

ANTICUERPO CONTRA EL EPÍTOPO

GALACTOSIL (α 1-3) GALACTOSA (ANTIGAL). UTILIDAD DE LOS NIVELES SÉRICOS EN CÁNCER

DIMAS HERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA. CARACAS

RESUMEN

OBJETIVOS: Comparar los niveles séricos de antiGal y Ca 15-3 en pacientes con cáncer de mama, evaluar los niveles séricos de antiGal en tumores sólidos y neoplasias hematológicas. **MÉTODOS:** Se estudiaron 45 pacientes con cáncer de mama, 22 con lesiones benignas, 69 con otros tumores sólidos, 37 con neoplasias hematológicas. En pacientes con cáncer de mama y lesiones benignas se cuantificó antiGal por el método de ELISA usando la laminina de ratón extraída de línea de célula tumoral Engelbreth-Holm-Swarm, y CA 15-3. En otros tumores sólidos y hematológicos se midió solamente antiGal. **RESULTADOS:** AntiGal y CA 15-3 se encontraron elevados en pacientes con cáncer de mama ($P<0,01$); en el grupo de enfermedad temprana, se encontraron elevado los niveles de antiGal ($P<0,01$), pero no niveles de CA 15-3. Hubo diferencias en niveles de antiGal y CA 15-3 entre pacientes ganglios positivos y negativos ($P<0,01$), pero no de acuerdo al estado de los receptores de estrógeno. Hubo diferencias pre y postratamiento ($P<0,01$). Hubo niveles elevados de antiGal ($P<0,01$) en tumores sólidos, excepto cáncer de próstata y riñón, y en neoplasias hematológicas ($P<0,01$). **CONCLUSIONES:** El antiGal podría contribuir con los mecanismos de inmunidad humoral disminuyendo la capacidad de metatizar de la célula tumoral. En estudios futuros se debería cuantificar el antiGal en forma seriada después del tratamiento para definir su papel como marcador tumoral, ya que las evidencias preliminares le dan utilidad en cáncer de mama temprano cuando se compara con el CA 15-3.

PALABRAS CLAVE: Cáncer de mama, tumores sólidos, tumores hematológicos, antiGal, CA 15-3.

SUMMARY

OBJECTIVE: To compare the serum levels of antiGal and CA 15-3 in patients with breast cancer, and quantify the serum levels of antiGal in solid tumors and hematological malignancies. **METHOD:** We studied forty five patients with breast cancer, 22 of them with benign lesions, and 69 with other solid tumors, and 37 with hematological malignancies. In breast cancer patients and benign lesions antiGal was quantified by ELISA method using isolated mouse laminin from the tumor Engelbreth-Hol-Swarm cell line, and CA 15-3. In other solid tumors and hematological malignancies only antiGal levels were measured. **RESULTS:** The antiGal y CA 15-3 levels were elevated in breast cancer patients ($P<0.01$), we found high antiGal levels ($P<0.01$) in the early disease group of patients, but no CA 15-3 levels. There was difference ($P<0.01$) between positive and negative lymph node group of patients, and there was no difference according estrogen receptor status. There was difference ($P<0.01$) in levels pre and post-treatment. There were elevated ($P<0.01$) antiGal levels in the serum of patients with other solid tumors, except prostate and renal cancer, and in hematological malignancies ($P<0.01$). **CONCLUSIONS:** The antiGal should contribute to the humoral immunity mechanisms to decrease the invading and metastazing capacity of the human tumor cells. In future studies we should quantify the antiGal serially after treatment, to define its value as a tumor marker, since there is preliminary evidence of its usefulness in early breast cancer when comparing it with CA 15-3.

KEY WORDS: Breast cancer, solid tumors, hematological malignancies, antiGal, CA 15-3.

Recibido 22/05/2006 Revisado 14/11/2006
Aceptado para publicación 20/11/2006

Correspondencia: Dr. Dimas Hernández
Escuela de Medicina José María Vargas. UCV.
San José Caracas. Venezuela. E-mail:
dimas78@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

En 1984 Galili y col.⁽¹⁾ aislaron un anticuerpo (Ac) natural de tipo IgG con una reactividad anti- α -galactosil. Representa el 1 % del total de IgG circulante e interactúa específicamente contra el epítipo galactosil α 1 \rightarrow 3 galactosa β 1 \rightarrow 4 glucosa N-acetil-R (Gal α 1 \rightarrow 3Gal o α -galactosil terminal). El Ac antigalactosil α 1 \rightarrow 3 galactosa (AntiGal) es único entre los anticuerpos naturales conocidos, debido a su concentración inusualmente elevada en el suero (30-100 μ g/mL) y su presencia en todos los seres humanos⁽²⁾. Otras especies de mamíferos productores de este Ac son los monos del viejo mundo (gorilas, chimpancés, orangutanes, monos babuinos); en el resto de los mamíferos no se evidencia actividad antiGal, y de hecho expresan en sus células el epítipo α -galactosil⁽³⁾. El epítipo Gal α 1 \rightarrow 3 Gal es una estructura glucosídica presente en tejidos normales, malignos y en las membranas de eritrocitos de mamíferos (ej: ratones, conejos, cerdos, etc.); sin embargo, no ha sido detectado en tejidos humanos normales^(4,5).

