



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL CENTRAL "DR. IGNACIO MORONES PRIETO"

Trabajo de investigación para obtener el Diploma en la Especialidad De Anatomía Patológica

Asociación entre la inmunoexpresión Ly6G en neutrófilos intratumorales con la presencia de ganglios linfáticos positivos en pacientes con carcinoma de mama.

Dra. Sara Ivette Olmos Alcantar.

DIRECTOR CLÍNICO
Dr. David Miguel Martínez Galla.

DIRECTOR METODOLÓGICO
Dr. Juan Manuel Shiguetomi Medina.

Enero 2024



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
HOSPITAL CENTRAL "DR. IGNACIO MORONES PRIETO"

Trabajo de investigación para obtener el Diploma en la Especialidad de Anatomía Patológica

Asociación entre la inmunoexpresión Ly6G en neutrófilos intratumorales con la presencia de ganglios linfáticos positivos en pacientes con carcinoma de mama.

Dra. Sara Ivette Olmos Alcantar.

No. de CVU CONACYT 1098211; identificador de ORCID <https://orcid.org/0009-0006-8987-3829>

Director Clínico

Dr. David Miguel Martínez Galla.

No. de CVU CONACYT ; 77478 identificador de ORCID

Director Metodológico

Dr. Juan Manuel Shiguetomi Medina.

No. de CVU CONACYT 313177; identificador de ORCID 0000-000-3-4131-093X

SINODALES

Dra. Nadia Judith Gómez Hernández
Sinodal

Dra. Claudia Peña Zepeda
Sinodal

Dra. Olga Johnson Ponce
Suplente

Dr. Omar Enrique Falcón Delgado
Sinodal

Enero 2023



Asociación entre la inmunexpresión Ly6G en neutrófilos intratumorales con la presencia de ganglios linfáticos positivos en pacientes con carcinoma de mama. © 2024 Por Sara Ivette Olmos Alcantar. Se distribuye bajo [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Especialidad en Anatomía Patológica

Asociación entre la inmunoexpresión Ly6G en neutrófilos intratumorales con la presencia de ganglios linfáticos positivos en pacientes con carcinoma de mama.

Presenta
Dra. Sara Ivette Olmos Alcantar

Firmas

Asesor Dr. David Miguel Martínez Galla	
Co – asesor Dr. Juan Manuel Shiguetomi Medina	

Sinodales	
Dra. Nadia Judith Gómez Hernández	
Dra. Claudia Peña Zepeda	
Dra. Olga Johnson Ponce	
Dr. Omar Enrique Falcón Delgado	

Dr. Juan Manuel López Quijano Jefe del Posgrado Clínico de la Facultad de Medicina	Dra. Nadia Judith Gómez Hernández Coordinador de la Especialidad en Anatomía Patológica

RESUMEN

Introducción.

Se conoce que el cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasia en mujeres, en México y en el mundo, siendo la mayoría de casos detectados en etapas clínicas avanzadas, ofreciendo menores opciones terapéuticas y dando un peor pronóstico. El Ly6G (Antígeno leucocitario 6 complejo locus G6D) es un antígeno de diferenciación ligado a glicosilfosfatidilinositol (GPI), de 21-25 kD que se expresa en neutrófilos de manera transitoria durante su desarrollo en la médula ósea. La expresión de este antígeno en neutrófilos periféricos se correlaciona directamente con el nivel de diferenciación y maduración de la célula. Este sello distintivo hace que Ly6G sea un buen marcador para estas poblaciones celulares inmaduras. Actualmente se estudia su relación en cáncer debido a sus acciones protumorales. **Objetivos.** Determinar la asociación entre la inmunoexpresión tumoral de Ly6G con la presencia de ganglios linfáticos positivos en pacientes con carcinoma de mama. **Diseño de estudio:** Transversal retrospectivo. **Material y métodos.** Se obtuvieron productos de mastectomía con disección axilar del 1ro de enero de 2019 al 31 de diciembre de 2022 con diagnóstico histopatológico de carcinoma de mama con ganglios linfáticos positivos y negativos. Se evaluó el material y se seleccionaron los bloques para realizar el estudio de inmunohistoquímica con la evaluación de los criterios histológicos de carcinoma de mama, categorizando los resultados en positivos y negativos. **Resultados.** Se analizaron 129 casos, de los cuales el 100% (129 casos) resultaron negativos a la inmunoexpresión de Ly6g. **Conclusiones.** El empleo del anticuerpo de inmunohistoquímica Anti-Ly6G en nuestros casos seleccionados, no fue útil en la identificación de neutrófilos protumorales. No fue posible establecer la asociación entre la inmunoexpresión Ly6G en neutrófilos intratumorales con la presencia de ganglios linfáticos positivos en pacientes con carcinoma de mama.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ÍNDICE.....	1
LISTA DE TABLAS	2
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE GRÁFICOS.....	5
DEDICATORIAS	7
RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS	8
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	9
ANTECEDENTES.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	19
SUJETOS Y MÉTODOS.....	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
ÉTICA.....	26
RESULTADOS.....	27
1. Biopsias de colon del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” del 2019-2022.....	27
DISCUSIÓN.....	29
LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXOS.....	35

LISTA DE TABLAS

RESUMEN.....	1
ÍNDICE.....	1
LISTA DE TABLAS.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE GRÁFICOS.....	5
DEDICATORIAS.....	7
RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	9
ANTECEDENTES.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	19
SUJETOS Y MÉTODOS.....	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
ÉTICA.....	26
RESULTADOS.....	27
1. Biopsias de colon del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” del 2019-2022.....	27
DISCUSIÓN.....	29
LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXOS.....	35

LISTA DE FIGURAS

RESUMEN.....	1
ÍNDICE.....	1
LISTA DE TABLAS.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE GRÁFICOS.....	5
DEDICATORIAS.....	7
RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	9
ANTECEDENTES.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	19
SUJETOS Y MÉTODOS.....	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
ÉTICA.....	26
RESULTADOS.....	27
1. Biopsias de colon del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” del 2019-2022.....	27
DISCUSIÓN.....	29
LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXOS.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMEN.....	1
ÍNDICE.....	1
LISTA DE TABLAS.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE GRÁFICOS.....	5
DEDICATORIAS.....	7
RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	9
ANTECEDENTES.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS.....	18

OBJETIVOS.....	19
SUJETOS Y MÉTODOS.....	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
ÉTICA.....	26
RESULTADOS.....	27
1. Biopsias de colon del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” del 2019-2022.....	27
DISCUSIÓN.....	29
LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXOS.....	35

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres, Lourdes Alcantar y Javier Olmos por haberme dado todo, por enseñarme lo más invaluable en la vida y por alentarme en cada paso de mi preparación profesional.

