

Detección de linfocitos T citotóxicos contra los epítomos 264-272 y 149-157 de la proteína p53 en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama



Iñaki Álvarez-Busto^a, Andreas Albers^b, María del Carmen Visus^c, José Ignacio Mayordomo^d, Javier Sanz^a, Miguel Ángel Burillo^a, Antonio Güemes^e, María Dolores García-Prats^f, Manuel Moros^g, Albert De Leo^b y Alejandro Tres^d

^aUnidad de Oncología. Hospital San Jorge. Huesca.

^bUniversidad de Pittsburgh. Pennsylvania. Estados Unidos.

^cServicio de Inmunología.

^dServicio de Oncología Médica.

^eServicio de Cirugía A. Hospital Clínico. Zaragoza.

^fServicio de Anatomía Patológica. Hospital San Jorge. Huesca.

^gServicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínico. Zaragoza. España.

FUNDAMENTO Y OBJETIVO: La proteína p53 está sobreexpresada en la mitad de los tumores humanos. Se ha descrito que se produce una respuesta inmunológica específica mediada por linfocitos T citotóxicos dirigidos contra el epítomo 264-272 de p53 en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Demostrar que se produce ese tipo de respuesta en otros tumores podría ser determinante para el desarrollo de vacunas antitumorales específicas anti-p53. El objetivo de este estudio fue demostrar *in vivo* la existencia de linfocitos T citotóxicos específicos anti-p53 en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama.

PACIENTES Y MÉTODO: Se realizó la determinación mediante citometría de flujo del recuento de linfocitos T citotóxicos específicos dirigidos contra los epítomos HLA A2 restringidos 264-272 y 149-147 de la proteína p53 en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama.

RESULTADOS: El percentil 99 de la concentración de células T anti-p53 en los pacientes con HLA A2.1 negativo fue 1/5.634 (punto de corte). En los pacientes con HLA A2 positivo, la mediana de linfocitos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ fue de 1/2.383 y la de linfocitos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ de 1/2.335. Todos los pacientes con HLA A2 positivo presentaron recuentos de linfocitos anti-p53 por encima del punto de corte para al menos uno de los 2 epítomos: 13/14 (93%) para p53₂₆₄₋₂₇₂ y 11/12 (92%) para p53₁₄₉₋₁₅₇.

CONCLUSIONES: Ha sido posible demostrar *in vivo* que hay una respuesta inmunológica específica mediada por linfocitos T citotóxicos anti-p53 en pacientes con cáncer de mama. Son necesarios futuros estudios para confirmar estos resultados y determinar su utilidad para el diseño y el desarrollo de vacunas dirigidas contra la proteína p53.

Palabras clave: Cáncer de mama. p53. Linfocitos T citotóxicos. Vacunas.

Detection of specific T cells for 264-272 and 149-157 peptides of p53 protein in peripheral blood of patients with breast cancer

BACKGROUND AND OBJECTIVE: p53 protein is overexpressed in nearly half of all human tumours. An HLA-A2.1-restricted immunological response mediated by anti-p53 CD8+ T cells directed against the wild type p53 264-272 epitope has been demonstrated in patients with head and neck squamous carcinomas. The existence of such a response in patients with other cancer types could be determinant for the development of specific antitumour vaccines targeting the p53 protein. We aimed to determine the presence of anti-p53 specific CD8+ T cells in peripheral blood of breast cancer patients *in vivo*.

PATIENTS AND METHOD: p53 264-272-specific CD8+ T cells were directly enumerated in the peripheral circulation of patients with breast cancer using tetrameric p53 264-272/HLA-A2.1 complexes by multicolor flow cytometry. The same procedure was used to enumerate T cells specific for another HLA-A2.1 restricted wild type p53 epitope, p53 (149-157).

RESULTS: The 99th percentile of the concentration of anti-p53 cells in 6 HLA A2– breast cancer patients was 1/5634 (cut-off point). The median counts of anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ and anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ lymphocytes in 14 HLA A2.1+ patients were 1/2383 and 1/2335 respectively. All of the HLA A2+ patients had concentrations of anti-p53 lymphocytes above the cut-off point for at least one of the epitopes: 13/14 (93%) for p53₂₆₄₋₂₇₂ and 11/12 (92%) for p53₁₄₉₋₁₅₇.