El epítipo Gal α 1 \rightarrow 3 Gal es producto de la glucosilación de las membranas celulares de los prosimios, monos del viejo mundo y mamíferos no primates. En este proceso participa la enzima^(1,3) galactosiltransferasa, sintetizada en el aparato de Golgi⁽⁶⁾; sin embargo, esta enzima se encuentra inactivada en humanos, por lo tanto la glucosilación no ocurre en las membranas celulares humanas, sino en situaciones especiales (ej: eritrocitos senescentes)⁽⁷⁾.

Ha sido demostrado que el 1 % de los linfocitos B humanos son capaces de producir antiGal⁽²⁾, lo que sugiere una vigorosa respuesta inmune posiblemente contra antígenos de la flora bacteriana normal en humanos previniendo la invasión de algunas de estas bacterias⁽⁸⁾.

Durante la última década, nuestro conocimiento sobre este Ac natural se ha expandido considerablemente. Ha sido demostrado su papel fundamental en la inmunidad humoral contra especies de leishmania y tripanosoma⁽⁹⁻¹¹⁾, la eliminación de los eritrocitos senescentes⁽⁷⁾, la inactivación de los retrovirus C⁽¹²⁾, su comportamiento como Ac con actividad similar a la TSH como ocurre en la tiroiditis auto inmune⁽¹³⁾ y el rechazo hiperagudo a xenotransplantes⁽¹⁴⁾. Más recientemente se ha estudiado la participación de este Ac natural en cáncer. En 1983 se reportó la presencia de grupos β -galactosil en células de teratocarcinoma, siendo reconocidos estos determinantes por el suero de pacientes con tumores ováricos de células germinales; además, fue demostrada la interacción del antiGal con líneas celulares de astrocitoma y rhabdomyosarcoma⁽¹⁵⁾. Castronovo y col.⁽¹⁶⁾ demostraron a su vez, la presencia del epítipo Gal(α 1-3) gal en otras líneas de células tumorales así como en lesiones malignas de la mama. La expresión de este epítipo en la célula tumoral plantea que el anticuerpo antiGal tenga un rol específico en la vigilancia inmune tumoral eliminando las células malignas que expresan Gal (α 1-3) gal en su superficie; y además, una participación directa en bloquear la capacidad de dar metástasis de diferentes células tumorales⁽¹⁵⁾. El mecanismo de expresión de estos epítipos en células malignas se desconoce, pero se postula que se lleve a cabo gracias a la desrepresión de la enzima α (1,3) galactosil transferasa por parte de la célula tumoral, con la expresión de novo del antígeno galactosil(α 1-3)galactosa⁽¹⁷⁾.

Ha sido reportado previamente variaciones de los niveles séricos de antiGal en pacientes con cáncer de mama pre y postratamiento⁽¹⁸⁾, así como niveles séricos elevados de antiGal en el 42 % de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) 3⁽¹⁹⁾ y en 22 % a 30 % de pacientes con NIC 1⁽²⁰⁾. Esta reactividad serológica se puede relacionar con la expresión de residuos de β -galactosil en algún momento de la evolución

de la infección por el virus del papiloma humano (VPH) en el cuello uterino, sugiriendo la participación de mecanismos de inmunidad humoral⁽²¹⁾.

OBJETIVOS

1. Comparación de los niveles séricos de antiGal y CA-15-3 en pacientes con cáncer de mama.
2. Evaluar los niveles séricos de antiGal en pacientes con tumores sólidos y hematológicos.

MÉTODOS

PACIENTES: Esta investigación fue previamente aprobada por el comité de ética de las instituciones participantes. El estudio se realizó entre los años 1999-2004 con pacientes provenientes del Instituto Oncológico "Luis Razetti," Instituto de Hematología-Oncología, Banco Municipal de Sangre del Distrito Metropolitano y Hospital Vargas de Caracas. Se incluyeron 45 pacientes con cáncer de mama con una edad promedio de 52 años (rango, 40-63 años), 22 con enfermedades benignas de la mama con una edad promedio de 38 años (rango, 26-50 años) 69 con otros tumores sólidos (35 con cáncer de cuello uterino invasor temprano, 14 con cáncer de células no pequeñas de pulmón, 11 con adenocarcinoma del confluente biliar-pancreático, 5 con cáncer de próstata, 4 con carcinoma de células claras de riñón) y 37 con neoplasias hematológicas (17 con linfoma no Hodgkin, 10 con leucemia linfoblástica aguda y 10 con leucemia mieloide aguda). El grupo de otros tumores sólidos y hematológicos tuvo una edad promedio de 51 años (rango, 34 – 74 años) y todos tenían enfermedad avanzada (estadio III o IV). El grupo control para cáncer de mama estuvo constituido por 24 mujeres sanas con una edad promedio de 45 años (rango, -56 años), y el grupo control para otros tumores sólidos y hematológicos lo formaron 25 individuos sanos,

de uno u otro sexo, con una edad promedio de 55 años (rango, 31 – 75). En todos los pacientes se realizó su historia clínica, los estudios pertinentes de cada caso en particular, la intradermorreacción con leishmanina y la serología para la enfermedad de Chagas. Se excluyeron aquellos pacientes con antecedentes de enfermedad autoinmune, intradermorreacción con leishmanina o serología para la enfermedad de Chagas positiva.