A mis hermanos, Alint, Valeria, Alexa e Ivan, por los recuerdos más felices, tiernos y amorosos.

A mi esposo Eduardo Isla por hacerme tan feliz, por inspirarme cada día, por su apoyo inigualable, su paciencia infinita y por el amor inmensurable e incondicional.

A mi bebé Javi que lo amo inmensamente y quien es la luz de mi vida.

A mi suegra Lore que con tanto amor nos acompaña y llena de alegría, y a mi suegro Antonio que siempre nos ha demostrado su cariño y apoyo.

Gracias familia. Los amo.

RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS

Un reconocimiento enorme a mi maestro y asesor de tesis, el Dr. David Martínez Galla, quien durante estos años ha demostrado tener un grandísimo corazón además de ser el mejor nefropatólogo del país. Gracias por su tiempo, por todas sus enseñanzas sobre patología y cultura general, por ser justo, equitativo e imparcial.

También un reconocimiento a la Dra. Nadia Gomez, porque siempre nos brinda su cariño y su apoyo incondicional.

Así como un reconocimiento para la Dra. Claudia Peña, quien durante estos años siempre estuvo atenta y se preocupó por nuestra salud mental y nos dió su cariño y enseñanza.

Un profundo agradecimiento y reconocimiento a Mine, quien su trabajo fue siempre impecable, con la mejor actitud e iniciativa, su cariño maternal y sus atenciones.

Así como a todas las demás personas que integran el departamento de Anatomía patológica del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.

Los recordaré con mucho cariño.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- BRCA-1:** Breast cancer 1 gen supresor de tumores.
- BRCA-2:** Breast cancer 2 gen supresor de tumores.
- ROS:** Especies reactivas de oxígeno.
- NETs:** Redes extracelulares de DNA.
- NETosis:** Muerte celular por liberación de redes extracelulares de DNA.
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico.
- NE:** Elastasa de neutrófilo.
- MPO:** Mieloperoxidasa.
- MMP-9:** Metaloproteinasa de matriz 9
- CG:** Catepsina G
- PR3:** Proteinasa 3.
- TANs:** Neutrófilos asociados a tumor.
- HDN:** Neutrófilos de alta densidad.
- LDN:** Neutrófilos de baja densidad.
- N1:** Neutrófilos tipo 1.
- N2:** Neutrófilos tipo 2.
- NK:** Natural Killer
- Ly6G:** Antígeno leucocitario 6 complejo locus G6D.
- GPI:** Glicosilfosfatidilinositol.
- kD:** Kilodalton.
- mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero.
- CXCL2:** Proteína inflamatoria de macrófagos 2-alfa.
- G-CSF:** Factor estimulante de colonias granulocíticas.
- ICAM-1:** Molécula de adhesión endotelial.
- VCAM-1:** Proteína de adhesión de células vasculares.
- IL-1b:** Interleucina 1 b.
- PAD4:** Proteína arginina-deiminasa tipo IV.

ANTECEDENTES.

Cáncer de mama en México

En México, el cáncer de mama es la neoplasia maligna que ocupa el primer lugar en incidencia (29,929 casos por 100,000 habitantes), prevalencia (99,288 casos en 5 años) y mortalidad (7,931 casos por 100,000 habitantes).(1) La distribución por entidad federativa de los nuevos casos de cáncer de mama en mujeres de 20 años o más en 2019, muestra que Morelos (151.94 por cada 100 mil mujeres de 20 años o más), Colima (139.62) y Aguascalientes (66.64) son las entidades con las tasas más elevadas. Las entidades con las menores tasas (de 9.29 a 13.64) son Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Yucatán, Campeche, Colima, Guerrero, Morelos, Hidalgo, Tabasco.(2) En más de la mitad de casos, no se logra identificar algún factor de riesgo que no sea el sexo (mujer) y la edad (mayores de 40 años). Ciertos factores aumentan el riesgo de cáncer de mama, como la edad mayor, la obesidad, el alcoholismo, los antecedentes de exposición a la radiación, reproductivos (menarca, paridad, lactancia), el tabaquismo y la terapia hormonal. Los antecedentes familiares de cáncer de mama, se asocian a mutaciones en BRCA-1 y BRCA-2, sin embargo la mayoría de las mujeres diagnosticadas, no tienen antecedentes familiares de cáncer de mama.(3)

Fisiopatología del cáncer de mama

El cáncer de mama surge de las células epiteliales de los conductos (85%) o lóbulos (15%) en el tejido glandular de la mama. Cuando el crecimiento neoplásico se limita al conducto o lóbulo se denomina carcinoma in situ, donde generalmente no causa síntomas y tiene un potencial mínimo de diseminación (metástasis).

Los carcinomas infiltrantes pueden evolucionar de un carcinoma in situ, o desarrollarse de manera independiente, e invadir el tejido mamario circundante, y diseminarse a los ganglios linfáticos cercanos (metástasis regional) o a otros órganos del cuerpo (metástasis a distancia), confiriéndole un mal pronóstico a las pacientes.(3)



El cáncer de mama es curable en aproximadamente 70 a 80% de las pacientes con enfermedad no metastásica. El cáncer de mama con metástasis en órganos distantes se considera incurable, aún con las terapias actualmente disponibles.(4)

Enfermedad metastásica

Es la diseminación sistémica de células neoplásicas que se alojan en un órgano distante, y es responsable de más del 90% de las muertes relacionadas con cáncer.(5) En la evolución que siguen las células tumorales para producir metástasis, se requiere de un microambiente tisular propicio, en el que diferentes tipos celulares, incluidos fibroblastos, células del sistema inmune, células endoteliales, así como la matriz extracelular, interaccionen entre ellas, mediante moléculas de señalización y enzimas, que permitan la progresión tumoral.

