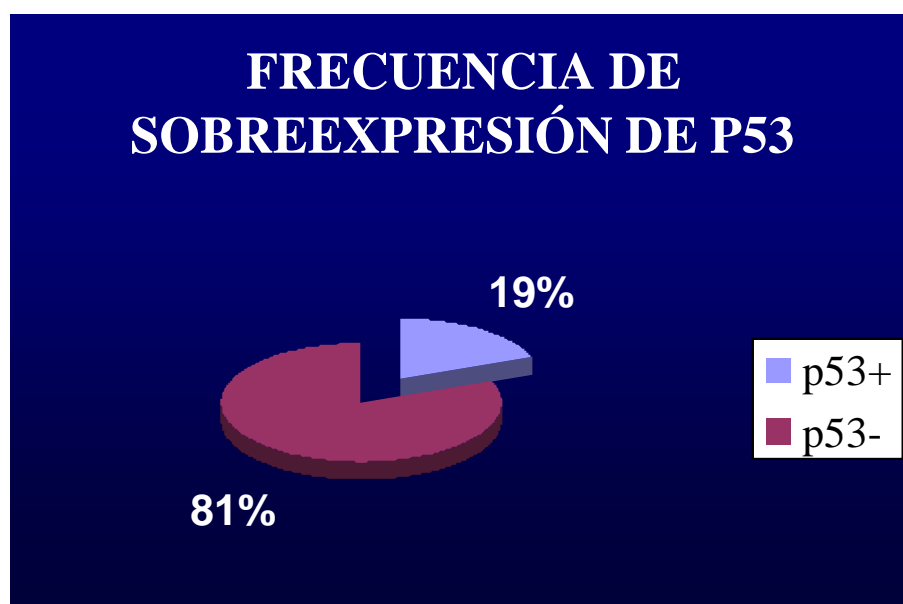


Gráfico 17. Frecuencia de sobreexpresión de proteína p53 en tejido detectada por inmunohistoquímica.

De las 21 pacientes, en 4 (19%) de ellas se comprobó una sobreexpresión de la proteína p53 detectada por inmunohistoquímica. Este porcentaje es extrapolable al descrito en la literatura en cáncer de mama, el cual se sitúa entre el 20% y el 60% según las series.

En los 17 casos restantes (81%) la proteína p53 fue negativa.

Si se analiza el porcentaje de sobreexpresión de p53 según el HLA, se obtiene que la sobreexpresión de p53 en los pacientes HLA A2+ fue de un 20% (3/15), así como en los pacientes HLA A2- que también fue de un 20% (1/5).

Como dato anecdótico, señalar que en la paciente con HLA desconocido p53 fue negativa.

Receptores hormonales

El “status” de los receptores hormonales se determinó, así mismo, en los 21 pacientes y se representa gráficamente a continuación.



Gráfico 18. Porcentaje de expresión de receptores de estrógenos en tejido tumoral.



Gráfico 19. Porcentaje de expresión de receptores de progesterona en tejido tumoral.

De los 21 pacientes, 13 (62%) tenían los receptores de estrógenos positivos y 8 (38%) negativos.

En los tumores de 15 pacientes (71%) no se comprobó la expresión de receptores de progesterona, mientras que en los otros 6 sí (29%).

Del total de pacientes estudiados, 5 (24%) expresaron ambos tipos de receptores hormonales en sus tumores, 8 (38%) únicamente expresaron receptores de estrógenos y 1 (4.76%) únicamente el receptor de progesterona. En los 7 casos restantes (33%), ambos receptores hormonales fueron negativos.

Ki-67

El marcador de proliferación celular ki-67 sólo se determinó en 8 pacientes, siendo positivo en 7 de ellos (87.5%).



Gráfico 20. Porcentaje de sobreexpresión del marcador de proliferación celular Ki-67 en tejido tumoral.

C-erb-B2

La expresión de proteína c-erb-b2 en el tumor se determinó en 12 casos, resultando positiva por inmunohistoquímica en 4 de ellos (33%).

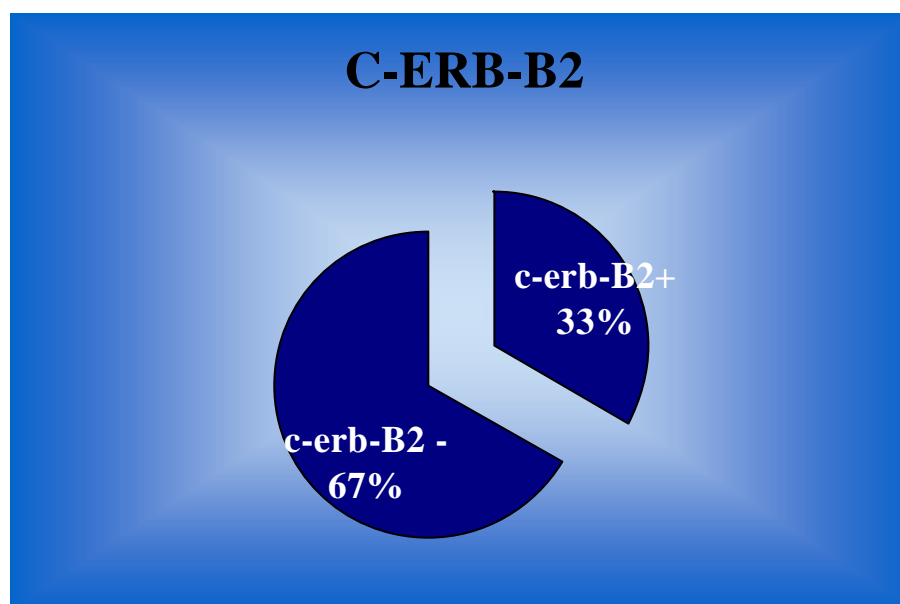


Gráfico 21. Porcentaje de detección de la proteína c-erb-B2 tejido tumoral.

Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF)

El EGF se determinó en 7 pacientes, resultando en todos ellos negativo.

En las tablas siguientes se muestran los diferentes factores pronósticos en tejido tumoral según la presencia o ausencia del alelo HLA A2 en los pacientes.

Paciente Nº	HLA A2	P53	RE	RP	KI-67	C-ERB-B2	EGFR
2	+	-	-	-	ne	ne	ne
3	+	+	-	-	ne	ne	ne
6	+	ne	ne	ne	ne	+	ne
8	+	-	+	-	ne	ne	ne
10	+	+	-	-	ne	ne	ne
11	+	-	+	-	ne	ne	ne
12	+	-	+	-	ne	ne	ne
21	+	-	++	+	ne	ne	ne
22	+	-	-	-	ne	ne	ne
27	+	-	+	+	+	-	-
29	+	-	+++	+++	ne	-	ne
32	+	-	-	-	ne	ne	ne
35	+	-	+	-	+	-	-
36	+	+	-	-	+	-	-
46	+	-	+	-	-	-	-
48	+	-	+	+	+	+	-

Tabla 22. Factores pronóstico histopatológicos en cada uno de los pacientes HLA A2+. ne: no evaluado.

Pacientes HLA A2+		
	-	+
P53	12 (80%)	3 (20%)
RE	6 (40%)	9 (60%)
RP	11 (73%)	4 (27%)
Ki-67	1 (20%)	4 (80%)
c-erb-b2	5 (71%)	2 (29%)
EGF	5 (100%)	0

Tabla 23. Frecuencia de expresión de factores pronósticos en los tumores de los pacientes HLA A2+.

Paciente N°	HLA A2	P53	RE	RP	KI-67	C-ERB-B2	EGFR
1	-	+	-	-	ne	Ne	ne
7	-	-	+	-	ne	+++	ne
43	-	-	-	+	+	-	-
44	-	-	+	-	+	-	ne
49	-	ne	ne	ne	ne	+	ne
52	-	-	+	-	ne	Ne	ne

Tabla 24. Factores pronóstico histopatológicos en cada uno de los pacientes **HLA A2-**. ne: no evaluado.

Pacientes HLA A2-		
	-	+
P53	4 (80%)	1 (20%)
RE	2 (40%)	3 (60%)
RP	4 (80%)	1 (20%)
Ki-67	0	3 (100%)
c-erb-b2	3 (60%)	2 (40%)
EGF	1 (100%)	0

Tabla 25. Frecuencia de expresión de factores pronósticos en los tumores de los pacientes **HLA A2-**.

Aunque irrelevante para el estudio, al observar las frecuencias relativas se puede comprobar que ambas subpoblaciones (pacientes HLA A2+ vs A2-) estaban bien balanceadas en cuanto a marcadores pronósticos en el tumor.

Finalmente, en las tablas 26 y 27 se correlacionan los diferentes factores pronósticos histopatológicos con la presencia o ausencia de sobreexpresión de p53.

<i>Paciente n°</i>	<i>P53</i>	<i>RE</i>	<i>RP</i>	<i>KI-67</i>	<i>C-ERB-B2</i>	<i>EGFR</i>
1	+	-	-	ne	ne	ne
3	+	-	-	ne	+	ne
10	+	-	-	ne	ne	ne
36	+	-	-	+	-	-

Tabla 26. Factores pronósticos en cada uno de los pacientes con sobreexpresión de p53 en el tumor. ne: no evaluado.

Pacientes p53+		
	-	+
RE	4 (100%)	0
RP	4 (100%)	0
Ki-67	0	1 (100%)
c-erb-b2	1 (50%)	1 (50%)
EGF	1 (100%)	0

Tabla 27. Frecuencia de expresión de factores pronósticos en los pacientes con sobreexpresión de p53 en el tumor.

<i>Paciente n°</i>	<i>P53</i>	<i>RE</i>	<i>RP</i>	<i>KI-67</i>	<i>C-ERB-B2</i>	<i>EGFR</i>
2	-	-	-	ne	Ne	ne
7	-	+	-	ne	+++	ne
8	-	+	-	ne	Ne	ne
11	-	+	-	ne	Ne	ne
12	-	+	-	ne	Ne	ne
21	-	++	+	ne	Ne	ne
22	-	-	-	ne	Ne	ne
27	-	+	+	+	-	-
29	-	+++	+++	ne	-	ne
32	-	-	-	ne	Ne	ne
35	-	+	-	+	-	-
43	-	-	+	+	-	-
44	-	+	-	+	-	ne
46	-	+	-	-	-	-
47	-	+	+	+	-	-
48	-	+	+	+	+	-

Tabla 28. Factores pronóstico en cada uno de los pacientes con **ausencia de sobreexpresión de p53** en el tumor. ne: no evaluado.

Pacientes P53-		
	-	+
RE	4 (25%)	12 (75%)
RP	10 (62.5%)	6 (37.5%)
Ki-67	1 (14%)	6 (86%)
c-erb-b2	7 (78%)	2 (22%)
EGF	6 (100%)	0

Tabla 29. Frecuencia de expresión de factores pronósticos en las pacientes con **ausencia de sobreexpresión de p53** en el tumor.

Como se puede observar, existe una mayor relación entre la sobreexpresión de p53 y el resto de factores pronósticos desfavorables, muy especialmente, tal y como se describe en la literatura, con los receptores hormonales negativos y la sobreexpresión de c-erb-b2.

Incluso en esta pequeña serie, tras aplicar la prueba exacta de Fisher, las diferencias observadas alcanzan la significación estadística en el caso de los receptores hormonales ($p = 0.01$), no así en el caso de la sobreexpresión de c-erb-b2 ($p = 0.49$). Las tablas de contingencia 2 x 2 diseñadas para ambas variables se muestran a continuación.

	P53+	P53-
RH+	0	14
RH-	4	3

Tabla 30. Tabla de contingencia 2 x 2 del “status” de RH (receptores hormonales) y p53 en el tumor. Tamaño muestral: 21.

	P53+	P53-
C-ERB-B2+	1	2
C-ERB-B2-	1	7

Tabla 31. Tabla de contingencia 2 x 2 del “status” de c-erb-B2 y p53 en el tumor. Tamaño muestral: 11.

5.4. LINFOCITOS ANTI-P53

Se determinó la frecuencia de aparición de linfocitos T citotóxicos anti p53₂₆₄₋₂₇₂ y anti p53₁₄₉₋₁₅₇ en sangre periférica de 23 pacientes con cáncer de mama.

En 4 casos (17.39%), el bajo recuento celular en la muestra enviada impidió obtener un resultado valorable. De los 4 pacientes, 2 eran HLA 2+, otro HLA A2- y el cuarto se trataba del paciente en el cuál no se pudo conocer el tipaje HLA y en el que no se repitió precisamente por este motivo.

En 19 casos (82.60%), se pudieron determinar los linfocitos T existentes dirigidos contra el péptido 264-272.

Sin embargo y de nuevo por problemas de recuento celular, únicamente se analizó la frecuencia de linfocitos T específicos frente al epítipo 149-157 en 15 pacientes (65.21%).

A modo de ejemplo, en los gráficos siguientes se muestran los “dot plots” obtenidos por citometría de flujo de una paciente HLA A2+ y otra HLA A2-. Los resultados se refieren a los tetrámeros de linfocitos T citotóxicos específicos contra el péptido 264-272 de la proteína p53.

El cuadrante superior derecha del tercer “dot plot” de cada paciente es el que corresponde a los tetrámeros de linfocitos T citotóxicos específicos frente a p53₂₆₄₋₂₇₂.

Se puede apreciar claramente como, en el caso de la paciente HLA A2+, en ese cuadrante existe una cantidad significativa de puntos, lo cual refleja la existencia de una frecuencia significativa de linfocitos T anti-p53 en su suero. El valor, en este caso concreto, fue de 1/2262.

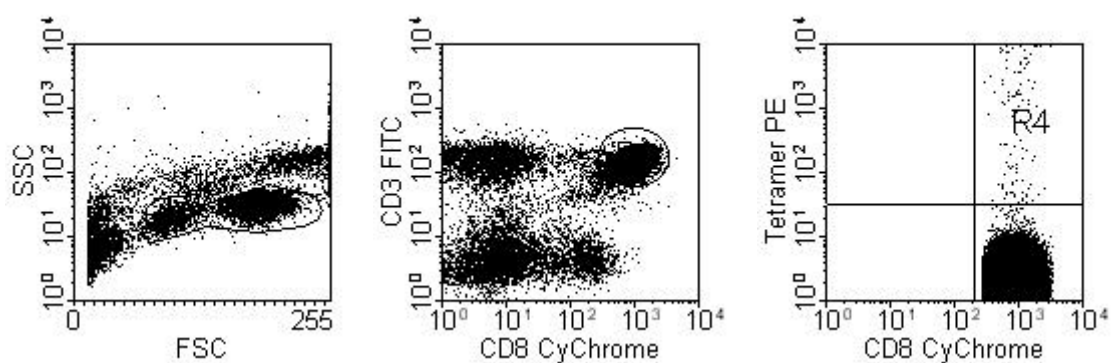


Gráfico 22. Frecuencia de tetrámeros de células CD3+, CD8+ y CD14- específicas contra p53₂₆₄₋₂₇₂ detectadas por citometría de flujo en una paciente HLA A2+.