INTRADERMORREACCIÓN CON LEISHMANINA

La leishmanina fue producida en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Biomedicina (UCV). Para prepararla se utilizaron promastigotes de leishmania mexicana subespecie pifanoi, cultivadas en medio mínimo esencial suplementado con suero fetal de ternera al 2,5 %, los cuales se colocaron en autoclave a 120° C por 20 minutos y se suspendieron en solución de fosfato básico salino a una concentración final de 6,5 x10 organismos por mililitro. Se aplicó a cada paciente 0,1 mL vía intradérmica a nivel de la unión del tercio proximal con el tercio medio de la cara anterior del antebrazo izquierdo. A las 72 horas se examinó la zona de la inoculación y se consideró positiva un área de induración mayor de 10 mm⁽²²⁾.

SEROLOGÍA PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Se utilizó la determinación de fijación de complemento y la hemoaglutinación indirecta para descartar la presencia de la enfermedad de Chagas en los pacientes y controles. Fueron considerados positivos títulos mayores de 1:16 y 1:256 respectivamente ⁽²³⁾.

CUANTIFICACIÓN EN SUERO DEL ANTICUERPO ANTIGAL

A cada paciente y control se le extrajeron 5

mL de sangre, y el suero se obtuvo por centrifugación a 1500 rpm, dos veces, durante 5 minutos. Se utilizó la técnica de ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas) para cuantificar el Ac. La laminina utilizada como antígeno fue aislada de la línea tumoral Engelbreth-Holm-Swarm desarrollada en ratones C57BL, como ha sido previamente descrito⁽²⁴⁾. La prueba de ELISA empleada utilizó anti-inmunoglobulina humana polivalente producida en cabra conjugada con peroxidasa purificada de rábano, y se realizó sobre placas de poliestireno de 96 pozos, cada uno de los cuales tenía capacidad de 200 μ L (Dynatech Laboratorios Inc., Alexandria, Virginia, USA). Se preparó la solución con el antígeno en buffer carbonato 0,01 M, pH 9,6, con una concentración de laminina de 1 μ g/mL. Se vertió 200 μ L de esta solución en cada pozo y se incubó a 4° C durante 24 horas, se desechó por aspiración el exceso de solución y se lavó tres veces con solución buffer fosfato salino, pH 7,2, con Tween 20 0,05 % (PBS-Tween 20). Los sueros a ser analizados se diluyeron hasta 1:1600 (considerada la dilución óptima según experiencia de estudios previos)⁽²²⁾ en PBS-Tween 20, cada suero fue vertido por triplicado, 200 μ L por pozo; cada placa contenía controles internos positivos con suero de enfermos con Chagas y leishmaniasis, y controles internos negativos con suero de sujetos sanos. Las placas se incubaron por cuatro horas a temperatura ambiente en cámara húmeda; se desechó el exceso y se lavó tres veces con PBS-Tween 20. Se vertió 200 μ L del conjugado enzimático previamente descrito en una dilución 1:1500 en PBS-Tween 20, y se incubó a 4° C en oscuridad por 16 horas. Se desechó el remanente y se lavó tres veces con PBS-Tween 20. Luego se agregó 200 μ L del cromógeno AZETSA (*Sigma Chemical Company*) en buffer fosfato 0,01 M pH 6,0; se incubó en la oscuridad por 45 minutos. Se detuvo la reacción agregando 10 μ L de HCl 5N. La densidad óptica se leyó a 405 nm (DO 405) con MicroELISA reader (Dynatech). Cada

muestra fue evaluada en triplicado, y las medias aritméticas de las lecturas de DO 405 fueron utilizadas en todos los análisis.

CUANTIFICACIÓN EN SUERO DEL MARCADOR TUMORAL CA 15-3

Se utilizó el ensayo CA 15-3 IMX de Abbot Laboratories⁽²⁵⁾ que está constituido por Ac monoclonales (115D8 y DF3) obtenidos de ratones que reaccionan contra antígenos presentes en los galactocitos y en la membrana del carcinoma de mama humano. El ensayo consiste en la mezcla de una muestra de suero con el anticuerpo monoclonal 115D8, se diluye y luego se incuba. Posteriormente se transfiere la mezcla a una matriz de fibra de vidrio y es lavada con un diluyente buffer, posteriormente se agrega el Ac DF3, y se forma un complejo 115D8-antígeno-DF3-enzima. Finalmente se agrega el sustrato y la señal fluorescente se mide en un fluorímetro. Se consideran valores normales comprendidos entre 0 y 25 U/mL.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Nosotros evaluamos la hipótesis nula: “los niveles de antiGal en el suero de los pacientes no difieren del grupo control”. Las medias aritméticas y las desviaciones estándar se usaron para la descripción estadística. Se utilizó el SPSS (Chicago, IL) e InStat (GraphPad Software, San Diego, CA) para el análisis de los datos. Debido a que los datos mostraron una distribución no paramétrica, se empleó el análisis de la varianza de Kruskal-Wallis seguido del pos test de Dunn para múltiples comparaciones. Valores de $P \leq 0,01$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