De las células inmunitarias que participan en la progresión de metástasis, los neutrófilos han sido de gran interés en esta línea de investigación. Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en el cuerpo humano, y son esenciales en la respuesta inmune. (6) Los mecanismos que utilizan comúnmente los neutrófilos para la defensa del cuerpo contra los diferentes microorganismos son; la fagocitosis, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la liberación de redes extracelulares de DNA (NETs).(7)

Redes extracelulares de DNA de Neutrófilos (NETs)

Las NETs fueron descritas por primera vez en 2004, como un mecanismo novedoso de muerte celular programada, que se caracteriza por la desintegración de la membrana nuclear, combinando los componentes nucleares (DNA e histonas) y citoplásmicos (gránulos), incitando la formación y liberación de redes de DNA al espacio extracelular, mediante la rotura de la membrana celular plasmática, con el fin específico de atacar microorganismos.(8) Actualmente se conocen a detalle los componentes de estas redes, que se liberan como una estructura tridimensional constituida por fibras de 15-17nm formadas por DNA e histonas H1, H2A, H2B, H3, y H4, así como proteínas granulares incluyendo

elastasa de neutrófilo (NE), mieloperoxidasa (MPO), metaloproteinasas de matriz 9 (MMP-9), calprotectina, catepsina G (CG) y proteinasa 3 (PR3). Las mitocondrias también son un recurso para la formación de redes de DNA.(9)

La NETosis se ha encontrado implicada en diferentes enfermedades como: cáncer, enfermedad arterial y venosa (trombosis),(10) enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide y lupus), preeclampsia, enfermedades inflamatorias crónicas e infarto miocárdico.(11) (12) (13)

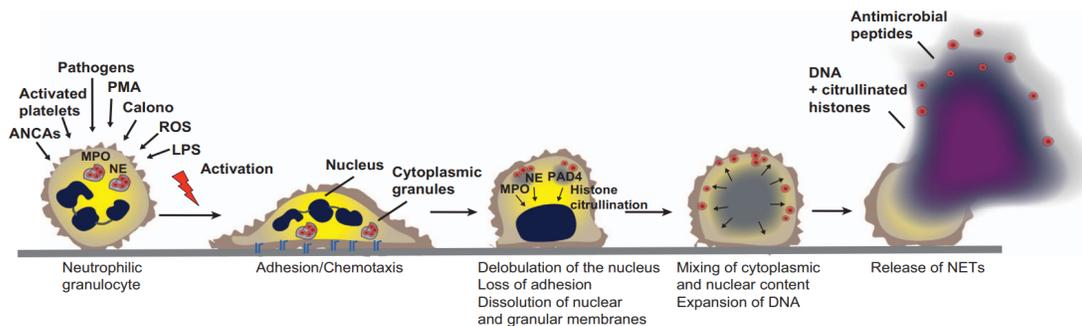


Figura 1. Secuencia de eventos desencadenados mediante la interacción de distintas moléculas, en la formación de NETs (esquema simplificado).

NETosis como promotor de crecimiento y progresión en cáncer

Entre las diferentes poblaciones de células del sistema inmune adaptativo, los neutrófilos han surgido como células importantes en el microambiente tumoral, dada su heterogeneidad y plasticidad.(14) Estos leucocitos, que alguna vez fueron descritos como un indicador de los efectos secundarios de la quimioterapia, y donde la principal prioridad era evitar su agotamiento, ahora se reconocen como capaces de promover la progresión de metástasis en muchos tipos de cáncer.(15)

Los neutrófilos asociados a tumor (TANs), se les ha dividido en dos fenotipos de acuerdo a las funciones que desempeñan en el microambiente tumoral: el N1/ antitumoral/alta densidad/HDN y N2/protumoral/baja densidad/LDN.(16) El fenotipo N1, ha demostrado mantener la capacidad para matar células tumorales, mediante ROS, llevando a las células neoplásicas a la apoptosis; sin embargo, los N2 tienen propiedades inmunosupresoras y de crecimiento tumoral, a través de la producción de sustancias que inhiben la actividad citotóxica de los linfocitos CD8 y NK, y la promoción de la liberación de NETs. (17) (18)

Se ha observado que, en etapas tempranas del desarrollo tumoral, los neutrófilos permanecen localizados predominantemente en la periferia del tumor y tienen un fenotipo N1. Sin embargo, durante la progresión tumoral, los neutrófilos a menudo se encuentran más profundamente dentro del tumor y tienen un fenotipo N2.(19)

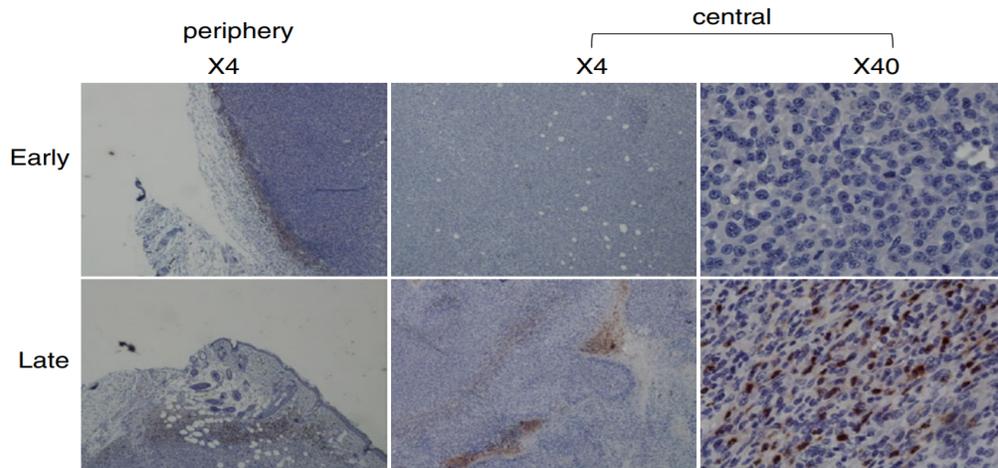


Figura 2. Distribución de Neutrófilos de baja densidad en el microambiente tumoral, (etapas tempranas, distribuidos en la periferia del tumor, etapas avanzadas se observan en el centro del tumor).