CONCLUSIONS: A specific immunological response mediated by anti-p53 CD8+ T cells has been detected in patients with breast carcinoma. More studies are needed to confirm these results and to determine its usefulness for the development of p53-based vaccines.

Key words: Breast cancer. p53. T cells. Vaccines.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto de investigación FIS 03/0186.

Correspondencia: Dr. I. Álvarez-Busto.
Unidad de Oncología. Hospital San Jorge.
Avda. Martínez de Velasco, 36. 22004 Huesca. España.
Correo electrónico: INAKI.ALVAREZ@terra.es

Recibido el 28-11-2007; aceptado para su publicación el 26-2-2008.

El gen más frecuentemente mutado en tumores humanos es p53, hasta en el 50% del total de tumores, en su mayoría tipo *missense*¹.

En las células sanas, los valores de la proteína p53 son tan bajos que prácticamente son indetectables. Esto es porque se degrada rápidamente tras su síntesis, por lo que tiene una vida media de menos de 20 min². Como consecuencia, no es procesada ni incorporada a las moléculas clase I del HLA y, por consiguiente, no es presentada al sistema inmunitario³.

Sin embargo, el resultado de una mutación puntual de p53 suele acarrear un cambio de conformación y un incremento en su estabilidad, por lo que se produce una acumulación intracelular de la proteína y la posibilidad de ser detectada por inmunohistoquímica⁴. Del mismo modo, es susceptible de ser procesada y fragmentada en pequeños péptidos de unos 8-10 aminoácidos que podrían ser presentados a través de moléculas HLA clase I a los linfocitos T y generar así una respuesta inmunitaria⁵⁻⁸. Cabe imaginar, por tanto, una doble respuesta inmunitaria celular: una dirigida contra la región mutada (específica del tumor) y la otra contra la región no mutada. La potenciación de esta respuesta inmunitaria sería la base para desarrollar vacunas antitumorales basadas en linfocitos anti-p53 capaces de eliminar clones de células neoplásicas con sobreexpresión de p53^{7,9-11}.

Se ha descrito que hay una respuesta inmunitaria específica mediada por linfocitos T citotóxicos anti-p53 dirigida contra el péptido 264-272 en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Las concentraciones de linfocitos circulantes más elevadas las presentan los pacientes cuyos tumores no sobreexpresan p53, mientras que cuando aparece esta sobreexpresión los valores de linfocitos son prácticamente indetectables y similares a los de donantes sanos¹².

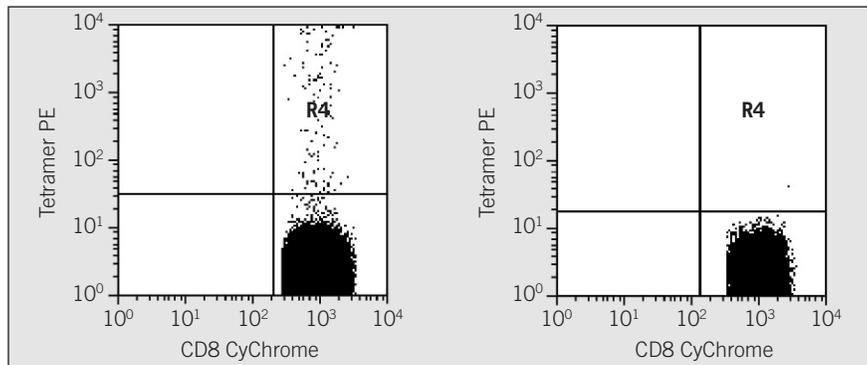


Fig. 1. Frecuencia de tetrámeros de células CD3+, CD8+ y CD14- específicas contra p53₂₆₄₋₂₇₂ detectadas por citometría de flujo en una paciente con HLA A2 positivo (A) y otra con HLA A2 negativo (B) en cuadrante superior derecho.

El presente trabajo pretende verificar si, de forma análoga a lo descrito en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, los pacientes con cáncer de mama tienen una respuesta inmunitaria celular específica anti-p53 mediada por linfocitos T citotóxicos.

Pacientes y método

Pacientes

Los criterios de inclusión fueron: pacientes con cáncer de mama histológicamente demostrado en cualquier estadio, con 18 años de edad o mayores, consentimiento informado, que no tuvieran infección activa o neutropenia ni otro tumor concomitante. 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 cuando se realizó la inclusión de las pacientes.