En el caso de la paciente HLA A2-, por el contrario, el cuadrante de los tetrámeros está prácticamente en blanco, reflejando la ausencia de linfocitos T anti-p53 en sangre periférica. En este segundo caso, el valor fue de 1/37789.

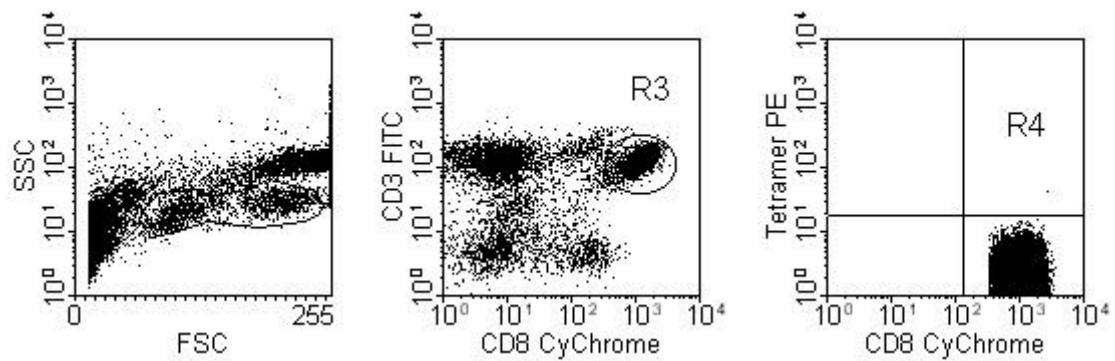


Gráfico 23. Frecuencia de tetrámeros de células CD3+, CD8+ y CD14- específicas contra p53₂₆₄₋₂₇₂ detectadas por citometría de flujo en una paciente HLA A2-.

En las tablas siguientes se muestran, una por una, las frecuencias de linfocitos T específicos dirigidos tanto contra el epítipo 264-272 como 149-157 de la proteína p53 detectados para cada uno de los 23 pacientes estudiados.

Paciente nº	Linfocitos T anti p53 ₂₆₄₋₂₇₂
1	(bajo recuento celular)
2	(bajo recuento celular)
3	1/1825
6	1/2262
7	1/37789
8	1/8469
10	1/2432
11	1/2116
12	1/2199
21	(bajo recuento celular)
22	1/2334
27	1/3222
29	1/4178
32	1/499
35	1/232
36	1/3481
43	1/6726
44	1/5634
46	1/3381
47	(bajo recuento celular)
48	1/3081
49	1/6606
52	1/23217

Tabla 32. Frecuencia de linfocitos T anti p53₂₆₄₋₂₇₂ en el suero de cada uno de los pacientes.

Paciente nº	Linfocitos anti p53 ₁₄₉₋₁₅₇
1	(bajo recuento celular)
2	(bajo recuento celular)
3	1/1600
6	1/2212
7	(bajo recuento celular)
8	1/3450
10	1/2521
11	1/517
12	(bajo recuento celular)
21	(bajo recuento celular)
22	(bajo recuento celular)
27	1/841
29	1/2458
32	1/12111
35	1/4888
36	1/1028
43	1/5767
44	1/16536
46	1/2869
47	(bajo recuento celular)
48	1/2044
49	(bajo recuento celular)
52	1/12026

Tabla 33. Frecuencia de linfocitos T anti p53₁₄₉₋₁₅₇ en el suero de cada uno de los pacientes.

La frecuencia de detección de linfocitos según el HLA (A2+ vs A2-) de los pacientes se muestra en las tablas 34 y 35.

Paciente nº	HLA	LTC anti-p53₂₆₄₋₂₇₂	LTC anti-p53₁₄₉₋₁₅₇
1	A2-	Bajo recuento celular	Bajo recuento celular
7	A2-	1/37789	Bajo recuento celular
43	A2-	1/6726	1/5767
44	A2-	1/5634	1/16536
49	A2-	1/6606	Bajo recuento celular
52	A2-	1/23217	1/12026

Tabla 34. Frecuencia de linfocitos T anti-p53 en pacientes HLA A2-.

En la tabla 34 se muestran los valores de linfocitos anti-p53 detectados en los pacientes HLA A2-.

Los resultados obtenidos en esta población son inespecíficos por definición. Por este motivo se emplearon para establecer el punto de corte, que se definió como el percentil 99. Este valor fue de 1/5634 para el epítipo 264-272 y de 1/5767 para el epítipo 149-157. Por convenio se eligió el más alto (1/5634) como punto de corte para ambos péptidos.

Se puede ver claramente como ningún paciente con tipaje HLA A2- presentaba una concentración de linfocitos T igual o mayor que el punto de corte. Este dato apoya la fiabilidad de la técnica.

En la tabla siguiente se puede comprobar como de los 16 pacientes HLA A2+, en 14 se pudo realizar la determinación de linfocitos T, al menos contra uno de los dos epítotos.

Paciente nº	HLA	LTC anti-p53₂₆₄₋₂₇₂	LTC anti-p53₁₄₉₋₁₅₇
2	A2+	Bajo recuento celular	Bajo recuento celular
3	A2+	1/1825	1/1600
6	A2+	1/2262	1/2212
8	A2+	1/8469	1/3450
10	A2+	1/2432	1/2521
11	A2+	1/2116	1/517
12	A2+	1/2199	Bajo recuento celular
21	A2+	Bajo recuento celular	Bajo recuento celular
22	A2+	1/2334	Bajo recuento celular
27	A2+	1/3222	1/841
29	A2+	1/4178	1/2458
32	A2+	1/499	1/12111
35	A2+	1/232	1/4888
36	A2+	1/3431	1/1028
46	A2+	1/3381	1/2869
48	A2+	1/3081	1/2044

Tabla 35. Frecuencia de linfocitos T anti-p53 en cada uno de los pacientes HLA A2+.

De esos 14 sujetos HLA A2+, 10 pacientes (71.42%) tenían linfocitos T anti-p53 específicos dirigidos contra los dos epítomos estudiados detectables en sangre periférica.

En un caso (7.14%) únicamente se detectaron linfocitos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ por encima del punto de corte, siendo negativo para el epítomo 264-272.

En otro caso más, sólo se detectaron linfocitos contra el péptido 264-272, resultando negativo para el 149-157.

En los otros 2 casos (14.28%) se evidenciaron linfocitos dirigidos contra el péptido p53₂₆₄₋₂₇₂. En estos 2 pacientes no pudo determinarse la frecuencia de linfocitos contra el otro epítomo por un recuento celular insuficiente para el análisis.

En esta pequeña serie, por lo tanto, se puede concluir que el 100% de los pacientes HLA A2+ con cáncer de mama estudiados presentaron concentraciones detectables de linfocitos anti-p53, bien contra el epítomo 264-272, bien contra el péptido 149-157 o bien contra ambos.

En la tabla 36 se muestran los estadísticos descriptivos para la variable linfocitos T específicos para el epítomo 264-272 según el HLA del paciente.

Nótese como los resultados se expresan en valores absolutos, que son las frecuencias recíprocas. Esto se hizo así para facilitar el análisis estadístico.

Por lo tanto, se debe tener en cuenta que los valores más bajos traducen en realidad frecuencias de linfocitos T específicos más elevados y viceversa.

Por este motivo, el rango se expresa del valor absoluto máximo al mínimo.

Linfocitos anti-p53 ₂₆₄₋₂₇₂	nº pacientes	Media	Media geométrica	Mediana	Rango
HLA A2+	14	2832.92	2170.28	2383	8469-232
HLA A2-	5	15994.40	11704.06	6726	37789-5634

Tabla 36. Media, mediana y rango de linfocitos T anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ según el HLA A2 de los pacientes. Los valores se expresan en valores absolutos (frecuencias recíprocas).

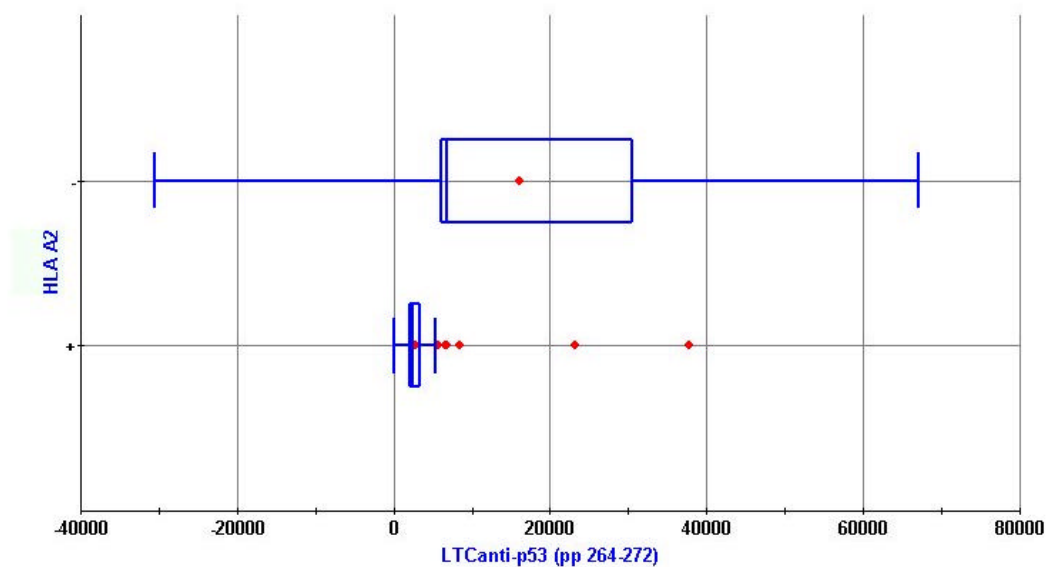


Gráfico 24. Diagrama de cajas para la representación de la variable linfocitos T citotóxicos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ por HLA A2. En los bordes de cada caja se representan el primer y el tercer cuartil. La mediana está en la línea central y la media aparece señalada con un punto rojo dentro de la caja. Los extremos de los segmentos están situados a 1.5 veces la distancia intercuantílica. Los puntos rojos que están más allá de los extremos de los segmentos se consideran valores extremos.

Como se puede comprobar la media de detección de linfocitos anti p53₂₆₄₋₂₇₂ en la población HLA A2+ fue de 2832 (=1/2832), mientras que en la población HLA A2- fue de 15994 (=1/15994). Las desviaciones típicas fueron, respectivamente, 1947 y 14217. Aplicando la prueba de t-student para contrastar la diferencia de medias, se obtiene que las diferencias son estadísticamente significativas con un valor de $p = 0.002$.

De forma análoga, en la tabla 37 se muestran los estadísticos descriptivos para la variable linfocitos T anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ según el HLA de los pacientes.

Linfocitos anti-p53 ₁₄₉₋₁₅₇	nº pacientes	Media	Media geométrica	Mediana	Rango
HLA A2+	12	3044.91	2183.43	2335	12111-517
HLA A2-	3	11443.00	10476.28	12026	16536-5797

Tabla 37. Media, mediana y rango de linfocitos T anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ según el HLA A2 de los pacientes.

Los valores se expresan en valores absolutos (frecuencias recíprocas).

La media de detección de linfocitos T contra el péptido 149-157 de p53 en los pacientes HLA A2+ fue de 3044.91, con una desviación típica de 3096.97.

En los pacientes HLA A2-, sin embargo, la media fue de 11443 y la desviación típica de 5408.11.

Nuevamente, al aplicar la prueba de contraste de medias de t-student se comprueba que las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas ($p = 0.002$).

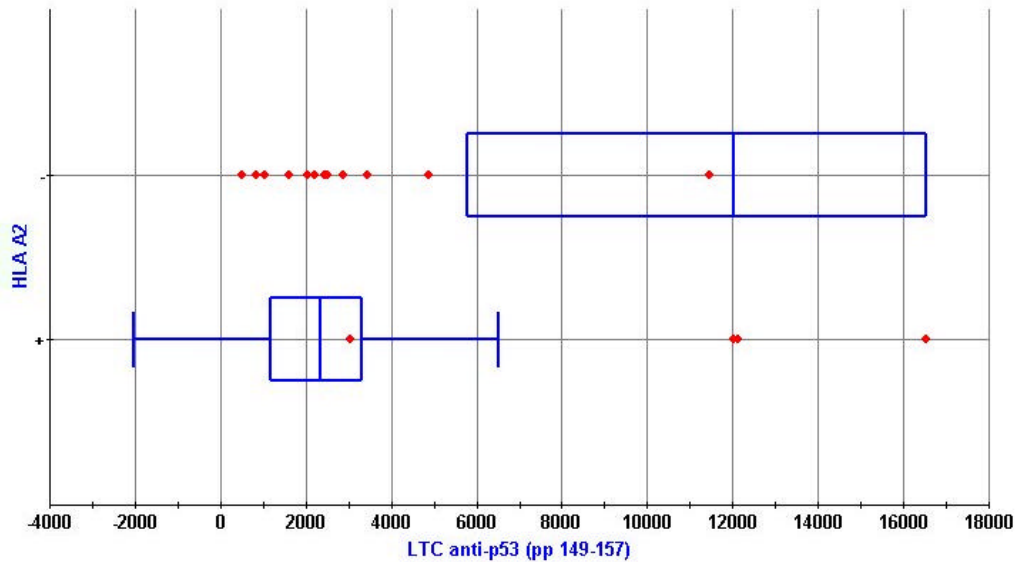


Gráfico 25. Diagrama de cajas para la representación de la variable linfocitos T citotóxicos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ por HLA A2. En los bordes de cada caja se representan el primer y el tercer cuartil. La mediana está en la línea central y la media aparece señalada con un punto rojo dentro de la caja.

En conclusión, como ya se ha señalado, estos resultados apoyan la fiabilidad de la técnica empleada para la identificación de los linfocitos T específicos contra los dos epítomos de la proteína p53 estudiados.

5.5. CORRELACIÓN ENTRE LINFOCITOS ANTI-P53 E HISTOPATOLOGÍA

En este estudio, existía gran interés no sólo en comprobar la existencia de linfocitos citotóxicos específicos anti-p53, sino también en observar su correlación con el “status” de p53 en el tumor de los pacientes con cáncer de mama que participaron en el estudio.