CÁNCER DE MAMA: El Ac antiGal y el marcador tumoral CA 15-3 se cuantificaron en el suero de 45 pacientes con cáncer de mama

antes del tratamiento y en el suero de 27 pacientes postratamiento; además, ambos se evaluaron en 22 pacientes con lesiones benignas y 24 mujeres sanas. No hubo diferencias significativas al comparar los valores de antiGal y CA 15-3 entre lesiones benignas y controles; en cambio, la diferencia fue significativa al comparar cáncer de mama con lesiones benignas y controles ($P < 0,01$) (Cuadro 1).

Para facilitar las comparaciones, los pacientes con cáncer de mama se agruparon en enfermedad temprana (estadio I y II) y enfermedad avanzada (estadios III y IV). Los valores de antiGal se encontraron elevados con

respecto a los controles, tanto en enfermedad temprana como en avanzada ($P < 0,01$); sin embargo, no hubo diferencia al comparar el valor de antiGal entre enfermedad temprana y enfermedad avanzada (Cuadro 1). El CA 15-3 no mostró diferencia entre enfermedad temprana y los controles; en cambio, si hubo diferencia con respecto a la enfermedad avanzada ($P < 0,01$) (Cuadro 1). Al separar los pacientes en ganglios positivos y negativos, observamos diferencias significativas de los niveles de antiGal y CA 15-3 con respecto a los controles ($P < 0,01$) así como entre ambos grupos ($P < 0,01$) (Cuadro 2). Posteriormente se agruparon

Cuadro 1. Niveles séricos de antiGal y CA 15-3 en pacientes con enfermedades benignas y cáncer de mama.

Grupo	AntiGal (DO \pm DE)	CA 15-3(U/ml \pm DE)
Enfermedades benignas (n = 22)	205 \pm 67	15 \pm 4
Cáncer de mama (n = 45)	490 \pm 110	52 \pm 6
Temprano (n = 25)	472 \pm 67	19 \pm 6
Avanzado (n = 20)	402 \pm 71	67 \pm 12
Control (n = 24)	199 \pm 77	13 \pm 2

AntiGal, Antigalactosil (α 1-3) galactosa; n, número de pacientes; DO, Densidad óptica; DE, Desviación Estándar; U/mL, Unidades Internacionales por mililitro; Enfermedad benigna (AntiGal y CA 15-3) vs. Control, P: no significativa (NS); Cáncer de mama (AntiGal y CA 15-3) vs. Control, $P < 0,01$; Cáncer de mama temprano y avanzado (AntiGal) vs. Control, $P < 0,01$; Cáncer de mama (AntiGal) temprano vs. Avanzado, NS; Cáncer de mama temprano (CA 15-3) vs. Control, NS; Cáncer de mama avanzado (CA 15-3) vs. Control, $P < 0,01$; Cáncer de mama temprano (CA 15-3) vs. Avanzado, $P < 0,01$.

Cuadro 2. Niveles séricos de AntiGal y CA 15-3 en pacientes con cáncer de mama de acuerdo al estado ganglionar y receptores de estrógeno (RE).

Grupo	AntiGal (DO \pm DE)	CA 15-3(U/mL)
Ganglios positivos (n = 24)	666 \pm 57	68 \pm 5
Ganglios negativos (n = 21)	410 \pm 82	39 \pm 7
RE positivo (n = 27)	486 \pm 46	47 \pm 12
RE negativo (n=18)	426 \pm 105	42 \pm 10
Control (n = 24)	199 \pm 77	13 \pm 2

AntiGal, Antigalactosil (α 1-3) galactosa; n, número de pacientes; DO, Densidad Óptica; DE, desviación Estándar; U/mL, Unidades Internacionales por mililitro; Ganglios positivo y negativo (AntiGal y CA 15-3) vs. Control, $P < 0,01$; Ganglios positivo (AntiGal y CA 15-3) vs. Ganglios negativo, $P < 0,01$; RE positivo y RE negativo (AntiGal y CA 15-3) vs. Control, $P < 0,01$; RE positivo (AntiGal y CA 15-3) vs. RE negativo, no significativo.

los pacientes según el estado de los receptores de estrógeno, y observamos diferencias significativas en los valores de antiGal y CA 15-5 al comparar el grupo de receptores de estrógeno positivo y negativo con los controles ($P < 0,01$), pero no hubo diferencia al comparar ambos grupos entre sí (Cuadro 2). Logramos cuantificar los niveles séricos de antiGal y CA 15-3

Cuadro 3. Niveles séricos de AntiGal y CA 15-3 en pacientes con cáncer de mama antes y después del tratamiento

Grupo	Pret (n = 45)	Post (n = 27)	P
AntiGal (DO±DE)	490±110	218±96	<0,01
CA 15-3(U/mL)	52± 6	15±4	<0,01

Pret: pretratamiento. Post: postratamiento. AntiGal, Antigalactosil (1-3) galactosa; n, número de pacientes; P, significancia estadística; DO, Densidad Óptica; DE, Desviación Estándar; U/mL, Unidades Internacionales por mililitro.