Inmunoquímica

Para la determinación inmunoquímica del estado de p53 en el tumor se empleó el anticuerpo monoclonal anti-p53, clon DO-7 de Novocastra™ (Benton Lane, Newcastle), el cual reconoce el epítipo 35-45 del extremo aminoterminal de la proteína. Dado que no hay consenso universal para considerar un tumor p53 positivo, se usó como valor de corte el estándar en nuestro centro que, de acuerdo con lo descrito previamente, se consideró cuando más del 10% de las células tumorales mostraban una positividad inequívoca¹³.

Tipificación HLA

Se realizó una extracción de 60 ml de sangre periférica en tubos de ACD (citrato) a cada paciente. Un total de 10 ml se emplearon para la tipificación HLA de clase I mediante la técnica de linfocito-toxicidad.

Obtención y determinación de tetrámeros

Los 50 ml de sangre restantes se emplearon para realizar el análisis de linfocitos T anti-p53. Tras una primera centrifugación de la sangre (1.200 rpm durante 5 min) para separar las células del plasma, éstas son resuspendidas en suero salino y pipeteadas en un tubo contenedor de 50 ml que contiene 25 ml de ficol, Histopaque-1077® (Sigma Diagnostics™). A continuación, se procede a una segunda centrifugación (1.400 rpm durante 20 min), con lo que se obtiene una interfase en la que se encuentran los linfocitos y otras células mononucleadas. Tras pipetearla y resuspenderla en suero fisiológico, se procede a 2 nuevas centrifugaciones consecutivas (7 min a 1.200 rpm) y se retira el sobrenadante. Los linfocitos resultantes (se requiere un mínimo de 5 millones de células viables por paciente) se criopreservan a -80 °C en el 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y el 90% de suero bovino fetal (FBS) hasta su análisis. Tras

descongelar rápidamente en medio de cultivo a 37 °C, los linfocitos anti-p53 se tiñen con anticuerpos anti-CD3, anti-CD8 y anti-CD14, y con tetrámeros de HLA preincubados con péptidos de p53. Finalmente, las células CD3+ CD14- se analizan para CD8 y tetrámeros de HLA mediante un citómetro de 4 colores de inmunofluorescencia y doble láser modelo Coulter-Epics XL® (Beckman Coulter™, Miami, FL, EE.UU.) (fig. 1). Los datos se analizaron mediante un sistema informático (Beckman-Coulter System II software). Se analizó la frecuencia de aparición de linfocitos específicos contra dos epítipos de p53 restringidos a HLA A2.1: el 264-272 y el 149-157. Sus secuencias peptídicas son, respectivamente, STPPPGTRV y LLGRNSFEV.

Análisis estadístico

Se trata de un estudio descriptivo transversal. El resultado de la cuantificación de los linfocitos específicos para los tetrámeros se expresó en frecuencias (número de linfocitos específicos anti-p53 en sangre periférica sobre el total de linfocitos). Sin embargo, durante todo el proceso de análisis estadístico se emplearon las frecuencias recíprocas para facilitarlas. Al tratarse de dos péptidos HLA A2 restringidos, los resultados obtenidos en la población con HLA A2 negativo son inespecíficos por definición. Por este motivo, se emplearon para establecer el punto de corte entre un resultado positivo y uno negativo, que se definió, por convenio, en el percentil 99 de la población con HLA A2 negativo. Como se analizaron 2 péptidos, se eligió el percentil 99 más elevado de las 2 series como punto de corte para ambas.

Para el análisis estadístico, se empleó el programa G-stat, versión 2.0. La variable linfocitos es una variable cuantitativa continua. Para el contraste de hipótesis sobre medias de linfocitos se empleó la prueba de la U de Mann-Whitney. Para estudiar la relación entre las frecuencias de linfocitos específicos para ambos péptidos se calculó el coeficiente de correlación de Spearman.

Resultados

Se incluyó a 19 pacientes, de los que 14 (74%) eran HLA A2+ y 5 (26%) HLA A2-. La mediana de edad fue 72 (intervalo, 44-89) años. Todos los tumores eran carcinomas infiltrantes: 16/19 (84%) ductales, 2/19 (11%) lobulillares y 1/19 (5%) de otros tipos. La distribución por estadios fue la siguiente: I, 1/19; IIA-IIIB, 6/19; IIIA-IIIB, 2/19, y IV, 10/19.