Mediante estudios de transcripción genética, se encontró que los N2, tienen un error en la transcripción de la proteína de unión al potenciador CCAAT (C/EBP ϵ específicamente requerida en las etapas de promielocitos y metamielocitos), la cual, es esencial para la adecuada diferenciación de los neutrófilos. Siendo los N2, tipificados mediante su expresión de Ly6G. El Ly6G (Antígeno leucocitario 6 complejo locus G6D) es un antígeno de diferenciación ligado a glicosilfosfatidilinositol (GPI), de 21-25 kD que se expresa en neutrófilos de manera transitoria durante su desarrollo en la médula ósea. La expresión de este antígeno en neutrófilos periféricos se correlaciona directamente con el nivel de diferenciación y maduración de la célula. (15) (20)

Actualmente se sabe que la NETosis se suscita bajo estados inflamatorios (21) (22) (12), así como en cáncer (eg. colon, hígado, riñón, páncreas, pulmón, mama, ovario y estómago), donde las células neoplásicas hipóxicas aumentan significativamente la expresión de mRNA de quimiocinas atrayentes de neutrófilos (CXCL1/KC, CXCL2/MIP2, y CXCL5/ LIX), de interleucina 8 (IL-8), factor de

crecimiento transformante β (TGF β) y factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), ocasionando su migración a mayor velocidad y concentración, sin la posibilidad de una adecuada maduración y funcionalidad del neutrófilo. (23) (24)

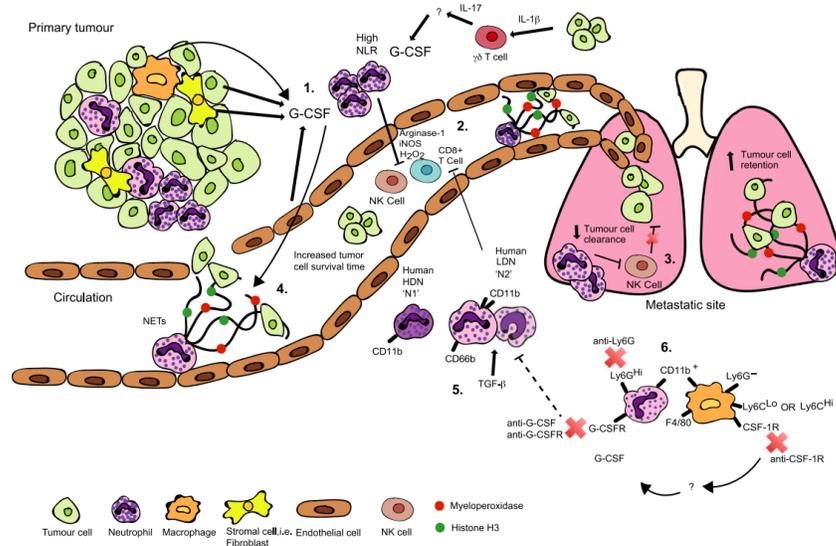


Figura 3. Mecanismo mediante el cual el G-CSF facilita el desarrollo de metástasis vía neutrófilo progresión-tumoral.

Los eventos que se desencadenan a causa de la NETosis en cáncer son:

- 1.- La activación plaquetaria con la consiguiente generación de trombina, la inducción de la migración, invasión y angiogénesis, mediante la activación de moléculas de adhesión proinflamatorias, citocinas y quimiocinas (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, IL-1 β , IL-6 y CXCL1).
- 2.- El crecimiento de células tumorales al mejorar su función mitocondrial (activando transcripción de mitógenos y acelerando la vía MAPK), e inhibiendo la acción de los linfocitos NK y CD8.
- 3.- Promoviendo la formación de metástasis mediante la remodelación de la matriz extracelular y en la transición epitelial-mesenquimal. (20) (25) (26) (23)

NETs como diana terapéutica en el tratamiento de enfermedad metastásica

El papel de las redes tumor-inducidas como promotores potenciales de metástasis y complicaciones asociadas, como trombosis y la inflamación sistémica, sugiere que los enfoques terapéuticos se pueden concentrar en suprimir la NETosis para

evitar el desarrollo de estas complicaciones. Para ello se podrían considerar varias estrategias posibles:

1. El empleo de DNasa I, una enzima para degradar las hebras extracelulares de DNA, sería una opción para disolver las redes ya formadas. La DNasa I ya está en uso clínico para el tratamiento de pacientes con fibrosis quística, lo que indica su seguridad como fármaco.(10) (18) (5)
2. Otra opción sería prevenir la formación de NETosis mediante la inhibición de PAD4, una enzima necesaria para el inicio de la NETosis. Los inhibidores específicos de PAD4, con capacidad para prevenir la formación de redes a partir de neutrófilos humanos y murinos, fueron desarrollados recientemente.
3. Un tercer enfoque alternativo sería el tratamiento con heparina, que funciona para desestabilizar las redes mediante la extracción de histonas. La heparina se ha utilizado durante mucho tiempo en la clínica por su mecanismo de anticoagulación y por lo tanto está bien establecido como método terapéutico, su disponibilidad y bioseguridad lo hacen una opción atractiva. (27)