Dado que, como cabía esperar, ninguno de los pacientes HLA A2- presentó linfocitos anti-p53 por encima del punto de corte, únicamente se estudió la mencionada correlación en los pacientes HLA A2+.

En el estudio se reclutaron 16 pacientes HLA A2+, pero recordemos que en 2 casos no se pudo obtener un resultado valorable debido al bajo recuento de células linfocitarias obtenido para el análisis.

En otro caso más, el problema fue que no se llegó a conocer el “status” de p53 en tumor, debido a que la muestra extraída fue de una citología de líquido pleural.

Por tanto, se pudieron analizar correctamente 13 pacientes HLA A2+ con cáncer de mama. Los resultados obtenidos de cada uno de ellos se muestran a continuación.

Nº paciente	P53 en tejido	LTC anti-p53 ₂₆₄₋₂₇₂	LTC anti-p53 ₁₄₉₋₁₄₇
3	+	1/1825	1/1600
8	-	1/8469	1/3450
10	+	1/2432	1/2521
11	-	1/2116	1/517
12	-	1/2199	Bajo recuento
22	-	1/2334	Bajo recuento
27	-	1/3222	1/841
29	-	1/4178	1/2458
32	-	1/499	1/12111
35	-	1/232	1/4888
36	+	1/3431	1/1028
46	-	1/3381	1/2869
48	-	1/3081	1/2044

Tabla 38. “Status” de p53 en tejido y concentración de linfocitos anti-p53 en cada uno de los pacientes HLA A2+ con cáncer de mama.

En primer lugar, se analizó la concentración de linfocitos anti-p53 dirigidos contra el péptido 264-272 de la proteína p53 en función del estado de p53 en el tumor. Los estadísticos descriptivos se muestran en las tablas 39 y 40.

Nº Pacientes	Mediana	Rango	Media	DT
10	2707.5	8469-232	2971.1	2291.86

Tabla 39. “Status” de p53 en tejido y linfocitos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ en pacientes con cáncer de mama con **p53 negativa** en tejido. Los resultados se expresan en valores absolutos (frecuencias recíprocas). DT: desviación típica.

La media geométrica de linfocitos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ en pacientes con ausencia de sobreexpresión de p53 en tejido, menos influenciada que la media por los valores extremos, fue de 2076.

Nº Pacientes	Mediana	Rango	Media	DT
3	2432	3431-1825	2562.66	810.93

Tabla 40. “Status” de p53 en tejido y linfocitos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ en pacientes con cáncer de mama con **p53 positiva** en tejido. Los resultados se expresan en valores absolutos (frecuencias recíprocas). DT: desviación típica.

La media geométrica de linfocitos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ para pacientes con sobreexpresión de p53 en sus tumores fue de 2478.

Estos resultados demuestran que muchos pacientes con cáncer de mama HLA A2+ presentan linfocitos T citotóxicos anti-p53 dirigidos específicamente contra el péptido

264-272. Ese hecho, además, se observa tanto en los pacientes cuyos tumores sobreexpresan la proteína p53 como en aquellos que no lo hacen. Esto mismo se ilustra en la siguiente gráfica.

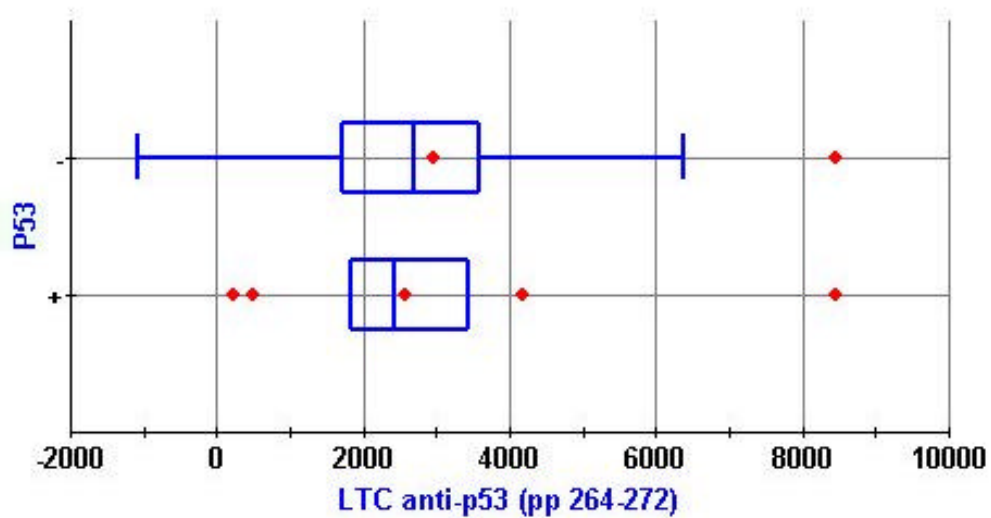


Gráfico 26. Diagrama de cajas para la representación de la variable linfocitos T citotóxicos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ por p53. En los bordes de cada caja se representan el primer y el tercer cuartil. La mediana está en la línea central y la media aparece señalada con un punto rojo dentro de la caja.

Aparentemente, parece existir una ligera tendencia a presentar una frecuencia mayor de linfocitos T contra el péptido 264-272 de la proteína p53 en pacientes con cáncer de mama cuyos tumores sobreexpresan dicha proteína, en comparación con los que no lo

hacen. Sin embargo, si se aplica la prueba de t-student, se comprueba como esas pequeñas diferencias no alcanzan la significación estadística ($p = 0.77$).

Igualmente, se analizó la concentración de linfocitos T dirigidos contra el péptido 149-157 en función del estado de p53 en el tumor de los pacientes HLA A2+. En este caso, por los motivos anteriormente expuestos, únicamente se pudieron estudiar 11 pacientes. Los estadísticos obtenidos se muestran a continuación.

Nº Pacientes	Mediana	Rango	Media	DT
8	2663.5	12111-517	3647.25	3693.18

Tabla 41. “Status” de p53 en tejido y linfocitos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ en pacientes con cáncer de mama con **p53 negativa** en tejido. Los resultados se expresan en valores absolutos (frecuencias recíprocas). DT: desviación típica.

Nº Pacientes	Mediana	Rango	Media	DT
3	1600	2521-1028	1716.33	753.26

Tabla 42. Estatus de p53 en tejido y linfocitos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ en pacientes con cáncer de mama con **p53 positiva** en tejido. Los resultados se expresan en valores absolutos (frecuencias recíprocas). DT: desviación típica.

Las medias geométricas de linfocitos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ para pacientes con o sin acúmulo de p53 en sus tumores fueron, respectivamente, 1606 y 2445.

Nuevamente, encontramos que muchos de los pacientes con cáncer de mama HLA A2+ poseen linfocitos anti-p53 dirigidos específicamente contra el epítipo 149-157. Como ocurrió con el otro péptido estudiado, su presencia se observa tanto en los pacientes cuyos tumores acumulan la proteína p53 como en aquellos que no lo hacen.

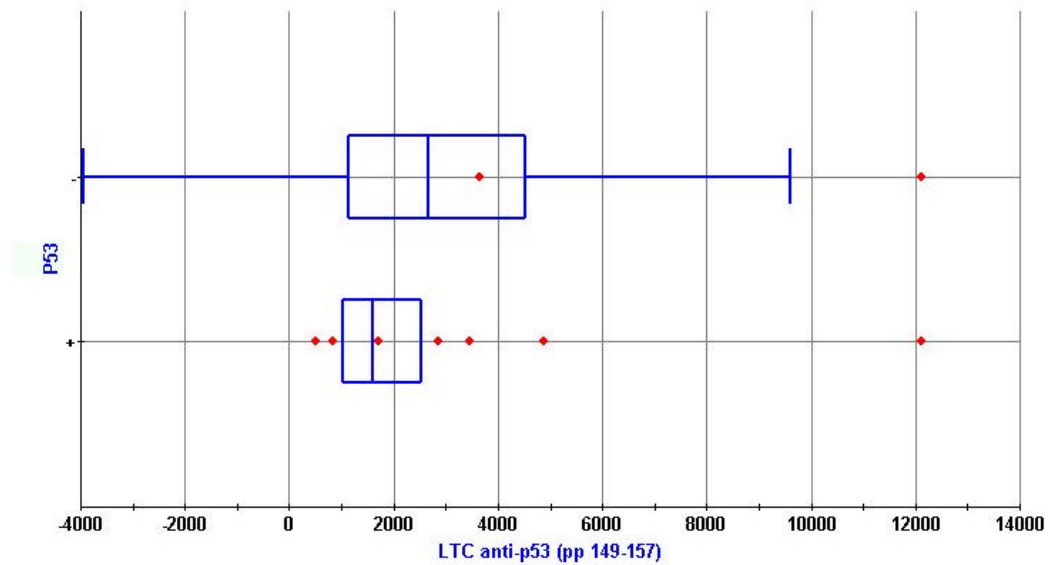


Gráfico 27. Diagrama de cajas para la representación de la variable linfocitos T citotóxicos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ por p53. En los bordes de cada caja se representan el primer y el tercer cuartil. La mediana está en la línea central y la media aparece señalada con un punto rojo dentro de la caja.

Observando tanto la tabla de estadísticos como el diagrama de cajas, se vuelve a apreciar una ligera tendencia a presentar una mayor frecuencia de linfocitos específicos

anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ en los pacientes con proteína p53 detectable por inmunohistoquímica que en los que no la presentan.

Sin embargo, al aplicar la prueba de t-student se obtiene que las diferencias no son estadísticamente significativas ($p = 0.40$).

En un intento de encontrar una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de linfocitos T anti-p53 y el “status” de p53 del tumor, se decidió transformar la variable de frecuencia recíproca de linfocitos (cuantitativa continua) en una variable cualitativa dicotómica que simplemente expresara su valor en resultado positivo o negativo para la detección o no de linfocitos T anti-p53. El resultado positivo se consideró aquella frecuencia recíproca de linfocitos T < 5634 , mientras que el resultado negativo se consideró aquel > 5634 .

Este análisis se realizó para cada uno de los péptidos por separado.

Por tanto, para calcular la significación estadística se diseñaron dos tablas de contingencia 2 x 2 y se aplicó posteriormente la prueba exacta de Fisher en cada uno de ellas.

	p53 +	p53-
LTC anti-p53 ₂₆₄₋₂₇₂ +	3	9
LTC anti-p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -	0	1

Tabla 43. Tabla de contingencia 2 x 2 para la variable LTC anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ por p53.

El valor de p en este primer caso no alcanzó la significación estadística ($p = 0.76$).

	p53 +	p53-
LTC anti-p53 ₁₄₉₋₁₅₇ +	3	7
LTC anti-p53 ₁₄₉₋₁₅₇ -	0	1

Tabla 44. Tabla de contingencia 2 x 2 para la variable LTC anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ por p53.

La segunda tabla de contingencia, diseñada para el epítipo 149-157 por p53, también arrojó un resultado lejos de la significación estadística ($p = 0.72$).

Por tanto, en esta pequeña serie no se ha podido comprobar una relación estadísticamente significativa entre la aparición de linfocitos T específicos anti-p53 y el “status” de p53 en el tumor. A pesar de ello, sí se ha observado una tendencia no significativa a mayor concentración de linfocitos específicos en los pacientes con acúmulo de la proteína.

5.6. CORRELACIÓN ENTRE LINFOCITOS ANTI-P53

Tras demostrar la existencia de linfocitos específicos anti-p53 en pacientes con cáncer de mama, se comprobó que tipo de relación existía entre las dos subpoblaciones de linfocitos anti-p53 estudiadas, esto es, las específicas contra el péptido 264-272 y las dirigidas contra el péptido 149-157. Esta correlación fue estudiada únicamente en los pacientes HLA A2+.

Para ello, se analizaron solamente los pacientes en los cuales se habían podido determinar ambas subpoblaciones de linfocitos, con lo que se obtuvo un tamaño muestral de $n = 12$.

La gráfica siguiente es la gráfica de dispersión para ambas variables.

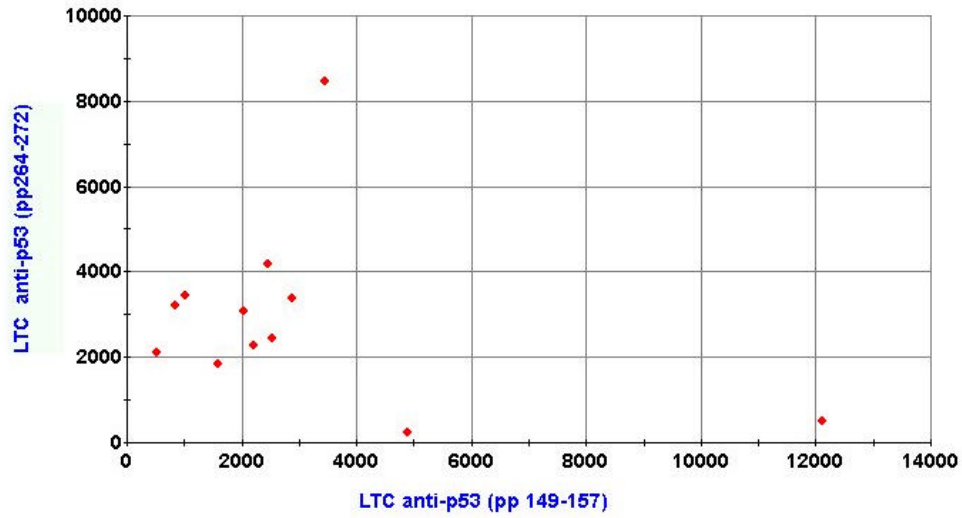


Gráfico 28. Gráfico de dispersión para ambas subpoblaciones de LTC específicos anti-p53. LTC: linfocitos T citotóxicos. pp: péptido.

Pero más interesante es calcular la recta de regresión lineal y el coeficiente de correlación de Pearson, los cuales se muestran a continuación.