Cuadro 4. Niveles séricos de AntiGal en pacientes con tumores sólidos y neoplasias hematológicas

Grupo	n	AntiGal (DO±DE)	P
Cáncer de cuello uterino	35	380±52	<0,01
Cáncer de pulmón (células No pequeñas)	14	476±37	<0,01
Adenocarcinoma confluyente Biliopancreático	11	415±30	<0,01
Cáncer de próstata	5	143±89	NS
Cáncer de riñón	4	106±76	NS
Linfoma no Hodgkin de células grandes	17	390±60	<0,01
Leucemia mieloide aguda	10	475±70	<0,01
Leucemia linfoblástica aguda	10	435±86	<0,01
Control	25	156±75	

AntiGal, Antigalactosil (1-3)galactosa; n, número de pacientes; DO, Densidad Óptica; DE, Desviación Estándar; P, significancia estadística; NS, no significante.

postratamiento (> 13 semanas posterior al tratamiento quirúrgico), en 27 pacientes (60 %), y encontramos valores bastante similares a los controles (Cuadro 3).

OTROS TUMORES SÓLIDOS Y HEMATOLÓGICOS

Los niveles de antiGal se midieron en 69 pacientes con otros tumores sólidos y 37 con neoplasias hematológicas. Hubo niveles de antiGal elevados en el suero de pacientes con cáncer de cuello uterino invasor temprano, cáncer de pulmón (no células pequeñas) y adenocarcinoma del confluyente biliopancreático ($P < 0,01$) (Cuadro 4) al compararlos con los controles; en cambio, no hubo en diferencias en los niveles de antiGal entre pacientes con cáncer de próstata y cáncer de células claras de riñón, y controles. Los pacientes con neoplasias hematológicas mostraron niveles elevados de antiGal en el suero ($P < 0,01$) (Cuadro 4).

DISCUSIÓN

Las células tumorales expresan una glicosilación aberrante de los epítomos de sus membranas, este proceso es característico de la transformación oncogénica. Uno de las vías descritas consiste en la síntesis incompleta o neosíntesis de glicoesfingolípidos y glicoproteínas⁽²⁶⁾. Una estructura glucídica llamada epítomo Gal α 1-3 Gal ha sido descrita en las membranas celulares de mamíferos no primates y en monos del nuevo mundo, pero no en el hombre; esta estructura también se ha encontrado en las membranas de las células tumorales humanas. Castronovo y col.⁽¹⁶⁾ han demostrado que entre un 14 % a 36 % de las líneas de células tumorales MCFT, SA52 y Bewo expresan el epítomo Gal α 1-3Gal; este mismo epítomo se ha encontrado en líneas celulares de astrocitoma y rhabdomyosarcoma⁽²⁷⁾. El Ac antiGal es capaz de inhibir el ataque de las células humanas del coriocarcinoma al endotelio de la vena umbilical humana, un paso crítico para la diseminación de las metástasis⁽¹⁶⁾, otras evidencias más recientes sugieren que el epítomo Gal α 1-3Gal, al igual que otras estructuras glucídicas, participan en interacciones célula – célula que conllevan a la invasión, y los cuales implican un mecanismo de reconocimiento carbohidrato – proteína y carbohidrato – carbohidrato vía selectinas, integrinas y sialoconjugados entre las plaquetas, las células tumorales y el endotelio^(28,29).

El cáncer de mama es un problema de salud pública en Venezuela. Ha sido demostrado que el diagnóstico precoz es el factor determinante en el pronóstico de estas pacientes. En los últimos años ha habido grandes avances en el diagnóstico y tratamiento de esta patología; sin embargo, aún quedan muchas interrogantes por resolver. Una de ellas está relacionada con el seguimiento una vez iniciado el tratamiento. Actualmente no existe un marcador tumoral que permita realizar pesquisa, ni tampoco que

permita detectar una recaída precoz⁽³⁰⁾. Nuestros hallazgos demostraron niveles elevados de antiGal y CA 15-3 en el suero de pacientes con cáncer de mama y niveles bajos en pacientes con lesiones benignas y controles sanos, este hecho establecería la utilidad de ambos marcadores en los casos sospechosos de cáncer de mama. Al separar las pacientes con cáncer de mama en un grupo con enfermedad temprana y otro con enfermedad avanzada encontramos uno de los hallazgos más relevantes. Los niveles de antiGal se detectaron más elevados en las pacientes con enfermedad temprana, no así los niveles del CA 15-3. Este hecho nos demuestra la mayor utilidad de los niveles de antiGal en la enfermedad temprana que los niveles de CA 15-3. Este hallazgo es muy significativo, porque los marcadores tumorales habitualmente utilizados en cáncer no son muy sensibles en los estadios iniciales⁽³¹⁾. Al estudiar el comportamiento de estos marcadores en pacientes ganglios positivos y negativos observamos niveles significativamente más altos en el grupo con ganglios positivos, lo cual sugiere la relación de ambos marcadores con el volumen tumoral, mientras mayor sea la carga tumoral (ganglios positivos) mayor será la producción de antiGal y CA 15-3. Con referencia a la condición de receptores de estrógeno positivo y negativo, no observamos diferencia de los marcadores entre los dos grupos. Este hallazgo puede deberse a que el número de receptores de estrógeno es proporcional a los receptores para la laminina en la célula tumoral, los cuales están implicados en la fase de adhesión en el proceso de metástasis^(32,33); esto traduce que la condición de receptores de estrógeno es un indicador pronóstico por su correlación con la potencialidad metastásica, pero no guarda relación con la carga tumoral en un momento determinado. Nosotros logramos realizar una segunda determinación del antiGal y el CA 15-3 en 27 pacientes, y de ese grupo 20 (74 %) recibieron alguna modalidad de quimioterapia que incluía la ciclofosfamida. Es de hacer notar