La proteína p53 fue positiva en 4/19 (21%) casos: 3/4 en población HLA A2+ y 1/4 en HLA A2-. Se analizó a 19 pacientes para el tetrámero 264-272 y 15 para el 149-157. Esto fue debido al bajo recuento celular obtenido durante el pro-

cesamiento de alguna de las muestras, lo que impidió realizar ambos análisis a 4 pacientes.

En la tabla 1 se muestran las frecuencias de linfocitos T anti-p53 por paciente según su HLA. El percentil 99 de la población HLA A2- fue de 1/5.634 para el epítipo 264-272 y de 1/5.767 para el epítipo 149-157. Por convenio, se eligió el más alto (1/5.634) como punto de corte para ambos péptidos.

El 71% (10/14) de las pacientes HLA A2+ tenían frecuencias de linfocitos T anti-p53 específicos por encima del punto de corte (resultado positivo) para ambos péptidos. Un caso (1/14) fue positivo únicamente para el epítipo 149-157, mientras que otro más lo fue sólo para el 264-272 (1/14). En los 2/14 restantes, ambos positivos para el péptido 264-272, no se pudo conocer el resultado para el 149-157 por bajo recuento celular. Todos los pacientes con HLA A2 positivo¹⁴ presentaron concentraciones detectables de linfocitos anti-p53 por encima del punto de corte establecido al menos contra uno de los péptidos.

En la tabla 2 se muestran los estadísticos descriptivos para la variable linfocitos T específicos según el HLA del paciente. La frecuencia media de linfocitos T citotóxicos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ en los pacientes con HLA A2 positivo se situó muy por encima del punto de corte y fue significativamente más elevada (1/2.832) que la de los pacientes con HLA A2 negativo (1/15.994) (p = 0,02). Lo mismo ocurrió con los linfocitos T citotóxicos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇: 1/3.044 frente a 1/11.443, respectivamente (p = 0,003).

Correlación entre linfocitos anti-p53 e histopatología

Se investigó la correlación entre la presencia de linfocitos anti-p53 y el estado de p53 en el tumor en los 13 casos de pacientes HLA A2+ en los que se pudo

TABLA 1

Frecuencia de linfocitos T anti-p53 en ambas poblaciones HLA

HLA	LTC anti-p53 ₂₆₄₋₂₇₂	LTC anti-p53 ₁₄₉₋₁₅₇
A2-	1/37.789	BRC
A2-	1/6.726	1/5.767
A2-	1/5.634	1/16.536
A2-	1/6.606	BRC
A2-	1/23.217	1/12.026
A2+	1/1.825	1/1.600
A2+	1/2.262	1/2.212
A2+	1/8.469	1/3.450
A2+	1/2.432	1/2.521
A2+	1/2.116	1/517
A2+	1/2.199	BRC
A2+	1/2.334	BRC
A2+	1/3.222	1/841
A2+	1/4.178	1/2.458
A2+	1/499	1/12.111
A2+	1/232	1/4.888
A2+	1/3.481	1/1.028
A2+	1/3.381	1/2.869
A2+	1/3.081	1/2.044

BRC: bajo recuento celular; LTC: linfocitos T citotóxicos.

TABLA 2

Estadísticos descriptivos de ambas subpoblaciones de linfocitos T anti-p53 según el HLA A2

	HLA	Pacientes (n)	Media	Media geométrica	Mediana	Intervalo
LTC anti-p53 ₂₆₄₋₂₇₂	A2+	14	1/2.832	1/2.170	1/2.383	1/8.469-1/232
	A2-	5	1/15.994	1/11.704	1/6.726	1/37.789-1/5.634
LTC anti-p53 ₁₄₉₋₁₅₇	A2+	12	1/3.044	1/2.183	1/2.335	1/12.111-1/517
	A2-	3	1/11.443	1/10.476	1/12.026	1/16.536-1/5.797

LTC: linfocitos T citotóxicos.

conocer ambos datos (tabla 3). En el paciente HLA A2+ (1/14) restante no se pudo establecer su estado p53 porque la muestra tumoral fue una citología de un derrame pleural.