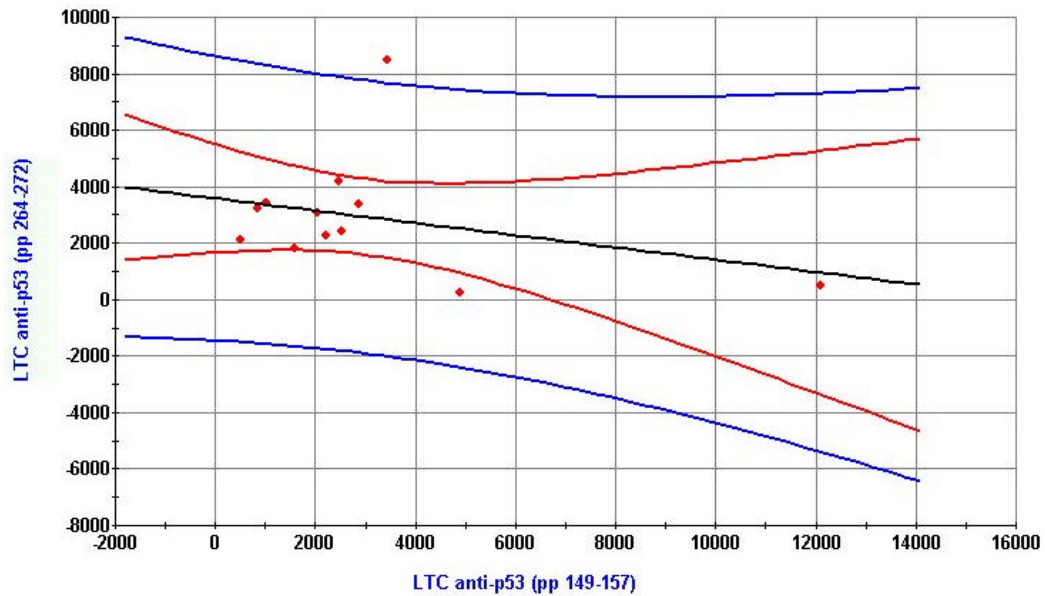


Gráfico 29. Recta de regresión estimada por mínimos de cuadrados (negro) para las dos subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos anti-p53. Curvas de predicción interiores al 95% de predicción de valores medios (color rojo) y curvas de predicción exteriores al 95% de predicción de valores individuales (color azul).

El coeficiente de correlación de Pearson (r) fue de -0.3201 con una p de 0.6806.

De ello se deduce que, en esta pequeña serie, no existe una correlación significativa entre ambas subpoblaciones de linfocitos T, si bien el signo negativo nos orienta a que cuando una población linfocitaria aumenta, la otra desciende.

5.7. CORRELACIÓN ENTRE LINFOCITOS ANTI-P53 Y EDAD

Dado que podría existir algún tipo de variación en la intensidad de la respuesta inmunológica según la edad, se consideró interesante el observar la correlación entre la frecuencia de linfocitos anti-p53 y la misma.

Para ello, se siguió la metodología empleada en el capítulo anterior.

- **LTC anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ y edad**

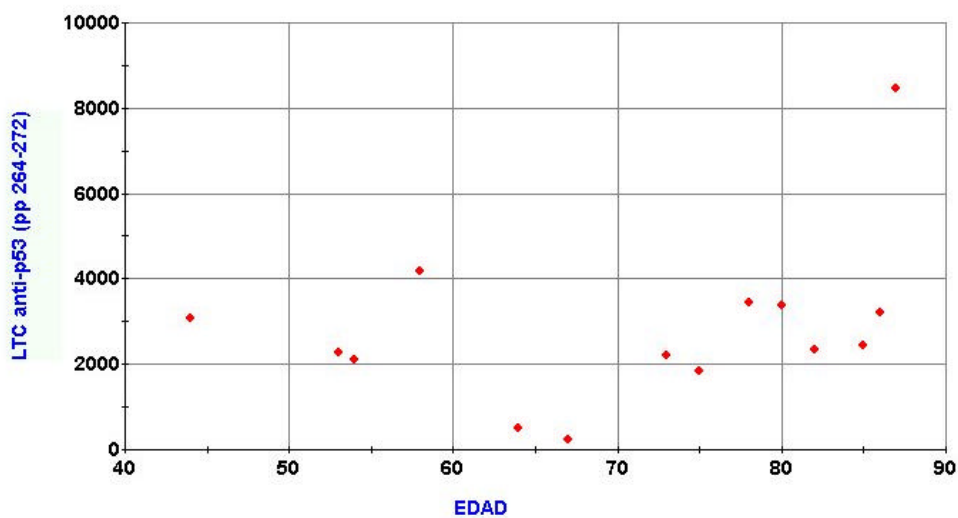


Gráfico 30. Gráfico de dispersión para LTC específicos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ y edad en pacientes con cáncer de mama.

Al aplicar la recta de regresión lineal y el coeficiente de correlación se obtiene lo siguiente.

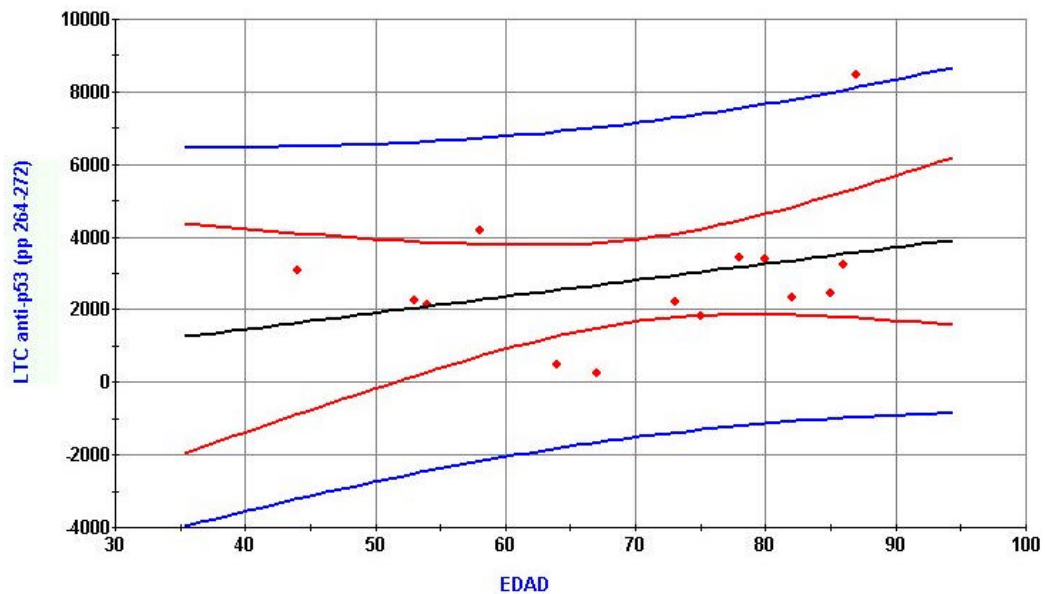


Gráfico 31. Recta de regresión estimada por mínimos de cuadrados (negro) para los linfocitos T citotóxicos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ y edad. Curvas de predicción interiores al 95% de predicción de valores medios (color rojo) y curvas de predicción exteriores al 95% de predicción de valores individuales (color azul).

El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.3227 ($p = 0.16$), lo cual revela una ausencia de correlación significactiva. El resultado positivo del valor de r en este caso no indica que a medida que aumenta la edad también lo hace la frecuencia de linfocitos, sino todo lo contrario. Esto es debido a que la frecuencia de linfocitos empleada para el

cálculo es la recíproca, por lo que lo que aumenta en función de la edad es el recíproco de la frecuencia de linfocitos.

Este resultado podría revelar la existencia de un cierto grado de anergia en los pacientes más añosos.

- **LTC anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ y edad**

De forma análoga a lo realizado con el primer epítipo, a continuación se muestran los resultados de la curva de dispersión, recta de regresión lineal y coeficiente de correlación de Pearson que se obtuvieron para los LTC anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ y la edad.

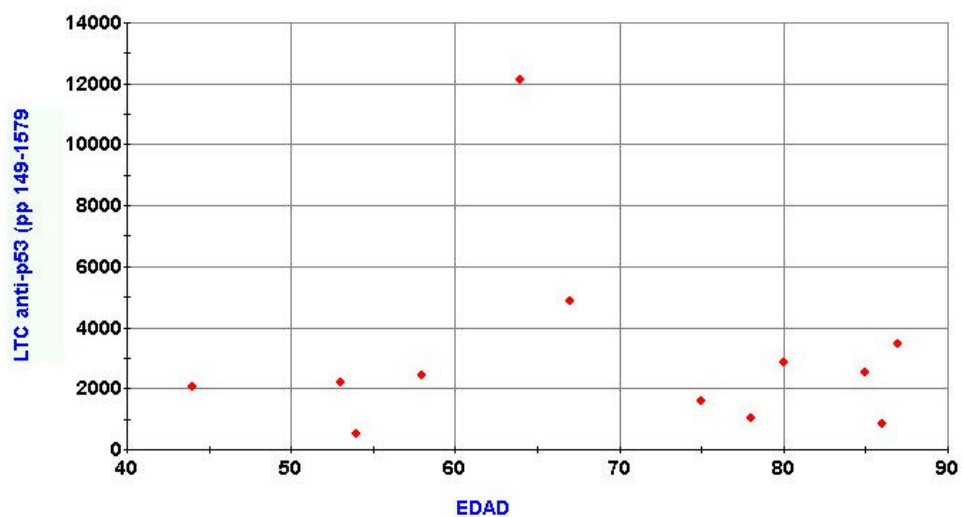


Gráfico 32. Gráfico de dispersión para LTC específicos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ y edad en pacientes con cáncer de mama.

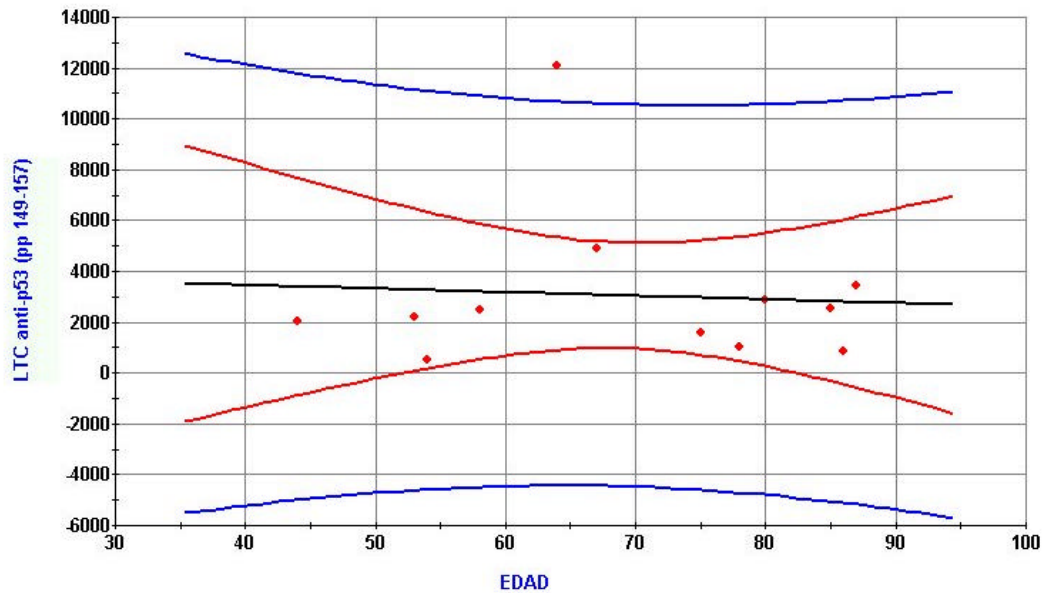


Gráfico 33. Recta de regresión estimada por mínimos de cuadrados (negro) para los linfocitos T citotóxicos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ y edad. Curvas de predicción interiores al 95% de predicción de valores medios (color rojo) y curvas de predicción exteriores al 95% de predicción de valores individuales (color azul).

Al aplicar el coeficiente de correlación de Pearson se obtuvo un valor de -0.067 ($p = 0.63$), lo cual expresa una correlación prácticamente nula entre la frecuencia de aparición de linfocitos T anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ y la edad.

En conclusión, con este pequeño tamaño muestral, no se ha logrado identificar una correlación significativa entre la frecuencia de linfocitos T anti-p53 dirigidos contra los péptidos 264-272 y 149-157 y la edad.

6. DISCUSIÓN

6.1. DATOS DE LA LITERATURA

Haciendo una búsqueda en Medline (Pubmed, desde Enero de 1979 hasta 1 de Abril de 2003), no se han encontrado estudios previos en la literatura científica que demuestren la existencia “in vivo” de linfocitos T citotóxicos anti-p53 en pacientes con cáncer de mama. Por este motivo el presente trabajo tiene un interés especial y es original.

En estudios precedentes se ha demostrado que es posible generar linfocitos T específicos anti-p53 dirigidos contra diversos epítomos HLA A2+ restringidos a partir de linfocitos CD8 obtenidos de donantes sanos e incubados con células dendríticas y el péptido inmunógeno. Estos linfocitos son capaces de eliminar “in vitro” líneas celulares de diversos tumores, incluido el cáncer de mama (Houbiers et al, 1993; Theobald et al, 1993; Ropke et al, 1996; Gnjjatic et al, 1998; Chikamatsu et al, 1999).

También está demostrado, en ratones, que linfocitos T citotóxicos específicos sensibilizados “in vitro” contra un péptido de p53 y adecuadamente estimulados, son capaces tanto de eliminar tumores murinos establecidos como de proteger contra el desarrollo de los mismos en ratones sanos (Mayordomo et al, 1995 y 1996; Cicinnati et al, 2000).

En un momento como el actual, en el que se está intentando desarrollar la inmunoterapia anti-p53, parece clave determinar si existen “in vivo” linfocitos específicos en pacientes con cáncer.

El estudio pionero sobre determinación de la frecuencia de aparición de linfocitos anti-p53 en pacientes con cáncer lo ha realizado el equipo del Profesor De Leo, colaborador en la presente tesis, en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Hoffmann et al, en prensa).

Este equipo ha estudiado concretamente la frecuencia de aparición de linfocitos T citotóxicos específicos anti-p53 (péptido 264-272) en sangre periférica de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, para evaluar la utilidad de los péptidos derivados de p53 como futuras vacunas en pacientes con cáncer.

La ventaja de los cánceres de cabeza y cuello es que es posible detectar mutaciones de p53 hasta en el 60% de los casos, las cuales además suelen ser del tipo transversiones al estar inducidas por carcinógenos, tales como el tabaco y el alcohol. El resultado de dichas mutaciones es, en la mayoría de las ocasiones, el cambio de un único aminoácido por otro, con lo que la proteína mutada resultante, que se acumula, es muy similar a la proteína normal. Por lo tanto, es posible la presentación antigénica al sistema inmunológico de epítomos inmunógenos de esta proteína mutada, los cuales en su mayoría son péptidos idénticos a los de la proteína salvaje.