que por ser el antiGal una IgG, la cual tiene una vida media de cuatro semanas, su cuantificación después de ocho semanas, significa que estamos en presencia de síntesis de novo del antiGal⁽³⁴⁾. El nivel de ambos marcadores se redujo en forma significativa después de 13 semanas posterior a la cirugía. Esta reducción posiblemente se debe en primer lugar a la remoción de la masa tumoral; sin embargo, no podemos descartar el efecto directo de la ciclofosfamida sobre la inmunidad humoral. Estudios experimentales han demostrado que la ciclofosfamida disminuye la síntesis de anticuerpos. En ensayos de trasplante de cerdo a mandril, la ciclofosfamida se ha usado para disminuir la producción del Ac antiGal, debido a que este anticuerpo juega un papel importante en el mecanismo de rechazo hiper agudo⁽³⁵⁾. Estudios adicionales en trasplantes de órganos han demostrado que el uso de la ciclofosfamida en ciclos cortos es capaz de disminuir la producción de anticuerpos⁽³⁶⁾. Nosotros no pudimos cuantificar inmunoglobulinas séricas ni tampoco antigal una vez finalizado todo el tratamiento, por lo tanto cabe la posibilidad del efecto de la ciclofosfamida sobre los niveles detectados al menos 13 semanas posteriores al tratamiento quirúrgico.

El cáncer de cuello uterino invasor representa también un problema de salud pública en los países subdesarrollados y por tanto en Venezuela. Por esta razón evaluamos los niveles séricos de antiGal en 35 pacientes con cáncer de cuello uterino invasor temprano. Nosotros encontramos niveles séricos de antiGal significativamente elevados al compararlos con controles sanos. Existen evidencias previas de niveles séricos elevados de antiGal en pacientes con NIC^(19,20) así como niveles elevados en el moco cervical de pacientes con cuello uterino sano, infección por el VPH⁽³⁷⁾ y NIC 1⁽³⁸⁾. Posiblemente el VPH con su actividad oncogénica sea capaz de inducir desrepresión del gen que codifica la actividad de la enzima $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasa y de esta manera se

comiencen a expresar epítomos galactosil($\alpha 1-3$)galactosa en la membrana del epitelio cervical transformado provocando la producción de IgG con actividad antiGal por parte de los linfocitos. Otra posibilidad, es que el VPH también sea capaz de adquirir, a través de su multiplicación en células que ya expresan actividad $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasa, epítomos galactosil ($\alpha 1-3$) galactosa en su superficie, y de esta manera pueda desencadenar la producción de IgG con actividad antiGal. Ambas hipótesis no son excluyentes sino complementarias⁽³⁷⁾. Existen experiencias previas de virus, como el de la influenza, que son capaces de adquirir el epítopo galactosil($\alpha 1-3$)galactosa cuando se propaga en células caninas y bovinas⁽³⁹⁾. La expresión en el cáncer de cuello uterino de epítomos galactosil($\alpha 1-3$)galactosa bien sea en la célula transformada⁽²¹⁾ y/o el VPH que adquirió ese epítopo, serán los responsables de desencadenar, no solamente un mecanismo de inmunidad humoral local, sino también sistémico por los niveles elevados de antiGal en el suero de estas pacientes.

En el suero de pacientes con cáncer de pulmón (no de células pequeñas), también encontramos niveles elevados de antiGal en el suero. Ha sido propuesto que el cáncer es genéticamente muy inestable a dos niveles: a nivel cromosómico incluye ganancias (amplificaciones) y pérdidas de fragmentos, y a nivel de los nucleótidos del ADN incluye cambios simples o múltiples de bases nitrogenadas. Además, en cáncer de pulmón existe también una pérdida de la capacidad de metilación lo que conlleva a facilitar la expresión genética^(40,41). Estos hallazgos podrían conducir, a través de un mecanismo aún no bien definido, a la falla en la regulación del gen que codifica la enzima $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasa, permitiendo la síntesis del epítopo Gal($\alpha 1-3$) galactosa y su incorporación a diferentes glucoconjugados en la membrana de la célula tumoral.

Con referencia al adenocarcinoma del confluente biliopancreático, no tenemos una

alteración genética definida que nos pueda conducir a la desrepresión de la enzima α (1,3) galactosiltransferasa.