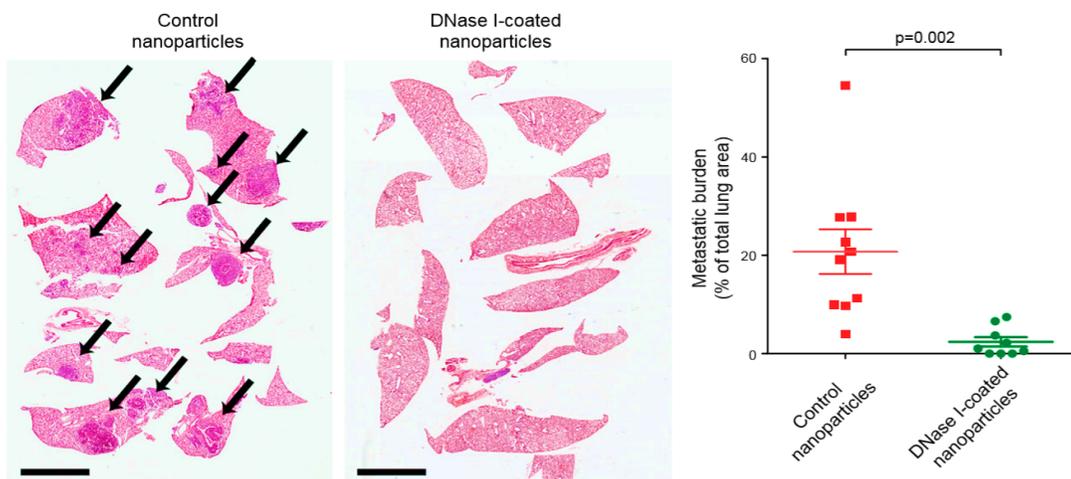


Figura 4. Especímenes de tumores de mama, tratados con DNasa1, observando que posterior a dos semanas de aplicación intravenosa, el tamaño tumoral había reducido 4mm.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia que ocupa el primer lugar en México y todo el mundo en tasas de morbilidad y mortalidad. En nuestro país no existen estudios sobre el papel de los neutrófilos protumorales (Ly6G+) en la diseminación del cáncer de mama. Es por esto, por lo que el presente estudio tiene como finalidad valorar la asociación entre la inmunoexpresión (citoplasmática) de Ly-6G en neutrófilos intratumorales en carcinomas de mama y la presencia de metástasis ganglionares, para así poder definirlo como un factor predictivo de enfermedad metastásica.

Si por medio de esta investigación pudiésemos establecer que la positividad de Ly6G en los neutrófilos dentro del tumor se relaciona con la presencia de metástasis; tendríamos evidencia que pueda apoyar uso de Ly6G como indicador de riesgo de la presencia de metástasis, motive la búsqueda de posibles metástasis ocultas y sustente la utilización de nuevas alternativas terapéuticas complementarias al manejo actual de cáncer de mama metastásico.



HIPÓTESIS

La inmunorreacción citoplasmática de Ly-6G en neutrófilos del carcinoma de mama, se asocia con la presencia de ganglios linfáticos positivos.



OBJETIVOS.

Objetivo General:

- Evaluar la asociación entre la inmunexpresión de Ly-6G en neutrófilos del carcinoma de mama y la presencia de metástasis ganglionares en pacientes con carcinoma de mama.

Objetivo Específico:

- Determinar la inmunexpresión de Ly-6G en neutrófilos en los carcinomas de mama con ganglios linfáticos positivos a metástasis.

Objetivos Secundarios:

- Evaluar la expresión de Ly6G en neutrófilos en el carcinoma de mama con ganglios linfáticos negativos.

SUJETOS Y MÉTODOS.

Diseño del estudio: Es un estudio descriptivo, retrospectivo, observacional.

Lugar de realización: Departamento de Patología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, en San Luis Potosí, San Luis Potosí.

Universo de estudio: Productos de mastectomías con disección ganglionar con reporte histopatológico de carcinoma de mama de pacientes entre 0 y 99 años de edad.

Criterios de selección:

- Criterios de inclusión:
- Todos los casos con diagnóstico histopatológico de carcinoma de mama entre el 1º de enero de 2019 al 31 de diciembre de 2022, que hayan sido obtenidos de mastectomía radical, disponibles en el archivo del Departamento de Anatomía Patológica.

- Criterios de exclusión:
 - Neoplasia benigna de mama, al evaluar el caso.
 - Casos con diagnóstico de neoplasias no epiteliales de la mama (sarcomas y linfomas).
 - Todos los bloques de parafina con diagnóstico de carcinoma de mama obtenidos en especímenes distintos a mastectomía radical.

- Criterios de eliminación:
 - Casos con bloques de parafina con diagnóstico histopatológico de carcinoma de mama, que se encuentren en malas condiciones para efectuar el proceso de inmunohistoquímica.
 - Casos con bloques de parafina con diagnóstico histopatológico de carcinoma de mama, con material insuficiente.

Variabes en el estudio:

- Variables:
 - Inmunoexpresión positiva de Ly6g.
 - Metástasis en ganglio linfático de carcinoma de mama.

Dependiente				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Metástasis en ganglio linfático de carcinoma de mama	Presencia del mismo fenotipo de carcinoma de mama que en el tumor primario en el ganglio linfático	Positivo Negativo	Presencia Ausencia	Categórica
Independiente				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Inmunoexpresión de Ly6g	Inmunoexpresión de Ly6g	Positivo Negativo	Presencia Ausencia	Categórica

Variabes en el estudio.

Tipo de muestreo: Se realizó un muestreo consecutivo a conveniencia recolectando datos del Sistema Estandarizado del Servicio de Anatomía Patológica de la institución, productos de mastectomías con disección ganglionar con criterios vigentes y no depuradas del área de archivo, se obtuvieron un total de 129 productos de mastectomías con disección ganglionar del 01 de enero de 2019 al 31 de diciembre de 2022, de las cuales se eligieron los casos de acuerdo con los criterios de inclusión considerados.

Material y métodos:

1. Se obtuvo la aceptación del Comité de Ética en Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” para la recolección de datos del Sistema Estandarizado del Servicio de Anatomía Patológica de la institución de los productos de mastectomías con disección ganglionar con reporte histopatológico de carcinoma de mama, durante el periodo comprendido del 1ro de enero de 2019 al 31 de diciembre de 2022.
2. Se recabaron los cortes histológicos y bloques de parafina existentes para evaluar la calidad del material y las características de los criterios de eliminación que se pudieran presentar.
3. Se realizó un corte histológico para la realización de la técnica de inmunohistoquímica:

Procedimiento de la realización del anticuerpo de inmunohistoquímica Ly6G, en cortes de tejido embebido en parafina.

Material:

- Bloques con tejido embebido en parafina.
- Anticuerpo de inmunohistoquímica Ly6g (clona 6D17, GeneTex).
- Laminillas electrocargadas (hydrophilic plus slides biosb).
- Xileno.
- Alcohol del 100°, 96° y 80°.
- Agua destilada.
- Buffer de desenmascaramiento (immuno/DNA retriever with citrate, biosb).