Para ello, se evaluaron por citometría de flujo multicolor (4 colores) los linfocitos T de 30 pacientes HLA A 2.1 positivos y 31 donantes sanos HLA A 2.1 positivos, utilizando complejos péptidos-moléculas HLA A 2.1 (tetrámeros). A través de filtros o “gating” sucesivos primero se eliminaron las células CD 14 (monocitos) así como las células necróticas y apoptóticas, todas ellas capaces de unirse de forma inespecífica al tetrámero. Posteriormente se eliminaron las células CD3- (natural killer), para finalmente seleccionar únicamente los tetrámeros T CD8.

Dado que en 10 donantes sanos HLA A2- encontraron niveles bajos de tetrámeros p53₂₆₄₋₂₇₂ CD3+, CD8+ (media geométrica 1/23.397) y este hallazgo es inespecífico por definición, fijaron el punto de corte del límite inferior de detección positiva de tetrámeros de células T en el percentil 99 de los sujetos HLA A2-, que resultó ser de 1/7805.

Encontraron que los pacientes HLA A2+ con cáncer de cabeza y cuello tenían una frecuencia media de linfocitos CD8 específicos para el péptido derivado de p53 significativamente más alta que los donantes sanos HLA A2+, 1/3533 vs. 1/5207 (medias geométricas), respectivamente ($p = 0.0041$).

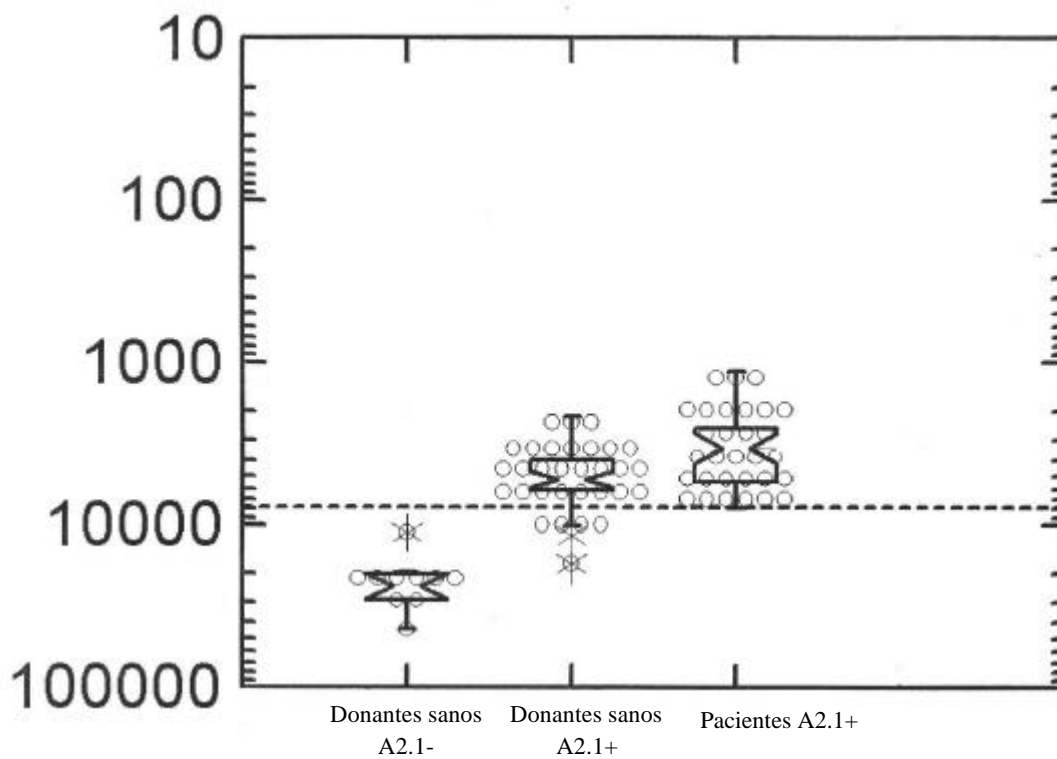


Gráfico 34. Frecuencias recíprocas de tetrámeros p53₂₆₄₋₂₇₂ CD8+ en donantes sanos HLA A2.1-, donantes sanos HLA A2.1+ y en pacientes HLA A2.1+. Cada círculo representa un sujeto. La línea de puntos es el punto de corte del límite inferior de detección equivalente al percentil 99 de la frecuencia recíproca de los sujetos sanos HLA A2.1- (7805). Nótese como todos los pacientes HLA A2.1- quedan fuera de dicho límite, dando un resultado negativo.

Pero, cuando se realizó un análisis con detalle del grupo de pacientes, se observó que podían dividirse en dos subgrupos.

El primer grupo era el de aquellos pacientes cuyos tumores no acumulaban la proteína p53 o bien no podían presentarla correctamente. El segundo grupo, por el contrario, lo formaban aquellos pacientes cuyos tumores sí acumulaban la proteína p53.

El primer grupo de pacientes presentaba unas frecuencias de linfocitos T anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ en sangre periférica significativamente más altas que las de los del segundo grupo, siendo las medias geométricas 2418 y 4981, respectivamente ($p = 0.0006$). Las medianas fueron 2636 y 4958, respectivamente.

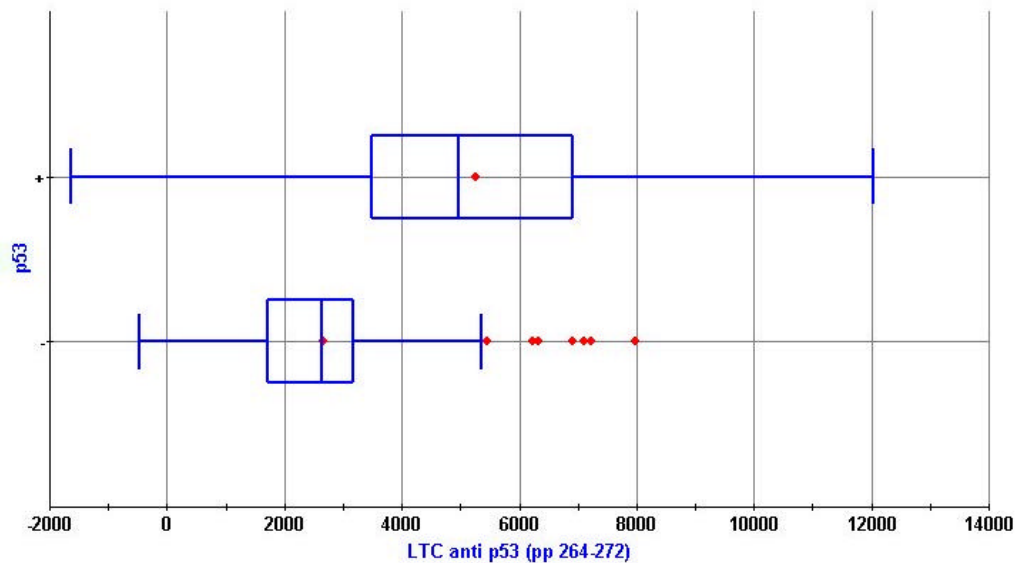


Gráfico 35. Diagrama de cajas para la representación de la variable linfocitos T citotóxicos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ por p53 en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. En los bordes de cada caja se representan el primer y el tercer cuartil. La mediana está en la línea central y la media aparece señalada con un punto rojo dentro de la caja.

Además, la frecuencia de linfocitos T en el segundo grupo era equiparable a la de los sujetos sanos (medias geométricas de 4981 y 5207, respectivamente; diferencias estadísticamente no significativas), tal y como se refleja en el siguiente gráfico.

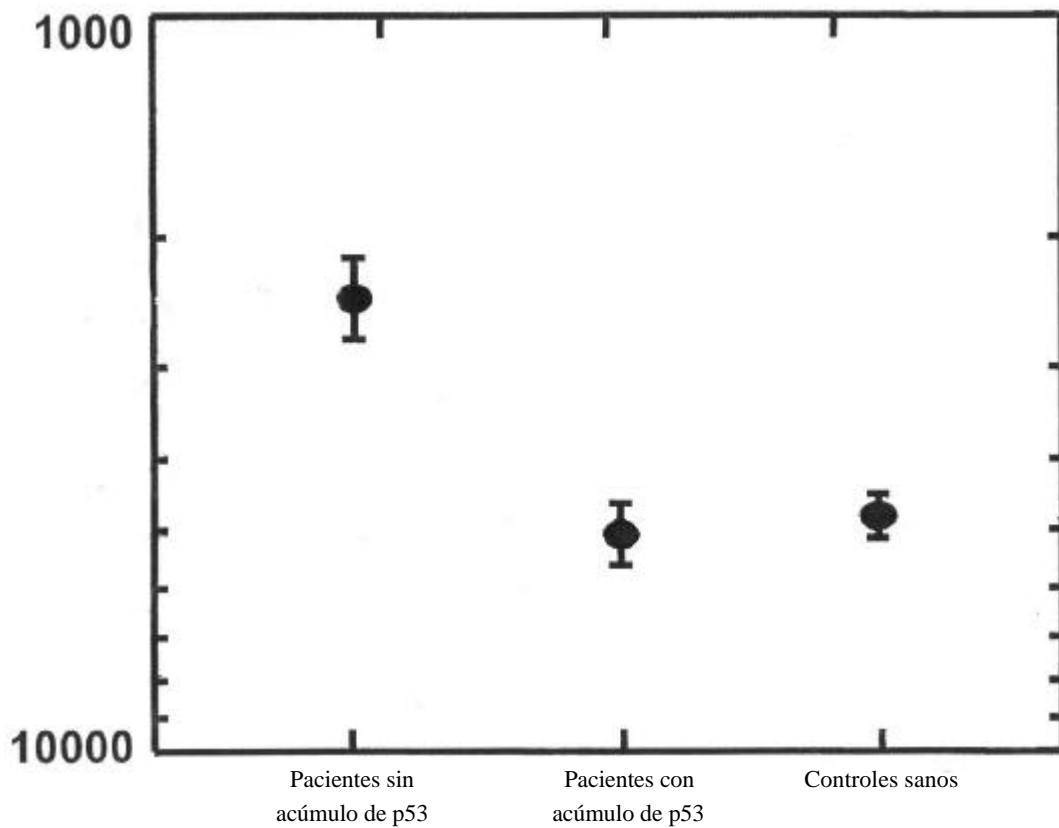


Gráfico 36. Frecuencias recíprocas de linfocitos T CD8 anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ en donantes sanos y en pacientes con y sin acúmulo de p53 en su tumor.

En este estudio también se compararon las frecuencias de los linfocitos T específicos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ con las de linfocitos T específicos para un antígeno de memoria modelo (péptido de la matriz de la influenza) y de un modelo de antígeno nuevo contra el que no están sensibilizados (péptido de la transcriptasa inversa del virus de la inmunodeficiencia humana). Esto se realizó para evaluar el modelo de respuesta que seguían los linfocitos T anti-p53. Como se puede comprobar en el siguiente gráfico, en los sujetos sanos los linfocitos anti-p53 siguen un patrón similar al de los linfocitos dirigidos contra la transcriptasa inversa del VIH, modelo de antígeno nuevo. Por el contrario, los linfocitos de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello se aproximan más al modelo de antígeno conocido que siguen los linfocitos anti influenza

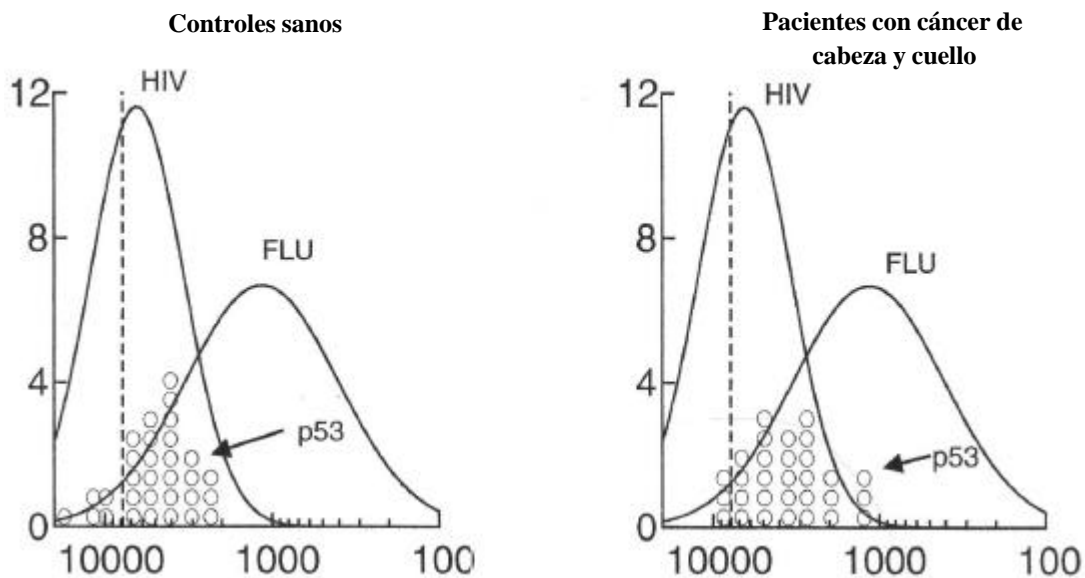


Gráfico 37. Frecuencias recíprocas individuales de linfocitos T anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ (círculos) en sujetos sanos y en pacientes con cáncer de cabeza y cuello comparados con las curvas de distribución normal de linfocitos anti matriz de influenza y transcriptasa inversa de VIH. La línea discontinua representa el punto de corte del límite inferior de detección de tetrámeros.

Por ello, se realizó un “gating” mediante el citómetro para diferenciar la población de linfocitos de memoria (CD45RO+) y la “naive” (CD45RA+).

El resultado fue que tanto los pacientes con acúmulo de p53 en sus tumores como los sujetos sanos presentaban mayoritariamente linfocitos T del tipo “naive” e incapaces de proliferar “in vitro” en respuesta al epítipo (72.7 +/- 2.5% células naive, 10 + 6.6% células de memoria, 17.3 +/- 6.3% células transicionales).

Sin embargo, los pacientes sin acúmulo de p53 presentaban un porcentaje más significativo de linfocitos T anti-p53 de memoria (50.3 +/- 8.5% células naive, 36.5 +/- 12.8% células de memoria, 13.2 +/- 6.3% células transicionales).

Por todo ello, Hoffmann concluye que esta relación recíproca existente entre el acúmulo de p53 y la frecuencia de linfocitos anti-p53 sugiere que “in vivo” los linfocitos T específicos para p53₂₆₄₋₂₇₂ tienen gran importancia biológica ya que podrían ser capaces de eliminar las células tumorales que presentan este epítipo, dando lugar a la aparición de variantes tumorales con pérdida del mismo, inmunorresistentes. Este es el denominado fenómeno de inmunoselección, el cual parece contribuir al escape del tumor del sistema inmune en pacientes con cáncer de cabeza y cuello.