Para el epítipo 264-272, la mediana de linfocitos en los pacientes p53 negativo fue de 1/2.707, con una media geométrica (menos influida por los valores extremos que por la media) de 1/2.076, mientras que en los pacientes p53 positivo los valores respectivos fueron 1/2.432 y 1/2.478. En esta pequeña muestra de pacientes se observa una aparente tendencia a presentar una frecuencia mayor de linfocitos en aquellos con tumores sin sobreexpresión de la proteína p53, pero las diferencias no son estadísticamente significativas ($p = 1$).

Al analizar lo que ocurre con el péptido 149-157, observamos que las medias geométricas de linfocitos en pacientes con o sin acumulación de p53 fueron, respectivamente, 1/1.606 y 1/2.445. Las medianas fueron 1/1.600 y 1/2.663, respectivamente. En este caso se aprecia una ligera tendencia a presentar una mayor frecuencia de linfocitos anti-p53₁₄₉₋₁₅₇ en los pacientes con proteína p53 detectable por inmunohistoquímica. Sin embargo, las diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas ($p = 0,41$).

Correlación entre linfocitos anti-p53

Se analizó el tipo de relación entre las 2 subpoblaciones de linfocitos anti-p53 estudiadas en los 12 casos HLA A2+ en los que se pudo determinar ambas.

Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman, el cual fue $-0,133$ ($p = 0,68$), lo que indica que no hay relación significativa entre ambas subpoblaciones linfocitarias, si bien el signo negativo apunta a una posible correlación inversa.

Discusión

En estudios precedentes se ha demostrado que es posible generar linfocitos anti-p53 dirigidos contra diversos epítipos HLA A2+ restringidos a partir de linfocitos CD8 obtenidos de donantes sanos e incubados con células dendríticas y el mencionado péptido inmunógeno. Estos

linfocitos son capaces de eliminar in vitro líneas celulares de diversos tumores, incluido el de mama^{5,8,10,11,14}.

También se ha demostrado que linfocitos T citotóxicos específicos sensibilizados in vitro contra un péptido de p53 y adecuadamente estimulados son capaces tanto de eliminar tumores murinos como de proteger contra su desarrollo en ratones sanos^{9,15}.

El estudio pionero sobre determinación de linfocitos anti-p53 in vivo se realizó tanto en donantes sanos como en pacientes afectados de cáncer de cabeza y cuello¹². El péptido analizado fue el 264-272. Al igual que en el presente trabajo, se empleó una pequeña población de donantes con HLA A2 negativo para establecer el punto de corte del límite inferior de detección positivo de tetrámeros de células T en el percentil 99 (1/7.805). Encontraron que los pacientes con HLA A2 positivo con cáncer de cabeza y cuello tenían una frecuencia media de linfocitos CD8 específicos significativamente más alta que los donantes sanos, 1/3.533 frente a 1/5.207 ($p = 0,0041$). Sorprendentemente, la concentración de linfocitos en sangre periférica no se correlacionó con el estado de p53 del tumor, ya que los pacientes que presentaban concentraciones elevadas (a expensas sobre todo de células de memoria) eran aquellos cuyos tumores no acumulaban la proteína. Por el contrario, los pacientes cuyos tumores sobreexpresaban p53 tenían frecuencias de linfocitos muy bajas, equiparables a las de los donantes sanos, además mayoritariamente eran del fenotipo *naive* o preinmunes e incapaces de proliferar ex vivo en presencia del epítipo. Para explicar sus resultados, los autores postulan la hipótesis de la inmunoselección según la cual los linfocitos anti-p53₂₆₄₋₂₇₂ serían capaces de eliminar in vivo las células tumorales que presentan el péptido, que da lugar a la aparición de variantes tumorales con pérdida de éste, inmunorresistentes. Estos hallazgos podrían tener importantes implicaciones para futuras estrategias terapéuticas basadas en p53, puesto que si los linfocitos propios 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 sería posible que la vacunación con linfocitos anti-p53 pudiera crear una presión con efecto inmunoselectivo en el tumor que favorecería el desarrollo de variantes inmunorresistentes.

No se han encontrado estudios previos en la literatura científica que hayan demostrado la existencia in vivo de linfocitos T citotóxicos específicos anti-p53 en pacientes con cáncer de mama.