- Polímero (Mouse/Rabbit Immunodetector DAB-HRP BioSB).
 - Biotina (biotin link**).
 - Diaminobencidina.
 - Peróxido de hidrógeno.
 - Hematoxilina de Harris.
 - TBS (Tampón fosfato salino).
 - Entellan.
 - Microtomo.
 - Estufa.
 - Olla de presión automatizada (decloacking chamber, biocare).
1. Se realizan cortes de 3-4 micras en laminillas electrocargadas (hydrophilic plus slides biosb) del caso problema y el respectivo tejido control. Se dejan desparafinar toda la noche en estufa a 60°C
 2. Se sacan de la estufa, se dejan enfriar por 5 minutos y se colocan en xileno por 10 minutos, para después llevarlos hasta agua destilada y posteriormente pasando por alcoholes absoluto (100°), alcohol de 96°, y alcohol de 80°, y enjuagar con agua destilada.
 3. Se colocan en buffer de desenmascaramiento (immuno/DNA retriever with citrate, biosb) y se lleva a cabo el procedimiento en olla de presión automatizada (decloacking chamber, biocare).
 4. Se dejan enfriar de 15 a 20 min. Se enjuagan en agua destilada por 5 min. Y posteriormente se colocan en peróxido de hidrogeno al 3% por 15 min.
 5. Se enjuagan nuevamente en agua destilada por 5 min. Y se colocan en buffer tbs.



6. Los cortes se cubren con el anticuerpo (100 ul) y se colocan en cámara húmeda donde se dejan incubando de 30 a 40 min. La dilución del anticuerpo se realiza con tbs siguiendo las indicaciones de dilución*.
7. Se enjuagan abundantemente con tbs
8. Se cubren con anticuerpo secundario marcado con biotina (biotin link**) por 10 min.
9. Se enjuagan abundantemente con tbs
10. Se cubren con polímero (-streptavidina-hrp**) por 10 min.
11. Se enjuagan abundantemente con tbs.
12. Bajo control microscópico se revela la actividad peroxidásica utilizando diaminobencidina. La reacción se detiene colocando los cortes en agua destilada.
13. Se contratiñen con hematoxilina de Harris por 30 segundos.
14. Se enjuagan con agua corriente, después en agua destilada y se deshidratan hasta xileno para cubrirlos con Entellan.

*Ly6g (clona 6D17, GeneTex) dilución 1:200

**Mouse/Rabbit Immunodetector DAB-HRP BioSB

Resultados:

- Coloración café en el citoplasma positivo
- Sin coloración en el citoplasma negativo

* La evaluación de los cortes se realizó por microscopía de luz y los resultados fueron recabados de manera dicotómica, categorizándolo como negativo o positivo.



ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los casos fueron negativos a la inmunoreacción del anticuerpo Ly6G. Por lo que no fue posible realizar un análisis estadístico.

ÉTICA.

Este trabajo de investigación se llevó a cabo de acuerdo al marco jurídico de la Ley General en Salud, que de acuerdo a su Reglamento En Materia De Investigación Para La Salud, Título segundo: De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, artículo 17, clasifica la investigación como categoría I.- Investigación sin riesgo, ya que los pacientes no son involucrados, pues sólo se dispone del material previamente obtenido, anteriormente diagnosticado y que actualmente se encuentra únicamente en estatus de almacenamiento, sin generar una intervención adicional inmediata. A su vez, de acuerdo a la misma ley en el artículo 13 se expresa que toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar sumado a lo expresado en el artículo 16 que establece que en las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice, de acuerdo a ello los datos de los casos se manejan por medio del número institucional previamente asignado, además del carácter de estricta confidencialidad con el que se maneja la información disponible y generada sujeta a los lineamientos de COFEPRIS Y CONBIOÉTICA, por ello mismo, y al ser un estudio retrospectivo, según el artículo 23, no se requiere firma de carta de consentimiento informado por parte del paciente.

El estudio se apegó a los principios éticos para investigaciones médicas en seres humanos establecidos por la Asamblea Médica Mundial en la declaración de Helsinki (1964) y ratificados en Río de Janeiro (2014).

El protocolo se sometió a evaluación y análisis del Comité de Ética e Investigación, para cumplir con las normas antes mencionadas y autorización de las autoridades de la unidad, y durante todo el proceso se siguió de forma estricta

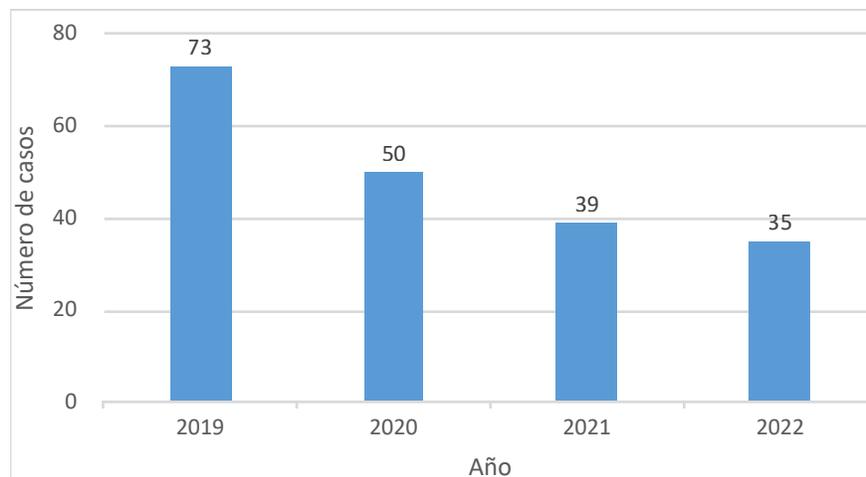
la metodología y buenas prácticas clínicas que marca el manual de bioseguridad del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

RESULTADOS.

Características de la población estudiada.

En la base de datos del Sistema Estandarizado del Servicio de Anatomía Patológica de la institución, se encontraron un total de 204 productos de mastectomías con disección ganglionar del 01 de enero de 2019 al 31 de diciembre de 2022, (Gráfico 1), con una media de 32 mastectomías con disección ganglionar al año, resaltando que en los años 2020-2021 el número de casos fue menor debido a la pandemia de COVID-19.