Estos hallazgos podrían tener importantísimas implicaciones para futuras estrategias basadas en p53.

Puesto que los propios linfocitos T anti-p53 del paciente son capaces de eliminar clones enteros de células tumorales, es de esperar que una inmunoterapia específica tenga un efecto tumoricida todavía mayor.

Por el contrario, también se puede pensar que la vacunación con linfocitos anti-p53 podría crear una presión con efecto inmunoselectivo sobre el tumor que favoreciera el desarrollo de variantes inmunoresistentes.

El motivo por el cual los tumores con acúmulo de p53 presentaban frecuencias tan bajas de linfocitos específicos podría deberse a múltiples causas: bajo procesamiento antigénico, subóptima presentación antigénica, etc.

Por otro lado, estos epítomos realmente son péptidos propios y como se ha comentado en la introducción, este hecho induce cierta tolerancia que se traduce en la eliminación de los linfocitos T de mayor afinidad.

6.2. DATOS DEL PRESENTE ESTUDIO

6.2.1. LIMITACIONES DEL TRABAJO

El número de pacientes analizado ha permitido alcanzar el objetivo principal del estudio: demostrar la existencia de linfocitos T citóxicos específicos anti-p53 en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama.

Sin embargo, a la hora de correlacionar la frecuencia de linfocitos con el “status” de p53 del tumor nos encontramos con que la muestra es pequeña. Ello nos permite observar tendencias y formular hipótesis, pero con grandes reservas y sin poder establecer conclusiones definitivas.

Dado que en el cáncer de mama la probabilidad de encontrar mutaciones de p53 detectables por inmunohistoquímica es tres veces más baja que en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, para detectar las diferencias descritas por Hoffmann habría sido necesaria una serie por lo menos de 90 pacientes HLA A2+ con cáncer de mama.

A la limitación que da el pequeño tamaño muestral hay que añadirle las pérdidas sufridas en el proceso de aislamiento de células mononucleadas, congelación, transporte y descongelación. Ello ha impedido analizar completamente a todos los pacientes, reduciendo aún más el número de casos.

6.2.2. DATOS DEL PRESENTE ESTUDIO

En el presente trabajo se ha analizado la frecuencia de aparición de linfocitos T citotóxicos anti-p53 en pacientes con cáncer de mama.

Ello ha supuesto una ardua tarea para la que ha sido necesaria la implicación de muchos especialistas en la materia.

Primero se ha realizado una búsqueda sistemática de pacientes HLA A2+ con tejido tumoral accesible para su exéresis.

Esto ha supuesto la obtención del consentimiento informado, la determinación del HLA y la colaboración con los cirujanos y los anatomopatólogos.

Por otro lado, la determinación de los linfocitos T citotóxicos anti-p53 específicos para dos epítomos (264-272 y 149-157) es una técnica compleja, sobre todo por la finura que requiere. Ello nos ha motivado a colaborar para su realización con el único equipo experimentado que existe en el mundo, que se encuentra en la Universidad de Pittsburgh (Pennsylvania).

En el presente estudio se ha podido detectar la presencia de linfocitos T específicos dirigidos contra los epítomos 264-272 y 149-157 de la proteína p53 en pacientes HLA A2+ con cáncer de mama.

La importancia de este trabajo radica, precisamente, en que se trata de la primera vez que se logra identificar “in vivo” una respuesta inmunológica específica mediada por linfocitos T citotóxicos anti-p53 en pacientes con cáncer de mama.

Además, al estudiar así mismo una población HLA A2- se ha podido fijar un punto de corte (equivalente al valor percentil 99) que en esta serie ha sido de 1/5634. En la serie de Hoffmann en pacientes con cáncer de cabeza y cuello el punto de corte fue inferior (1/7805), aunque comparable.

Es de destacar que el 100% de los pacientes HLA A2+ con cáncer de mama analizados en el estudio han presentado frecuencias de linfocitos T específicos anti-p53 dirigidos

contra al menos uno de los dos epítomos estudiados superiores al mencionado punto de corte. Analizados por separado, el 92.85% de todos los pacientes presentaban linfocitos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ y el 91.66% presentaban linfocitos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇.

El porcentaje de detección para el epítomo 264-272 es equiparable al descrito por Hoffmann en los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, que fue de un 96.66%. Hay que tener en cuenta que, como se ha señalado, el valor absoluto de los puntos de corte fue diferente en ambas series (1/7805 vs. 1/5634), pero en las dos fue equivalente al percentil 99 de la población HLA A2-, donantes sanos en el caso de Hoffmann y pacientes en el nuestro.

En el caso del péptido 264-272, la media de detección de linfocitos fue de 1/2832, con una media geométrica de 1/2170. Esta media geométrica es ligeramente superior, aunque comparable, a la encontrada por Hoffmann en pacientes con cáncer de cabeza y cuello para el mismo epítomo (1/3533).

En el caso del epítomo 149-157, la media fue de 1/3044, con una media geométrica de 1/2183. Este epítomo no fue analizado por Hoffmann.

Sin embargo, en este estudio se han encontrado diferencias importantes al correlacionar la frecuencia de linfocitos con el “status” de p53 en el tumor con respecto a lo descrito previamente en pacientes con cáncer de cabeza y cuello.

En los pacientes con cáncer de mama estudiados no se han encontrado diferencias entre la frecuencia de detección de linfocitos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ en pacientes con o sin acúmulo de p53 (medias geométricas 1/2478 y 1/2076, respectivamente; $p = 0.77$).

De modo análogo, tampoco se han encontrado diferencias entre las frecuencias de linfocitos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ en pacientes con o sin sobreexpresión de p53 en sus tumores (medias geométricas 1/1606 y 1/2445, respectivamente; $p = 0.4$).

Es más, al contrario de lo que ocurría con la serie de Hoffmann, estos datos, aunque estadísticamente no significativos, parecen indicar una cierta tendencia a la presencia de

frecuencias ligeramente superiores de linfocitos T anti-p53 en pacientes cuyos tumores acumulan la proteína. Esto parece ir en contra de la teoría de la inmunoselección propuesta por Hoffmann.

Una posible explicación para las diferencias observadas se pensó que podría residir en que en los pacientes con cáncer de cabeza y cuello del trabajo de Hoffmann el criterio para considerar a un tumor p53+ fue que más del 25% de las células marcaran para el anticuerpo (que fue el mismo empleado en este trabajo), mientras que en esta serie se consideró un resultado positivo a partir del 10% de tinción de la muestra. Esta diferencia parecía importante, ya que en el presente estudio se habían encontrado frecuencias altas no esperadas de linfocitos en los 3 pacientes con p53 teóricamente positiva, pero existía la posibilidad de que esas pacientes tuvieran un porcentaje de sobreexpresión de p53 entre el 10 y el 25%, con lo que para Hoffmann habrían resultado p53- y habrían reforzado su teoría de la inmunoselección.

Ya a posteriori, por tanto, se solicitó a los Patólogos que revisaran las 3 muestras y nos proporcionaran el porcentaje exacto de sobreexpresión de p53. En los 3 casos el resultado fue superior al 25%. Por lo tanto, se trataba de pacientes que eran inequívocamente p53 positivas.

Como ya se ha señalado y a pesar del pequeño tamaño muestral, existen varias hipótesis que podrían explicar el resultado encontrado.

Por un lado, parece lógico pensar que los linfocitos específicos dirigidos contra cualquier epítipo los vamos a encontrar de forma mayoritaria precisamente en presencia de dicho antígeno. De hecho, esto es lo que esperaba Hoffmann cuando diseñó su primer estudio. Pero, también se han detectado frecuencias muy elevadas de linfocitos en pacientes que no sobreexpresan la proteína.

Por ello, al igual que en el trabajo realizado en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, habría sido interesante determinar el fenotipo de los linfocitos para identificar los tipo “naive” y de memoria.

Teóricamente, existe la posibilidad de que los linfocitos detectados en la población p53- se traten de linfocitos T específicos de memoria, los cuales ya habrían eliminado previamente clones enteros de células cancerosas con sobreexpresión de p53 y que ahora son detectados en sangre periférica. En esta línea de argumentación, lo esperable sería que los linfocitos T detectados en los pacientes p53+ fuesen tipo “naive” los cuales estarían en esos momentos intentando eliminar esos clones p53+. Esta batalla inmunológica les obligaría a multiplicarse y por eso sus frecuencias serían ligeramente superiores a las encontradas en los pacientes p53-, aunque como se ha señalado, estadísticamente no significativas. Evidentemente, si las diferencias son pequeñas se podría obtener una significación aumentando la muestra.

Esta hipótesis está en consonancia con la teoría de Hoffmann.

En este trabajo está previsto realizar la secuenciación del ADN de las células malignas para identificar el tipo de mutación de p53 en cada tumor. Esto es importante porque sabemos que existen algunos tipos de mutaciones que condicionan un acúmulo de p53 detectable por inmunohistoquímica pero que son incapaces de ser presentadas al sistema inmunológico. Por tanto, este tipo de tumores p53+ desde el punto de vista inmunológico se comportarían realmente como tumores p53-. En consecuencia, a la espera de confirmación mediante secuenciación de ADN, existe la posibilidad de que de las tres pacientes p53+, alguna o todas presenten una mutación en p53 que realmente las haga comportarse como p53- desde el punto de vista inmunológico.

Nuevamente, este hecho, de confirmarse apoyaría la teoría de Hoffmann.

En conclusión, con los datos que nos proporciona este estudio, no es posible confirmar ni tampoco rechazar la teoría de la inmunoselección propuesta por Hoffmann.

Por ello, existe otro trabajo, ya en marcha, en el cual se ampliará la muestra hasta un número de pacientes que permita sacar conclusiones más sólidas.

En este nuevo estudio, está previsto secuenciar el gen p53 y correlacionar la concentración de linfocitos T con la de anticuerpos anti-p53 tanto en sangre periférica como en el tumor. Asimismo está previsto analizar el fenotipo CD45 de los linfocitos.

Por último, en el presente trabajo no se ha observado una correlación significativa entre las frecuencias recíprocas de linfocitos dirigidos contra dos epítomos distintos y en todo caso parece inversa. Esto podría ser reflejo de la eficiencia del sistema inmunológico, el cual desarrollaría una única respuesta inmunológica específica contra una proteína sobreexpresada. En este trabajo, la media de frecuencias de linfocitos más alta ha sido la dirigida contra el péptido 149-157, aunque los 2 valores máximos lo dieron linfocitos específicos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂.

Tanto el trabajo de Hoffman como este mismo posibilitan la realización de nuevos estudios clínicos en pacientes con cáncer de cara a desarrollar una inmunoterapia específica aplicable en la práctica médica diaria a un gran número de pacientes.

Como ya se ha comentado, las implicaciones clínicas podrían llegar incluso al terreno de la profilaxis de neoplasias empleando “vacunas” en pacientes de alto riesgo. El equipo de trabajo del propio Dr. DeLeo ya ha estudiado en ratones la viabilidad de este tipo de vacunas (Mayordomo 1995 y 1996; Cicinnati et al, 2000).

Todo esto debe confirmarse en las próximas décadas conforme se vayan obteniendo resultados de más estudios.

7. CONCLUSIONES

1. Ha sido posible medir la frecuencia de los linfocitos T citotóxicos específicos dirigidos contra los péptidos 264-272 y 149-157 de la proteína producto del gen p53 en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama.
2. Ha sido posible demostrar, por primera vez, la existencia “in vivo” de una respuesta inmunológica celular específica mediada por linfocitos anti-p53 en pacientes con cáncer de mama.
3. La técnica de tetrámeros de HLA utilizada es fiable y se ha establecido un punto de corte (percentil 99 del resultado de los pacientes HLA A2-) similar al descrito en la literatura.
4. En todos los pacientes HLA A2+ con cáncer de mama estudiados existen frecuencias de linfocitos T anti-p53 frente a alguno de los 2 péptidos de p53 estudiados (264-272 y 149-157) por encima del punto de corte.
5. En esta serie, no se han podido detectar diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de linfocitos T anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ y anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ en sangre periférica en relación con el “status” de p53 en el tumor.
6. No se ha encontrado una correlación significativa entre los linfocitos T anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ y anti-p53₂₆₄₋₂₇₂.
7. No se ha detectado una correlación significativa entre los linfocitos anti-p53 y la edad del paciente.
8. El diseño de vacunas dirigidas contra la proteína p53 es un reto pendiente en Oncología.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, et al. "Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients". *Nat Med* 1996; 2: 811-4.
2. Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SA, Brown RW, Chamness GC, et al. "Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer". *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 200-6.
3. Andersen TI, Holm R, Nesland JM, Heimdal KR, Ottestad L, Borresen AL. "Prognostic significance of TP53 alterations in breast carcinoma". *Br J Cancer* 1993; 68: 540-8.
4. Arellano M, Moreno S. "Regulation of CDK/cyclin complex during the cell cycle". *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 559-73.
5. Ashkenazi A, Dixit VM. "Death receptors: signaling and modulation". *Science* 1998; 281:1305-8.
6. Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, Kaer LV, Pircher HP, Zinkernagel RM, et al. "Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus". *Cell* 1994; 76: 651-63.
7. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53". *Science* 1990; 249: 912-5.
8. Barfoed AM, Petersen TR, Kirkin AF, Thor Straten P, Claesson MH, Zeuthen J. "Cytotoxic T-lymphocyte clones, established by stimulation with the HLA-A2 binding p53₆₅₋₇₃ wild type peptide loaded on dendritic cells in vitro, specifically recognize and lyse HLA-A2 tumour cells overexpressing the p53 protein". *Scand J Immunol* 2000; 51: 128-33.
9. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Rejhar A, Kovarik J, et al. "Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro". *Int J Cancer* 1990 ; 46: 839-44.