En el presente trabajo, ha sido posible detectar la presencia in vivo de linfocitos T citotóxicos específicos contra los péptidos 264-272 y 149-157 de la proteína p53 en pacientes con HLA A2 positivo y cáncer de mama mediante la técnica de tetrámeros. Adicionalmente, se ha podido establecer un punto de corte equivalente al percentil 99 de la población con HLA A2 negativo comparable con el descrito previamente por Hoffmann. Las diferencias observadas en las frecuencias entre las 2 subpoblaciones de pacientes con HLA A2 estudiadas demuestran la especificidad del tetrámero por las moléculas HLA y apoyan la fiabilidad de la técnica empleada.

Todas las pacientes con HLA A2 positivo estudiadas han presentado frecuencias de linfocitos T citotóxicos específicos anti-p53 por encima del punto de corte establecido contra al menos uno de los 2 epítipos. Este hecho, de confirmarse en futuros estudios, podría tener una extraordinaria trascendencia clínica a la hora de diseñar inmunoterapias basadas en p53 en pacientes con cáncer de mama, ya que potencialmente podrían beneficiarse, si no todas, al menos las pacientes con HLA A2 positivo.

A diferencia de lo descrito por Hoffmann previamente, en nuestra serie no se ha encontrado una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de ninguna de las 2 subpoblaciones linfocitarias y el estado de p53 en el tumor.

TABLA 3

Estado de p53 en tejido y concentración de linfocitos anti-p53 en cada uno de los pacientes con HLA A2 positivo

Paciente	p53	LTC anti-p53 ₂₆₄₋₂₇₂	LTC anti-p53 ₁₄₉₋₁₄₇
1	+	1/1.825	1/1.600
2	-	1/8.469	1/3.450
3	+	1/2.432	1/2.521
4	-	1/2.116	1/517
5	-	1/2.199	BRC
6	-	1/2.334	BRC
7	-	1/3.222	1/841
8	-	1/4.178	1/2.458
9	-	1/499	1/12.111
10	-	1/232	1/4.888
11	+	1/3.431	1/1.028
12	-	1/3.381	1/2.869
13	-	1/3.081	1/2.044

BRC: bajo recuento celular; LTC: linfocitos T citotóxicos.

Este hecho podría tener varias explicaciones.

En primer lugar, de los 13 pacientes con HLA A2 positivo estudiados en los que además conocemos el estado p53 de su tumor, únicamente en 3 casos fue positivo. Es posible, por tanto, que el tamaño de la muestra no tenga la potencia suficiente para detectar diferencias significativas.

En segundo lugar, habría sido interesante determinar el fenotipo de los linfocitos para identificar los tipo *naive* de los de memoria. Teóricamente y de acuerdo con la teoría de la inmunoselección, existe la posibilidad de que los linfocitos detectados en la población p53- fueran linfocitos de memoria, los cuales habrían eliminado previamente clones enteros de células p53+. De forma análoga, los linfocitos detectados en las pacientes con p53 positivo podrían ser preinmunes e incapaces de proliferar *ex vivo* en respuesta al epítipo, tal como ya se ha demostrado¹⁶.

En tercer lugar, el criterio empleado en nuestra serie para considerar un resultado p53+ por inmunohistoquímica fue cuando más del 10% de las células presentaban una positividad inequívoca, mientras que en el trabajo de Hoffmann se requería una positividad moderada (2+/4) en más del 25% de la muestra. Esta diferencia de criterio podría explicar que algunas pacientes de nuestra serie se hayan clasificado como p53- cuando en el mencionado estudio se habrían clasificado como p53+.

Finalmente, el análisis inmunohistoquímico podría no ser suficiente para la determinación del estado de p53 en un tumor. Además, habría sido muy interesante realizar la secuenciación de p53 en cada neoplasia para conocer cada tipo individual de mutación. Esto se debe a que hay algunos tipos de mutaciones que condicionan una acumulación intracelular de la proteína detectable por inmunohistoquímica, pero que condicionan una incapacidad para ser presentada al sistema inmunitario. Éste sería el caso, por ejemplo, de la mutación R273H, la cual impide el procesamiento por parte del proteosoma de uno de los péptidos estudiados en nuestro trabajo, el 264-272, de tal modo que aunque hubiera una acumulación de la proteína en el citosol, este péptido no podría ser presentado en la membrana. Por tanto, este tipo de tumores p53+ por inmunohistoquímica, desde el punto de vista inmunológico se comportarían realmente como tumores p53- y ello sería relevante a la hora de interpretar los datos obtenidos.