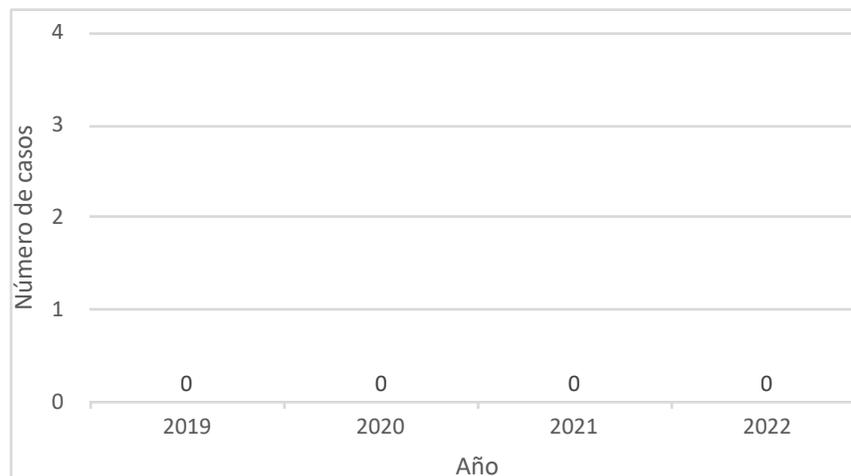
1. *Biopsias de colon del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” del 2019-2022.*



De las 204 mastectomías con disección axilar, 129 muestras cumplieron con criterios de inclusión del estudio. Se excluyeron 75 casos por no cumplir los criterios de inclusión para el estudio y se concluyó el estudio con 129 casos.

Grupo etario	Número de casos
<30 años	4
30-45 años	32
46-65 años	38
>66 años	55

2.- Distribución etaria de los pacientes estudiados.



3.- Resultados de estudio de inmunohistoquímica con el anticuerpo Anti-Ly6G.

DISCUSIÓN.

En nuestro medio aún se cuenta con información limitada acerca de los neutrófilos protumorales/neutrófilos de baja densidad, ya que al tratarse de un nuevo campo de investigación, los investigadores se encuentran en la búsqueda de cuál es el mejor método de identificación de este tipo de neutrófilo.

En los inicios de las investigaciones sobre este tema, su estudio fue mucho más extenuante mediante técnicas de inmunofluorescencia. Desafortunadamente no en todos los hospitales se cuenta con los medios y recursos necesarios para llevar a cabo esta técnica de estudio.

Recientemente se han realizado trabajos en los que se determinan métodos mucho más sensibles y específicos para la identificación de estos neutrófilos, como lo son la Histona 3 citrulinada(28), el extremo N-terminal de la Histona 3(29) y el marcador CD11b(30).

El cáncer de mama seguirá ocupando los primeros lugares en morbi-mortalidad en México y todo el mundo, por este motivo, el estudio para poder ofrecer a las pacientes mejores alternativas terapéuticas o terapias complementarias se vuelve mucho más importante. En los carcinomas de mama la heterogeneidad tumoral ya es bastante complicada, debido a todos los tipos moleculares y variantes histológicas, a lo que se le suma el microambiente tumoral, haciendo aun mas difícil que las pacientes puedan esperar un pronóstico favorable para su enfermedad.

Con respecto a nuestro trabajo, ahora ya hay investigaciones que encuadran la etapa clínica con la presencia de estos neutrofilos que liberan redes extracelulares de ADN.(31) Por esto es necesario continuar estudiando nuevas dianas terapéuticas, con el propósito de erradicar la enfermedad mediante el tratamiento dirigido hacia todos los blancos posibles, cubriendo más ampliamente las células tumorales, su biología y el microambiente que lo rodea.

LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.

Nuestro estudio presentó limitaciones en cuanto a la calidad del anticuerpo empleado (Anti-Ly6G), no se sabe con certeza si se trata de un defecto adquirido durante el tiempo de almacenamiento en la Aduana, ya que estuvo detenido por semanas sin contar con las condiciones de temperatura adecuada para su almacenamiento.

Otra limitación de nuestro estudio es que el infiltrado inflamatorio peritumoral e intratumoral era predominantemente de linfocitos y no de neutrófilos.

Por último es necesario mencionar que durante el transcurso de nuestra investigación se reportaron en la literatura unos nuevos anticuerpos mucho más sensibles y específicos para poder detectar a los neutrófilos que se encuentran en este proceso de muerte celular (NETosis), y esto es mediante el anticuerpo de inmunohistoquímica H3K36ac Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody (RM154), ChIP-Verified.



CONCLUSIONES.

El empleo del anticuerpo de inmunohistoquímica Anti-Ly6G en nuestros casos seleccionados, no fue útil en la identificación de neutrófilos protumorales.

No fue posible establecer la asociación entre la inmunoexpresión Ly6G en neutrófilos intratumorales con la presencia de ganglios linfáticos positivos en pacientes con carcinoma de mama.

La negatividad en todos los casos analizados demuestra que existe la posibilidad de que la calidad del anticuerpo sea deficiente.

Se debe continuar esta línea de estudio ya que los neutrófilos protumorales podrían llegar a ser una diana terapéutica muy importante, para poder crear una terapia complementaria en el tratamiento del cáncer de mama.

BIBLIOGRAFÍA.

Referencias bibliograficas.

1. International Agency for research on cancer. World Health Organization. Cancer today [Internet]. IARC.fr. [Internet]. Disponible en: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=2&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=0&projection=na_tur_a_l-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=hub_latam&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D
2. INdEy G. Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer. Informe. Aguascalientes: Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía; 2015. Report No.
3. DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal A. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* septiembre de 2015;24(10):1495-506.
4. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primer.* 23 de septiembre de 2019;5(1):66.
5. Cedervall J, Zhang Y, Olsson AK. Tumor-Induced NETosis as a Risk Factor for Metastasis and Organ Failure. *Cancer Res.* julio de 2016;76(15):4311-5.
6. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 1 de agosto de 2011;11(8):519-31.
7. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol* [Internet]. 2013;3. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00420>
8. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
9. Neubert E, Meyer D, Rocca F, Günay G, Kwaczala-Tessmann A, Grandke J, et al. Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nat Commun.* 14 de septiembre de 2018;9(1):3767.