En el cáncer de próstata y el de células claras de riñón, no encontramos niveles elevados de antiGal; sin embargo, el número de pacientes fue muy pequeño para permitirnos conclusiones definitivas.

Otro hallazgo muy relevante fue encontrar niveles elevados de antiGal en un grupo de neoplasias hematológicas. En el caso particular de las leucemias agudas, existe un gen llamado TEL descubierto en estas patologías, el cual se encuentra localizado en el cromosoma 12. Este gen es capaz de fusionarse con el gen *abl* en el cromosoma 9⁽⁴²⁾. Esta fusión genera una inestabilidad en el cromosoma 12, sitio donde reside el gen responsable de la enzima α (1-3) galactosiltransferasa, por lo tanto este gen puede activarse y generar la síntesis del epítipo gal (α 1-3) galactosa.

Finalmente, nosotros podemos concluir que el Ac antiGal puede contribuir con los mecanismos de inmunidad humoral para disminuir la capacidad de invadir y dar metástasis de las células tumorales humanas, y también, que la inestabilidad genética de los tumores puede ser la responsable de la expresión del epítipo gal (α 1-3) galactosa en las membranas de las células tumorales. El gal

(α 1-3) galactosa debe ser considerado un antígeno asociado a las neoplasias, constituido por carbohidratos, el cual puede permitir el desarrollo de diferentes modalidades terapéuticas. Además, en estudios futuros debemos cuantificar los niveles séricos de antiGal después del tratamiento, para definir su papel como marcador tumoral, ya que en este estudio preliminar se evidencia su utilidad y superioridad en cáncer de mama temprano cuando se compara con el marcador tumoral CA 15-3.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración del personal del Servicio de Patología Mamaria, Instituto Oncológico "Luis Razetti"; Servicios de Cirugía, Ginecología y Urología, Hospital Vargas de Caracas; Servicio de Oncología e Inmunología, Instituto de Hematología y Oncología; Consulta de Hematología, Banco Municipal de Sangre, Distrito Metropolitano; y Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Biomedicina. Además, un reconocimiento a la colaboración de los residentes del posgrado de Medicina Interna, Hospital Vargas de Caracas, y a todos los pacientes participantes en el estudio.

REFERENCIAS

1. Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti--galactosyl specificity. *J Exp Med.* 1984;160:1519-1531.
2. Galili U, Anaraki F, Thall A, Hill-Black C, Radic M. One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the anti-Gal antibody. *Blood.* 1993;82:2485-2493.
3. Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher B. Man, Apes and Old World Monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl on nucleated cells. *J Biol Chem.* 1988;263:17755-17762.
4. Galili U, Clark MR, Shohet SB, Buehler J, Macher BA. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal α 1 \rightarrow 3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1987;84:1369-1373.