Por otro lado, no se ha observado una correlación significativa entre los linfocitos específicos dirigidos contra los 2 epítopos estudiados, aunque se ha visto una

ligera tendencia a ser inversa. Este hecho, caso de confirmarse, podría ser reflejo de la eficiencia del sistema inmunitario, el cual tendería a desarrollar una única respuesta inmunitaria específica contra una proteína sobreexpresada. Adicionalmente, tampoco hemos observado en nuestra serie diferencias cuantitativas significativas entre las frecuencias medias de las 2 subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos, aunque en otros estudios se haya indicado que el epítipo 149-157 podría ser más inmunógeno que el 264-272¹⁷.

El presente estudio añade nuevas evidencias sobre la importancia de las respuestas inmunitarias contra p53 en los pacientes con cáncer. Un reciente estudio ha demostrado que en algunas pacientes con cáncer de ovario diseminado es posible detectar una respuesta específica del tumor mediada por anticuerpos anti-p53 y que, tras realizar un análisis multivariable, dicha inmunidad predice una mejor supervivencia general¹⁸. Al igual que en nuestro estudio, tampoco se encontró una clara relación entre las respuestas inmunitarias contra la proteína p53 y su estado en el tumor. Sin embargo, cabe señalar aquí que también hay otros trabajos que encuentran una relación entre estos anticuerpos anti-p53 y una peor supervivencia¹⁹⁻²¹, por lo que son necesarios futuros estudios.

En resumen, en este estudio se ha podido demostrar *in vivo* la existencia de linfocitos T anti-p53 en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama. Este trabajo justifica la realización de nuevos estudios de cara a desarrollar una inmunoterapia específica basada en p53 para el tratamiento del cáncer de mama y llegar incluso a la profilaxis de neoplasias empleando vacunas en pacientes de alto riesgo.

Agradecimientos

Dr. Luis Larrad, Dra. Pilar Lasiera, Dra. Elena Filipovich, Dr. Ramón Sousa, Dr. Miguel Ángel Marigil, Dr. Manuel Abascal, Dr. Jesús Vera, Dra. Laura Murillo, Dra. Pilar Astier, Dra. Elena del Valle, Dr. Pedro Murillo, Dra. Carmen Almajano, Dr. Luis Martínez, Dámaris, Igor y personal de enfermería de los hospitales Clínico de Zaragoza y San Jorge de Huesca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. Oren M, Maltzman W, Levine AJ. Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol*. 1981;1:101-10.
3. 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.

4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Noguchi Y, Chen YT, Old LJ. A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:3171-5.
8. Theobald M, Biggs J, Dittmer D, Levine AJ, Sherman LA. Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92: 11993-7.
9. 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.
10. 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 U S A*. 1996;93:14704-7.
11. 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.
12. 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. *Cancer Res*. 2002;62:3521-9.
13. Barbareschi M, Leonardi E, Mauri FA, Serio G, Palma PD. P53 and c-erb-B-2 protein expression in breast carcinomas. An immunohistochemical study including correlations with receptor status, proliferation markers, and clinical stage in human breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 1992;98: 408-18.
14. Chikamatsu K, Nakano K, Storkus WJ, Appella 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;5:1281-8.
15. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus 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.
16. Hoffmann TK, Nakano K, Elder EM, Dworacki G, Finkelstein SD, Appella 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.
17. Albers A, Ferris R, Kim G, Chikamatsu K, DeLeo A, Whiteside T. Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites. *Cancer Immunol Immunother*. 2005; 54:1072-81.
18. Goodell V, Salazar L, Urban N, Drescher C, Gray H, Swensen R, et al. Antibody immunity to the p53 oncogenic protein is a prognostic indicator in ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24:762-8.
19. Al Kassam D, Álvarez C, Blanco I, De los Toyos JR, Llorente JL. [Diagnostic value of E-cadherin, MMP-9, activated MMP-13 and anti-p53 antibodies in squamous cell carcinomas of head and neck]. *Med Clin (Barc)*. 2007;129:761-5.
20. Wollenberg B, Jan NV, Pitzke P, Reiter W, Stieber P. Anti-p53 antibodies in serum of smokers and head and neck cancer patients. *Anticancer Res*. 1997;17:413-8.
21. Soussi T. p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res*. 2000;60:1777-88.