10. Erpenbeck L, Schön MP. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene*. 1 de mayo de 2017;36(18):2483-90.
11. BRILL A, FUCHS TA, SAVCHENKO AS, THOMAS GM, MARTINOD K, DE MEYER SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. 2012;10(1):136-44.
12. Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther*. 13 de junio de 2014;16(3):R122.
13. Savchenko AS, Borissoff JI, Martinod K, De Meyer SF, Gallant M, Erpenbeck L, et al. VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood*. enero de 2014;123(1):141-8.
14. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer*. 1 de julio de 2016;16(7):431-46.
15. Mouchemore KA, Anderson RL, Hamilton JA. Neutrophils, G-CSF and their contribution to breast cancer metastasis. *FEBS J*. 2018;285(4):665-79.
16. Andzinski L, Kasnitz N, Stahnke S, Wu CF, Gereke M, von Köckritz-Blickwede M, et al. Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *Int J Cancer*. 2016;138(8):1982-93.
17. Lang S, Bruderek K, Kaspar C, Höing B, Kanaan O, Dominas N, et al. Clinical Relevance and Suppressive Capacity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets. *Clin Cancer Res*. octubre de 2018;24(19):4834-44.
18. Volkov DV, Tetz GV, Rubtsov YP, Stepanov AV, Gabibov AG. Neutrophil Extracellular Traps (NETs): Opportunities for Targeted Therapy. *Acta Naturae*. 2021;13(3):15-23.
19. Shaul ME, Fridlender ZG. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 1 de octubre de 2019;16(10):601-20.
20. Hsu BE, Tabariès S, Johnson RM, Andrzejewski S, Senecal J, Lehuédé C, et al. Immature Low-Density Neutrophils Exhibit Metabolic Flexibility that Facilitates Breast Cancer Liver Metastasis. *Cell Rep*. 2019;27(13):3902-3915.e6.
21. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 1 de junio de 2009;15(6):623-5.

22. Looney MR. Platelets Induce Neutrophil Extracellular Traps in Transfusion-Related Acute Lung Injury. *Blood*. diciembre de 2014;124(21):SCI-18-SCI-18.
23. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell*. 2016;166(3):555-66.
24. Yazdani HO, Roy E, Comerici AJ, van der Windt DJ, Zhang H, Huang H, et al. Neutrophil Extracellular Traps Drive Mitochondrial Homeostasis in Tumors to Augment Growth. *Cancer Res*. noviembre de 2019;79(21):5626-39.
25. Tan Z, Luo X, Xiao L, Tang M, Bode AM, Dong Z, et al. The Role of PGC1 α in Cancer Metabolism and its Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther*. mayo de 2016;15(5):774-82.
26. Masucci MT, Minopoli M, Del Vecchio S, Carriero MV. The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Front Immunol [Internet]*. 2020;11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01749>
27. Swierczak A, Mouchemore KA, Hamilton JA, Anderson RL. Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1 de diciembre de 2015;34(4):735-51.
28. Tilley, D. O., Abuabed, U., Zimny Arndt, U., Schmid, M., Florian, S., Jungblut, P. R., Brinkmann, V., Herzig, A., & Zychlinsky, A. (2022). Histone H3 clipping is a novel signature of human neutrophil extracellular traps. *eLife*, 11, e68283. <https://doi.org/10.7554/eLife.68283>.
29. De Meo, M.L., Shahzad, M.H., Spicer, J.D. (2023). Visualizing NETosis Using a Novel Neutrophil Extracellular Trap-Specific Marker. In: Ursini-Siegel, J. (eds) *The Tumor Microenvironment. Methods in Molecular Biology*, vol 2614. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2914-7_5.
30. Herrera, V. L. M., Bosch, N. A., Lok, J. J., Nguyen, M. Q., Lenae, K. A., deKay, J. T., Ryzhov, S. V., Seder, D. B., Ruiz-Opazo, N., & Walkey, A. J. (2023). Circulating neutrophil extracellular trap (NET)-forming 'rogue' neutrophil subset, immunotype [DEspR + CD11b +], mediate multi-organ failure in COVID-19-an observational study. *Translational medicine communications*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s41231-023-00143-x>.
31. Rivera-Franco, M. M., Leon-Rodríguez, E., Torres-Ruiz, J. J., Gómez-Martín, D., Angles-Cano, E., & de la Luz Sevilla-González, M. (2020). Neutrophil Extracellular Traps Associate with Clinical Stages in Breast Cancer. *Pathology oncology research : POR*, 26(3), 1781–1785. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00763-5>.

ANEXOS.

1.

Ficha técnica del anticuerpo Ly6G.



Datasheet

Ly6g antibody [6D17]

Cat No. GTX53153

Host	Rat
Clonality	Monoclonal
Isotype	IgG2
Application	IHC-P, FACS
Reactivity	Mouse

Package
100 µg

APPLICATION

Application Note

*Optimal dilutions/concentrations should be determined by the researcher.

Suggested dilution	Dilution
IHC-P	1:100 - 1:400
FACS	1:500 - 1:2000

Not tested in other applications.

PROPERTIES

Form	Liquid
Buffer	PBS
Preservative	No preservative
Storage	Store as concentrated solution. Centrifuge briefly prior to opening vial. For short-term storage (1-2 weeks), store at 4°C. For long-term storage, aliquot and store at -20°C or below. Avoid multiple freeze-thaw cycles.
Concentration	400 µg/ml (Please refer to the vial label for the specific concentration.)
Immunogen	Cell lysates of mouse neutrophils
Purification	Protein A/G purified From tissue culture supernatant
Conjugation	Unconjugated
Note	For laboratory use only. Not for any clinical, therapeutic, or diagnostic use in humans or animals. Not for animal or human consumption.

DATA IMAGES



GTX53153 IHC-P Image

IHC-P analysis of kidney and spleen tissue sections from LPS exposed mouse using GTX53153 Ly6g antibody [6D17].