10. Bartley AN, Ross DW. "Validation of p53 immunohistochemistry as a prognostic factor in breast cancer in clinical practice". *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 456-8.
11. Berns EMJJ, Klinj JGM, Van Putten WLJ, De Witte HH, Look MP, Meijer-van Gelder ME, et al. "P53 protein accumulation predicts a poor response to tamoxifen therapy of patients with recurrent breast cancer". *J Clin Oncol* 1997; 15: 1916-22.
12. Berry DA, Muss HB, Thor AD, Dressler L, Liu ET, Broadwater G, et al. "HER2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer". *J Clin Oncol* 2000; 18: 3471-9.
13. Bodner SM, Minna JD, Jensen SM, D'Amico D, Carbone D, Mitsudomi T, et al. "Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation". *Oncogene* 1992; 7: 743-9.
14. Boon T, Van der Bruggen P. "Human tumor antigens recognized by T lymphocytes". *J Exp Med* 1996; 183: 725-9.
15. Bradford CR, Zhu S, Poore J, Fisher SG, Beals TF, Thoraval et al. "p53 mutation as a prognostic marker in advanced laryngeal carcinoma". *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123: 605-9.
16. Caelles C, Heimberg A, Karin M. "p53 dependent apoptosis in the absence of p53-target genes". *Nature* 1994; 370: 220-3.
17. Califano JA, Sidransky D. En: *Molecular biology of head and neck cancer*. Harrison LB, Sessions RB, Hong WK (Eds). Filadelfia: Lippicott-Raven Publishers; 1999. p 3-10.
18. Caron de Fromentel C, May-Levin F, Mouriessse H, Lemerle J, Chandrasekaran K, May P. "Presence of circulating antibodies against cellular protein p53 in a notable proportion of children with B-cell lymphoma". *Int J Cancer* 1987; 39: 185-9.
19. Caron de Fromentel C, Soussi T. "TP53 tumor supressor gene: a model for investigating human mutagenesis". *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 4: 1-15.

20. Casey G, Lo-Hsueh M, Lopez ME, Vogelstein B. "Growth supression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene". *Oncogene* 1991; 6: 1791-7.
21. Casey G, Lopez ME, Ramos JC, Plummer SJ, Arboleda MJ, Shaughnessy M, et al. "DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies". *Oncogene* 1996; 13:1971-81.
22. Cawley HM, Meltzer SJ, De Benedetti VM, Hollstein MC, Muehlbauer KR, Liang L, et al. "Anti-p53 antibodies in patients with Barrett's esofaghus or esophageal carcinoma can predate cancer diagnosis". *Gastroenterology* 1998; 115:19-27.
23. Chang C, Simmons DT, Martin MA, Mora PT. "Identification and partial characterization of the new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells". *J Virol* 1979; 31:463-71.
24. Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. "p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells". *Genes Dev* 1996; 10: 2438-51.
25. Chikamatsu K, Nakano K, Storkus WJ, Apella E, Lotze MT, Whiteside TL, et al. "Generation of anti-p53 cytotoxic T lymphocytes from human peripheral blood using autologous dendritic cells". *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1281-88.
26. Chow V, Ben-David Y, Bernstein A, Benchimol S, Mowat M. "Multistage Friend erytroleukemia: independent origin of tumor clones with normal or rearranged p53 cellular oncogenes". *J Virol* 1987; 61: 2777-81.
27. Cicinati VR, Dworacki G, Beckebaum S, Bueso P, Müller-Berghaus J, Albers A et al. "DNA vaccines targeting a p53 wild-type epitope induce a significant reduction of tumor incidence in a murine carcinogenesis model". Comunicación en el "1st International Symposium on Genetic Anticancer Agents", 8-9 Marzo, 2000. Ámsterdam, Holanda.

28. Clashen PC, Van de Velde CJ, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle-Deroide A, et al. "p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer". *J Clin Oncol* 1998; 16: 470-9.
29. Clayman GL, el-Naggar AK, Lippman SM, Henderson YC, Frederick M, Merritt JA, et al. "Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma". *J Clin Oncol* 1998 16:2221-32.
30. Coles C, Condie A, Chetty U, Steel CM, Evans HJ, Prosser J. "P53 mutations in breast cancer". *Cancer Res* 1992; 52: 5291-8.
31. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. "Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer". *Int J Cancer* 1982; 30:403-8.
32. Cross SM, Sanchez CA, Morgan MK, Schimke S, Ramel RL, Idzerda RL, et al. "A p53-dependent mouse spindle checkpoint". *Science* 1995; 267: 1353-6.
33. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. "Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1". *Science* 1994; 265: 1582-4.
34. Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, Marks JR. "Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer". *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5006-10.
35. De Castro J, González Barón M: "Concepto de Oncología Médica". En: González-Barón M, Ordoñez A, Feliu J, Zamora P, Espinosa E, De Castro J. *Oncología Clínica*. 2ed. Madrid: Ed McGraw-Hill-Interamericana.1998a. p 1-9.
36. De Castro J, González Barón M: "Cinética de la célula tumoral". En: González-Barón M, Ordoñez A, Feliu J, Zamora P, Espinosa E, De Castro J. *Oncología Clínica*. 2ed. Madrid: Ed McGraw-Hill-Interamericana.1998b. p 21-34.
37. De Leo AB, Jay G, Apella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. "Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse". *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:2420-24.

38. De Leo AB. "p53-based immunotherapy of cancer". *Crit Rev Immunol* 1998; 18: 29-35.
39. Delavaine L, La Thangue NB. "Control of E2F activity by p21^{waf1/Cip1}". *Oncogene* 1999; 18: 5381-92.
40. Dickson RB, Lippman ME. "Biología molecular del cáncer de mama". En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Eds). *Cáncer: Principios y Práctica de Oncología*. 5ed. Filadelfia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p 1541-57.
41. Dublin EA, Miles DW, Rubens RD, Smith P, Barnes DM. "p53 immunohistochemical staining and survival after adjuvant chemotherapy for breast cancer". *Int. J. Cancer* 1997; 74: 605-8.
42. Eeles RA, Warren W, Knee G, Bartek J, Averill D, Stratton MR, et al. "Constitutional mutation in exon 8 of the p53 gene in a patient with multiple primary tumors: molecular and immunohistochemical findings". *Oncogene* 1993; 8: 1269-76.
43. El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. "Definition of a consensus binding site for p53". *Nat Genet* 1992; 1: 45-9.
44. Eliyahu D, Goldfinger N, Pinhasi-Kimhi O, Shaulsky G, Skurnik Y, Arai N, et al. "Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species". *Oncogene* 1988; 3: 313-21.
45. Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M. "Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation". *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8763-7.
46. Eliyahu D, Michalovitz D, Oren M. "Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic". *Nature* 1985; 316: 158-60.
47. Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M. "Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells". *Nature* 1984; 312: 646-9.
48. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. "The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation". *Cell* 1989; 57: 1083-93.

49. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. "Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life". *Mol Cell Biol* 1988; 8: 531-9.
50. Fleischhacker M, Strhmeyer T, Imai Y, Slamon DJ, Koeffler HP. "Mutations of the p53 gene are not detectable in human testicular tumors". *Mod Pathol* 1994; 7: 435-49.
51. Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean FB, Pan Z-Q, Harper JW, Elledge SJ, et al. "Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase δ holoenzyme". *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8655-59.
52. Folkman J. "Tumor angiogenesis". En: Mendelson J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA (Eds). *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: WB Saunders; 1995. p 206-32.
53. Friend sh, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, et al. "A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma". *Nature* 1986; 323:643-6.
54. Gaducci A, Ferdeghini M, Buttitta F, Cosio S, Fanucchi A, Annicchiarico C, et al. "Serum anti-p53 antibodies in the follow up of patients with advanced ovarian carcinoma". *Anticancer Res*. 1998; 18: 3763-6.
55. Gnjatic S, Cai Z, Viguier M, Chouaib S, Guillet JG, Choppin J. "Accumulation of the p53 protein allows recognition by human CTL of a wild-type p53 epitope presented by breast carcinomas and melanomas". *J Immunol* 1998; 160: 328-33.
56. Gómez Gómez L, González Barón M. "Genes supresores de tumores". En: González Barón M, Ordoñez A, Feliu J, Zamora P, Espinosa E, De Castro J (Eds). *Oncología Clínica*. 2ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana;1998. p 71-9.
57. Gu W, Roeder RG. "Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain". *Cell* 1997; 90: 595-606.

58. Habib NA, Ding SF, El -Masry R, Mitry RR, Honda K, Michail NE, et al
“Preliminary report: the short-term effects of direct p53 DNA injection in primary
hepatocellular carcinomas”. *Cancer Detect Prev* 1996; 20: 103-7.
59. Hainaut P, Milner J. “Redox modulation of p53 conformation and sequence-
especific DNA binding in vitro” *Cancer Res.* 1993; 53: 4469-73.
60. Hall PA, Mckee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP. “High levels of p53 protein in
UV-irradiated normal human skin”. *Oncogene* 1993; 8: 203-7.
61. Hamada M, Fujiwara T, Hizuta A. “The p53 gene is a potent determinant of
chemosensitivity and radiosensitivity in gastric and colorectal cancers”. *J Cancer
Res Clin Oncol* 1996; 122: 360-5.
62. Hamilton A, Larsimont D, Paridaens R, Drijkoningen M, Van de Vijver M, Bruning
P, et al . “A study of the value of p53, HER2 and Bcl-2 in the prediction of response
to doxorubicin and paclitaxel as single agents in metastatic breast cancer: a
companion study to EORTC 10923”. *Clin Breast Cancer* 2000;1: 233-40.
63. Hamilton A, Piccart M. “The contribution of molecular markers to the prediction of
response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on HER-2, p53
and BCL-2”. *Ann Oncol* 2000; 11: 647-63.
64. Hammel P, Boissier B, Chaumette MT, Piedbois P, Rotman N, Kouyoumdjian JC,
et al. “Detection and monitoring of serum p53 antibodies in patients with colorectal
cancer”. *Gut* 1997; 40: 356-61.
65. Haupt Y, Rown S, Shaulian E, Vousden K, Oren M. “ Induction of apoptosis in
Hela cells by transactivation-deficient p53”. *Genes Dev* 1995; 9: 2170-83.
66. Hernández J, Lee PP, Davis MM, Sherman LA. “The use of HLA 2.1/p53 peptide
tetramers to visualize the impact of self tolerance on the TCR repertoire”. *J
Immunol* 2000; 164: 596-602.
67. Hoffmann TK, Nakano K, Elder EM, Dworacki G, Finkelstein SD, Apella E, et al.
“Generation of T cells specific for the wild-type sequence p53₂₆₄₋₂₇₂ peptide in

- cancer patients: implications for the immunoselection of epitope loss variants". *J Immunol* 2000, 165: 5938-44.
68. Hoffmann TK, Donnerberg AD, Finkelstein SD, Donnerberg VS, Friebe-Hoffman U, Myers EN, et al. "Immunoselection of epitope-loss tumor variants by T cells specific for the wild-type sequence p53₂₆₄₋₂₇₂ peptide in patients with head and neck cancer". En prensa.
69. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, et al. "Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines". *Nucleic Acids Res* 1994;22: 3551-5.
70. Horak E, Smith K, Bromley L, Lejeune S, Greenall M, Lane D, et al. "Mutant p53, EGF receptor and c-erbB-2 expression in human breast cancer". *Oncogene* 1991; 6: 2277-84.
71. Houbiers JGA, Nijman HW, Van der Burg SW, Drijfhout JW, Kenemans P, Van de Velde CJH, et al. "In vitro induction of human cytotoxic T lymphocyte responses against peptides of mutant and wild-type p53". *Eur J Immunol* 1993; 23: 2072-7.
72. Hunter T, Pines J. "Cyclins and cancer. II. Cyclin D and CDK inhibitors come of age". *Cell* 1994; 79:573-82.
73. Inaba T, Matsushime H, Valentine M, Roussel MF, Sherr CJ, Look AT. "Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes". *Genomics* 1992; 13:565-74.
74. Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP. "Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients". *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1109-14.
75. Jenkins JR, Rudge K, Currie GA. "Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53". *Nature* 1984; 312: 651-4.
76. Jones MW, Kounelis S, Hsu C, Papadaki H, Bakker A, Swalsky PA, et al. "Prognostic value of p53 and K-ras-2 topographic genotyping in endometrial

- carcinoma: a clinicopathologic and molecular comparison". *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16: 354-360.
77. Kappler JW, Roehm N , Marrack P. "T cell tolerance by clonal elimination in the thymus". *Cell* 1987; 49: 273-80.
78. Katayose D, Gudas J, Nguyen H, Srivastava S, Cowan K, Seth P. "Cytotoxic effects of a recombinant adenovirus expressing human wild type p53 on tumor and normal mammary epithelial cells". *Clin Cancer Res* 1995; 8:889-98.
79. Kerr JFR, Wyllie AH, and Currie AR. "Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissues kinetics". *Br. J. Cancer* 1972; 26: 239-57.
80. King RW, Deshaies RJ, Peters JM, and Kirschner MW. "How proteolysis drives the cell cycle". *Science* 1996; 274:1652-9.
81. Kim D. "Oncolytic virotherapy for cancer with the adenovirus d11520 (Onyx-015): results of phase I and II trials". *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1:525-38.
82. Knoop AS, Bentzen SM, Nielsen MM, Rasmussen BB, Rose C. "Value of epidermal growth factor receptor, HER2, p53 and esteroid receptors in predicting the efficacy of tamoxifen in high-risk postmenopausal breast cancer patients". *J Clin Oncol* 2001; 19:3376-84.
83. Kovach JS, McGovern RM, Cassady JD, Swanson SK, Wold LE, Vogelstein B, et al. "Direct sequencing from touch preparations of human carcinomas: analysis of p53 mutations in breast carcinomas". *J Natl Cancer Inst* 1991;83: 1004-9.
84. Kress M, May E, Cassingena R, May P. "Simian Virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 serum". *J Virol* 1979; 31:472-83.
85. Kuball J, Wen SF, Leissner J, Atkins D, Meinhardt P, Quijano E, et al. "Successful adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with bladder cancer by intravesical vector instillation". *J Clin Oncol* 2002; 4: 957-65.
86. Lacal JC. "Oncogenes y genes supresores". En: Cortés-Funes H, Díaz-Rubio E, García-Conde J, Germá Lluch JR, Guillem Porta V, López López JJ, Moreno

- Nogueira JA, Pérez Manga G (Eds). *Oncología Médica*. Madrid: Nova Sidonia Oncología; 1999. p 42-58.
87. Lane DP, Crawford LV. "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells". *Nature* 1979; 278:261-3.
88. Legros Y, Meyer A, Ory K, Soussi T. "Mutations in p53 produce a common conformational effect that can be detected with a panel of monoclonal antibodies directed toward the central part of the p53 protein". *Oncogene* 1994; 9: 3689-94.
89. Linzer DIH, Levine AJ. "Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and in infected embryonal carcinoma cells". *Cell* 1979; 1: 43-52.
90. Lipponen P, Ji H, Aaltomaa S, Syrjanen K. "P53 protein expression in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis". *Int J Cancer* 1993; 55:51-6.
91. Liu GY, Fairchild PJ, Smith RM, Prowle JR, Kioussis D, Wraith DC. "Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance". *Immunity* 1995; 3:407-15.
92. Liu X, Peralta EA, Ellenhorn JD, Diamond DJ. "Targeting of human p53-overexpressing tumor cells by an HLA A2.1-restricted murine T-cell receptor expressed in Jurkat T cells". *Cancer Res* 2000; 60: 693-701.
93. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. "p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes". *Nature* 1993a; 362: 847-52.
94. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. "p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents". *Cell* 1993b; 74: 957-67.
95. Lubbe J, Reichel M, Brug G, Kleihues P. "Absence of p53 gene mutations in cutaneous melanoma". *J Invest Dermatol* 1994; 102:819-21.
96. Lubin R, Schlichtholz B, Teillaud JL, Garay E, Bussel A, Wild C, et al. "p53 antibodies in patients with various types of cancer: assay, identification and characterization". *Clin. Cancer Res* 1995a; 1:1463-9.

97. Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, Trédaniel J, Legros Y, Cazals D, et al. "Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer". *Nat Med* 1995b; 1:701-2.
98. Mayordomo JI, Zorina T, Storjusz WJ, Celluzi C, Falo L, Kast WM, et al. "Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor peptides elicit protective and therapeutic anti-tumor immunity". *Nature Med* 1995; 1:1297-302.
99. Mayordomo JI, Loftus DJ, Sakamoto H, De Cesare CM, Appasamy PM, Lotze MT, et al. "Therapy of murine tumors with p53 wild-type and mutant sequence peptide-based vaccines". *J Exp Med* 1996; 183: 1357-65.
100. Malkin D, Jolly KW, Barbier N, et al. "Germline mutations of p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms". *N Engl J Med* 1992; 326:1309-15.
101. Masuda H, Miller C, Koeffler HP, Battifora H, Cline MJ. "Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas". *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7716-9.
102. Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato J, Hanks SK, Roussel MF, et al. "Identification properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK}-J3/cdk4) for mammalian D-Type G1 cyclins". *Cell* 1992; 71:323-34.
103. May P, May E. "Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein". *Oncogene* 1999; 18; 7621-36.
104. Melero JA, Stitt DT, Mangel WF, Carroll RB. "Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in simian virus 40-infected and transformed cells". *J Virol* 1979; 93: 466-80.
105. Mendoza-Rodríguez CA, Cerbón MA. "El gen supresor de tumores p53: mecanismos de acción en la proliferación y muerte celular". *Rev Invest Clin* 2001; 3: 266-73.
106. Michalovitz D, Halevy O, Oren M. "p53 mutations: gains or losses?". *J Cell Biochem* 1991; 45:22-9.

107. Miller TM, Moulder KL, Knudson CM, Creedon DK, Deshmukh M, Korsmeyer SJ, et al. "Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death". *J Cell Biol* 1997; 139:205-17.
108. Moll UM, Riou G, Levine AJ. "Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion". *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7262-6.
109. Monzó M. "El ciclo celular y sus alteraciones". En: Cortés-Funes H, Díaz-Rubio E, García-Conde J, Germá Lluch JR, Guillem Porta V, López López JJ, Moreno Nogueira JA, Pérez Manga G.(Eds). *Oncología Médica*. Madrid: Ed Nova Sidonia Oncología; 1999. p 26-32.
110. Monzó Planella M. "Oncogenes". En: Rosell R, Abad A, Monzó M, Barnadas A. (Eds). *Manual de Oncología Clínica y Molecular*. Madrid: Ed. Arán; 2000. p 39-48.
111. Morgan DJ, Kreuwel HTC, Fleck S, Levitsky HI, Pardoll DM, Sherman LA. "Activation of low avidity CTL specific for a self epitope results in tumor rejection but not autoimmunity". *J Immunol* 1998; 160: 643-51.
112. Morkel M, Wenkel J, Bannister AJ, Kouzarides T, and Hagemeyer C. "An E2F-like repressor of transcription". *Nature* 1997; 390: 567-8.
113. Mottolese M, Benevolo M, Del Monte G, Buglioni S, Papaldo P, Nistico C, et al. "Role of p53 and BCL-2 in high-risk breast cancer patients treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy". *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 722-9.
114. Mowat M, Cheng A, Kimura N, Bernstein A, Benchimol S. "Rearrangements of the cellular p53 in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus". *Nature* 1985; 314: 633-6.
115. Nagata S. "Apoptosis by death factor". *Cell* 1997; 88: 355-65.
116. Nemunaitis J, Swisher SG, Timmons T. "Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small cell lung cancer". *J Clin Oncol* 1999; 18: 609-22.

117. Nijman HW, Van der Burg SH, Vierboom MPM, Houbiers JGA, Kast WM, Melief CJM. "p53, a potential target for tumor-directed T cells". *Immunol Lett* 1994; 40: 171-8.
118. Noguchi Y, Chen YT, Old LJ. "A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3171-5.
119. Núñez Domènech L, Escuín Borrás D, Barnadas Molins A. "p53: gen supresor de tumores". En: Rosell R, Abad A, Monzó M, Barnadas A (Eds). *Manual de Oncología Clínica y Molecular*. Madrid: Ed. Arán; 2000. p 109-117.
120. Nuñez Roldán A. "El sistema HLA". En: Farreras P, Rozmán C (Eds). *Medicina Interna*. 12ed. Barcelona: Ed Doyma; 1992. p 2614-47.
121. Oehen SU, Ohashi PS, Burki K, Hengartner H, Zinkernagel RM, Aichele P. "Escape of thymocytes and mature T cells from clonal deletion due to limiting tolerogen expression levels". *Cell Immunol* 1994, 158: 342-52.
122. Oliver M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. "The IARC TP53 Database: new online mutation analysis and recommendations to users". *Hum Mutat* 2002; 19: 607-14.
123. Osborne RJ, Merlo GR, Mitsudi T, Venesio T, Liscia DS, Cappa AP, et al. "Mutations in the p53 gene in primary human breast cancers". *Cancer Res* 1991; 51: 6194-8.
124. Ostrowski JL, Sawan A, Henry L, Wright C, Henry JA, Hennessy C, et al. "P53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study". *J Pathol* 1991; 164:75-81.
125. Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V. "Cooperation between gene encoding p53 tumor antigen and ras in cellular transformation". *Nature* 1984; 312: 649-51.
126. Pardee, AB. "G1 events and regulation of cell proliferation". *Science* 1989; 264: 603-8.

127. Perkins AS, Stern FS. "Biología molecular del cáncer: oncogenes". En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Eds). *Cáncer: Principios y Práctica de Oncología*. Filadelfia: Lippincot-Raven Publishers; 1997. p 79-102.
128. Perona R, Lacal JC. "Sistemas de transmisión de señales". En: Cortés-Funes H, Díaz-Rubio E, García-Conde J, Germá Lluch JR, Guillem Porta V, López López JJ, Moreno Nogueira JA, Pérez Manga G.(Eds). *Oncología Médica*. Madrid: Ed Nova Sidonia Oncología; 1999. p 34-41.
129. Phol J, Goldfinger N, Radler-Phol A, Rotter V, Schirmacher V. "p53 increases experimental metastatic capacity of murine carcinoma cells". *Mol Cell Biol* 1988;8 : 2071-81.
130. Poller DN, Roberts EC, Bell JA, Elston CW, Blammey RW, Ellis IO. "p53 protein expression in mamary ductal carcinoma in situ: relationship to immunohistochemical expression of estrogen receptor and c-erbB-2 protein". *Hum Pathol* 1993; 24: 463-8.
131. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. "A model for p53 induced apoptosis". *Nature* 1997; 389: 300-5.
132. Rainov NG, Dobberstein KU, Fittkau M, Bahn H, Holzhausen HJ, Gantchev L, et al. "Absence of p53 antibodies in sera from glioma patients". *Clin Cancer Res*. 1995; 1: 775-81.
133. Ralhan R, Nath N, Agarwal S, Mathur M, Wasylyk B, Shukla NK. "Circulating p53 antibodies as early markers of oral cancer: correlation with p53 alterations". *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2147-52.
134. Rogel A, Popliker M, Webb CG, Oren M. "p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos and tumors". *Mol Cell Biol* 1985; 5:2851-5.
135. Ropke M, Regner M, Claesson MH. "T cell-mediated cytotoxicity against p53-protein derived peptides in bulk and limiting dilution cultures of healthy donors". *Scand J Immunol* 1995; 42: 98-103.

136. Ropke M, Hald J, Guldberg P, Zeuthen J, Norgaard L, Fugger L, et al. "Spontaneous human squamous cell carcinomas are killed by a human cytotoxic T lymphocyte clone recognizing a wild-type p53-derived peptide". *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14704-7.
137. Rosen N. "Biología molecular de los tumores gastrointestinales". En : DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Eds). *Cáncer: Principios y Práctica de Oncología*. 5ed. Filadelfia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p 971-980.
138. Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, et al. "Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer". *Nat Med* 1996a; 2: 985-91.
139. Roth J, Dittmer D, Rea D, Tartaglia J, Paleotti E, Levine AJ. "p53 as a target for vaccines: recombinant canarypox virus vectors expressing p53 protect mice against lethal tumor challenge". *Proc Natl Acad Sci USA* 1996b; 93: 4781-6.
140. Schlichtholz B, Tredaniel J, Lubin R, Zalzman G, Hirsch A, Soussi T. "Analyses of p53 antibodies in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant regions in the p53 protein". *Br J Cancer* 1994; 69:809-16.
141. Sebzda E, Wallace VA, Mayer J, Yeung RS, Mak TW, Ohashi PS. "Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide". *Science* 1994; 263: 1615-8.
142. Sherr CJ, and Roberts, JM. "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases". *Genes Dev* 1995 9:1149-63.
143. Shet P, Katayose D, Li Z, Kim M, Wersto R, Craig C, et al. "A recombinant adenovirus expressing wild type p53 induces apoptosis in drug resistant breast cancer cells: a gene therapy approach for drug resistant cancers". *Cancer Gene Ther* 1997; 4: 383-90.
144. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwchheimer K, Rosenblum M, Cavence W, Volgestein B. "Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumor progression". *Nature* 1992; 355: 846-51.

145. Skar JL, Costa JC. "Principios de manejo del cáncer: patología molecular". En: DeVita VT, Hellman S, Roenberg SA (Eds). *Cáncer: Principios y Práctica de Oncología*. 5ed. Filadelfia: Lippincot-Raven Publishers; 1997. p 259-84.
146. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B. "Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review". *Int J. Cancer* 1994; 57: 1-9.
147. Soussi T. "p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review". *Cancer Res* 2000; 60: 1777-88.
148. Spitz FR, Nguyen D, Skibber JM. "Adenoviral mediated wild-type p53 gene expression sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation". *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1665-71.
149. Starzynska T, Bromley M, Ghosh A, Stern PL. "Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma". *Br J Cancer* 1992; 66: 558-62.
150. Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, Wahl GM. "A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localiation and p53 activity by NES masking". *EMBO J* 1999; 18: 1660-72.
151. Tannoch VJ, Hinds PW, Li-Huei Tsai. "Cell cycle control" En: *Cancer Gene Therapy: Past Achievements and Future Challenges*. Nueva York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2000.
152. Tarón Roca M. "Ciclo celular". En: Rosell R, Abad A, Monzó M, Barnadas A (Eds). *Manual de Oncología Clínica y Molecular*. Madrid: Ed Arán; 2000. p 49-57.
153. Tetu B, Brisson J, Plante V, Bernard P. "P53 and c-erbB-2 as markers of resistance to adjuvant chemotherapy in breast cancer". *Mod Pathol* 1998; 11:823-30.
154. Theobald M, Biggs J, Dittmer D, Levine AJ, Sherman LA. "Targeting p53 as a general tumor antigen". *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11993-7.
155. Theobald M, Ruppert T, Kuckelkorn U, Hernandez J, Häussler A, Antunes Ferreira E, et al. "The sequence alteration associated with a mutational hotspot in

- p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope". *J Exp Med* 1998; 188: 1017-28.
156. Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lunch HT, et al. "Accumulation of p53 tumor supressor gene-protein-an independent marker of prognosis in breast cancers". *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:845-55.
157. Thorlacius S, Borresen AL, Eyfjord JE. "Somatic p53 mutations in human breast carcinomas in an icelandic population: a prognosotic factor". *Cancer Res* 1993; 53: 1637-41.
158. Trivers GE, Cawley HL, De Benedetti VMG, Hollstein M, Marion MJ, Bennett WP, et al. "Anti-p53 antibodies in sera of workers occupationally exposed to vinyl chloride". *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1400-7.
159. Trivers GE, De Benedetti VMG, Cawley HL, Caron G, Harrington AM, Bennet WP, et al. "Anti-p53 antibodies in sera from patients with chronic obstructive pulmonary disease can predate a diagnosis of cancer". *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1767-75.
160. Vierboom MPM, Nijman HW, Offringa R, Ven der Voort EIH, Van Hall T, Van den Broek L, et al. "Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes". *J Exp Med* 1997; 186: 695-704.
161. Voss RH, Lotz C, Cellary A, Theobald M. "Targeting p53, hdm2 and CD19: vaccination and immunologic strategies". *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: S43-5.
162. Wang-Rodriguez J, Cross K, Gallagher S, Djahanban M, Armstrong JM, Wiedner N, et al. "Male breast carcinoma: correlation of ER, PR, Ki-67, Her2-Neu and p53 with treatment and survival, a study of 65 cases". *Mod Pathol* 2002; 15: 853-61.
163. Webb S, Morris C, Sprent J. "Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity". *Cell* 1990; 63:1249-56.

164. Winter SF, Minna JD, Johnson BE, Takahashi T, Gazda AF, Carbone DP. "Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation". *Cancer Res* 1992; 52: 4168-74.
165. Wolf HK, Stober C, Hohenfellner R, Leissner J. "Prognostic value of p53, p21/WAF1, Bcl-2, Bax and Ki-67 immunoreactivity in pT1 G3 urothelial bladder carcinomas". *Tumour Biol* 2001; 22: 328-36.
166. Yanuck M, Carbone DP, Pendleton CD, Tsukui T, Winter SF, Minna JD, et al. "A mutant p53 tumor suppressor protein is a target for peptide-induced CD8+ cytotoxic T cells". *Cancer Res* 1993; 53: 3257-61.
167. Yuan J. "Transducing signals of life and death". *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:247-51.
168. Zalcman G, Schlichtholz B, Trédaniel J, Urban T, Lubin R, Dubois I, et al. "Monitoring of p53 auto antibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment". *Clin. Cancer Res* 1998; 4: 1359-66.
169. Zeh HJ, Leder GH, Lotze MT, Salter RD, Tector M, Stuber G, et al. "Flow-cytometric determination of peptide-class I complex formation. Identification of p53 peptides that bind to HLA-A2". *Hum Immunol* 1994; 39: 79-86.