5. Galili U. Evolution and pathophysiology of the human natural anti- α -galactosyl IgG (anti-Gal) antibody. *Spriger Semin Immunopathol.* 1993;15:155-171.
6. Joziassse DH, Sharper JH, Jabs EW, Shaper NL. Characterization of an $\alpha 1 \rightarrow 3$ galactosyltransferase homologue on human chromosome 12 that is organized as processed pseudogene. *J Biol Chem.* 1991;266:6991-6998.
7. Galili U, Flechner I, Knyszynski A, Danon D, Rachmilewitz EA. The natural anti- α -galactosyl IgG on human normal senescent red blood cells. *Br J Haematol.* 1986;62:317-324.
8. Galili U, Mandrell RE, Hamahdeh RM, Shohet SB, Griffis JM. Interaction between human natural anti- α -galactosyl IgG and bacteria of the human flora. *Infect Immun.* 1988;56:1730-1737.
9. Avila JL, Rojas M, Towbin H. Serological activity against galactosyl ($\alpha 1-3$)galactose in sera from patients with several Kinetoplastida infections. *J Clin Microbiol.* 1988;126:126-132.
10. Ávila JL, Rojas M, Velásquez-Ávila G. Characterization of a natural human antibody with anti-galactosyl ($\alpha 1-2$)galactose specificity that is present at high titers in chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;47:413-421.
11. Avila JL, Rojas M, Rieber M. Antibodies to laminin in american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 1984;43:402-406.
12. Takeuchi Y, Porter CD, Straham KM, Preece AF, Gustafsson K, Cosset FL, et al. Sensitization of cells and retroviruses to human serum by ($\alpha 1-3$) galactosyltransferase. *Nature.* 1996;379:85-88.
13. Winand RJ, Anaraki F, Etienne-Dercef J, Galili U. Xenogenic thyroid-stimulating hormone-like activity of the human anti-Gal antibody. *J Immunol.* 1993;151:3923-3933.
14. Dorling A, Lechler RI. Prospects for xenografting. *Curr Opin Immunol.* 1994;6:765-769.
15. Galili U, Macher B. Interaction between anti-gal and human tumor cells: A natural defense mechanism? *JNCI.* 1989;81:178-179.
16. Castronovo V, Colin C, Parent B, Foidart JM, Lambotte R, Mahieu P. Possible role of human natural anti-gal antibodies in the natural antitumor defense. *JNCI.* 1989;212-216.
17. Galili U. Abnormal expression of -galactosyl epitopes in man. A trigger for autoimmune processes? *Lancet.* 1989;12:358-361.
18. Wilder J, Avila JL, Hernández DE, Pérez JR, Rojas M, Moreno L. Antigalactosyl 1-3 galactose (antigal) and breast cancer. *J Tumor Marker Oncol.* 1992;7:25-32.
19. Tremont-Lukats I, Arbona-Haddad E, Avila JL, Hernandez-Morales D, Rojas M, Martinez A. Immunoreactivity against GAL ($\alpha 1-2$) GAL and GAL ($\alpha 1-3$) GAL epitopes in sera from patients with cancer. *J Tumor Marker Oncol.* 1995;10:55-63.
20. Tremont-Lukats IW, Avila JL, Hernandez D, Vasquez J, Teixeira GM, Rojas M. Antibody levels against α -galactosyl epitopes in sera of patients with squamous intraepithelial lesions and early invasive cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1997;64:207-212.
21. Tremont-Lukats IW, Avila JL, Tapia F, Hernández D, Cáceres-Dittmar G, Rojas M. Abnormal expression of galactosyl ($\alpha 1-3$) galactose epitopes in squamous cells of the uterine cervix infected by human papillomavirus. *Pathobiology.* 1996;64:239-246.
22. Avila JL. α Galactosyl-bearing epitopes as potent immunogens in Chagas's disease and leishmaniasis. *Subcell Biochem.* 1999;32:173-214.
23. Maekelt GA. Komplementbindungsreaktion der Chagas-krankheit. *Z Tropenmed Parasitol.* 1960;2:152-186.
24. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin G. Laminin-A glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem.* 1979;254:9933-9937.
25. Van Kamp GJ, Bon GG, Verstraeten RA, Lynch D, Krikau M, Fluckiger J, et al. Multicenter evaluation of the Abbot IMx CA 15-3 tumor marker assay. *Clin Chem.* 1996;42:28-33.
26. Hakomori SI. Aberrant glycosilation in tumor and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res.* 1989;52:257-330.
27. La Temple DC, Galili U. Synthesis of α -Gal epitopes on human tumor cells and cell membranes. *Subcell Biochem.* 1999;32:369-371.
28. Honn K, Tang T, Cheen G. Platelets and cancer metastasis: More than epiphenomenon. *Thromb Hemost.* 1992;18:392-415.
29. Bevilacqua M, Nelson R. Selectins. *J Clin Invest.* 1993;91:379-387.
30. Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jessup JM, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: Clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2001;19:1865-1878.

31. Geraghty JG, Coveney EC, Sherry F, O'Higgins NJ, Duffy MJ. CA 15-3 in patients with locoregional and metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 1992;70:2831-2834.
32. Castronovo V, Taraboletti G, Liotta LA, Sobel EM. Modulation of laminin receptor expression by estrogen and progestins in human breast cancer cell lines. *JNCI*. 1989;81:781-788.
33. Millon R, Nicora F, Muller D, Eber M, Klein-Soyer C, Abecassis J. Modulation of human breast cancer cell adhesion by estrogens and antiestrogens. *Clin Exp Metastasis*. 1989;7:405-415.
34. Galili U, Wang L, La Temple DC, Radic MZ. The natural anti-Gal antibody. *Subcell Biochem*. 1999;32:79-105.
35. Morschheuser T, Steinhoff G, Indzhia L, Heiser Hein M, Lapin BA, Haverich A. Successful down regulation of natural and xenoreactive antibodies in pig-to-baboon xenotransplantation by high dose cyclophosphamide. *Transplant Proc*. 1997;29:970-972.
36. Ulrichs K, Euler HH, Schroeder JO, Muller-Ruchholtz W. Long term specific suppression of antibody production by plasmapheresis and a short-term course of cyclophosphamide. *Transplant Proc*. 1992;24:705-706.
37. Hernández DE, Cohen A, Correnti M. Anticuerpo anti-galactosil (alfa 1→3) galactosa: niveles en el moco cervical de pacientes con cuello uterino sano, infección por el virus del papiloma humano, y neoplasia intraepitelial cervical. *Rev Venez Oncol*. 2003;15(2):64-73.
38. Hernández DE, Cohen A, Fisher D, Correnti M, Harner R. Antibody levels against galactosyl (α 1→3)galactose epitopes in cervical mucus from patients with human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol*. 2002;84:374-377.
39. Galili U, Repik PM, Anaraki F, Mozdzanowska K, Washko G, Gerhard W. Enhancement of antigen presentation of influenza virus hemagglutinin by the natural human anti-Gal antibody. *Vaccine*. 1996;256:160-178.
40. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities of human cancers. *Nature*. 1998;396:643-649.
41. Esteller M, Sánchez-Céspedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small lung cell lung cancer patients. *Cancer Res*. 1999;59:67-70.
42. Papadopoulos P, Ridge SA, Boucher CA, Stocking C, Wiedemann LM. The novel activation of abl by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res*. 1995;55:34-38.