



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

LINFOCITOS T CD8 EXHAUSTOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y  
OBESIDAD

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
MIRIAM VICTORIA MARTÍN MANZO

DIRECTOR DE TESIS  
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR  
DR. JOSELÍN HERNÁNDEZ RUIZ  
FACULTAD DE MEDICINA

DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. MAYO DE 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## RESUMEN

La comorbilidad de cáncer de mama y obesidad es un grave problema de salud pública en nuestro país que apenas empieza a ser estudiado a fondo. En particular el perfil de expresión de receptores inmunomoduladores en linfocitos de sangre periférica en esta condición de comorbilidad ha recibido poca atención. Por tanto, se estudió el perfil fenotípico de las células T CD8 de sangre periférica, el porcentaje de células Treg y Treg TIM3+ presentes en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y resistencia a la insulina; así como la relación entre los linfocitos T CD8 fenotípicamente exhaustos con las células Treg y con los niveles plasmáticos de leptina, adiponectina y ghrelina. Mujeres trabajadoras del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” sin neoplasias y las pacientes con cáncer de mama de la Unidad de Tumores Mamarios del Servicio de Oncología del mismo hospital se organizaron en cuatro grupos: mujeres sin neoplasias/sin resistencia a la insulina, mujeres sin neoplasias/con resistencia a la insulina, mujeres con cáncer de mama/sin resistencia a la insulina y mujeres con cáncer de mama/con resistencia a la insulina. A cada una de las mujeres se les realizaron estudios de biometría hemática, química sanguínea, insulina sérica, hemoglobina glicosilada y perfil hepático en el Laboratorio Central del mismo hospital. Se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica por gradiente de ficoll, las cuales se marcaron con anticuerpos monoclonales con distintos fluorocromos contra CD3, CD8, CD45RA, CCR7, PD1, TIM3, CTLA4, CD69, CD127, CD28, CD4, CD25 y FoxP3. Mediante citometría de flujo se analizó el perfil fenotípico de las células T CD8 y el porcentaje de células Treg y Treg TIM3+. Se midió la concentración de leptina, adiponectina y ghrelina en plasma por ELISA. Las pacientes con cáncer de mama y resistencia a la insulina presentan menos linfocitos T CD8 de EM CD69+CD127+, fenotipo que podría considerarse exhausto, en comparación con las no resistentes a la insulina. Las pacientes con cáncer de mama con o sin resistencia a la insulina presentaron un menor porcentaje de células T CD8 TIM3+, mayor porcentaje de células T CD8 PD1+, T CD8 CD69+, Treg y Treg TIM3+, mayor expresión de CD28 y CD127 en comparación con mujeres sin neoplasias; lo cual sugiere un perfil asociado a células exhaustas. Las pacientes con resistencia a la insulina con o sin cáncer de mama presentaron un menor porcentaje de células T CD8 PD1+, T CD8 CD69+CD127+, menor expresión de CD28 y CD127 en comparación con mujeres sin resistencia a la insulina; lo cual sugiere un perfil asociado a inflamación. Se observaron varias correlaciones entre las células Treg y linfocitos T CD8 sugiriendo que en pacientes con cáncer de mama las células Treg podrían estar asociadas con la generación de células exhaustas. También se observaron correlaciones negativas entre la concentración de insulina con la frecuencia de las células T CD8 PD1+TIM3- y con el porcentaje de células T CD8 CD69+CD127+, sugiriendo que los altos niveles de insulina pueden estar relacionados con un estado de inflamación. Así mismo, se observaron varias correlaciones entre la concentración plasmática de leptina, adiponectina y ghrelina con el perfil fenotípico de las células T CD8 y correlaciones entre la concentración de insulina con la concentración de leptina, adiponectina y ghrelina, sugiriendo que la insulina podría estar asociada con la modulación de la concentración de éstas, afectando indirectamente el perfil fenotípico, al parecer hacia un perfil de inflamación. Finalmente podemos concluir que tanto el cáncer de mama como la resistencia a la insulina, ya sea juntos o por separado, tienen un efecto sobre

los diferentes subconjuntos de células T CD8 que se asocia con un perfil de agotamiento en el caso de cáncer de mama y un perfil de inflamación en el caso de resistencia a la insulina. También encontramos que hay algunas interacciones entre el cáncer de mama y la resistencia a la insulina asociadas al perfil fenotípico de las células T CD8 circulantes.

## ABSTRACT

The comorbidity of breast cancer and obesity is a serious public health problem in our country that is just beginning to be studied in depth. In particular, the expression profile of immunomodulatory receptors in lymphocytes of peripheral blood lymphocytes in this comorbidity condition has received little attention. Therefore, we studied the phenotypic profile of peripheral blood CD8 T cells, the percentage of Treg and Treg TIM3 + cells present in peripheral blood of patients with breast cancer and insulin resistance; as well as the relationship between phenotypically exhausted CD8 T lymphocytes with Treg cells and with the plasma levels of leptin, adiponectin and ghrelin. Women workers of the General Hospital of Mexico "Dr. Eduardo Liceaga "without neoplasms and breast cancer patients from the Breast Tumor Unit of the Oncology Service of the same hospital were organized into four groups: women without neoplasms / without insulin resistance, women without neoplasms / with insulin resistance, women with breast cancer / without insulin resistance and women with breast cancer / with insulin resistance. Each of the women underwent studies of blood count, blood chemistry, serum insulin, glycosylated hemoglobin and liver profile in the Central Laboratory of the same hospital. The peripheral blood mononuclear cells were obtained by ficoll gradient, which were labeled with monoclonal antibodies with different fluorochromes against CD3, CD8, CD45RA, CCR7, PD1, TIM3, CTLA4, CD69, CD127, CD28, CD4, CD25 and FoxP3. The phenotypic profile of CD8 T cells and the percentage of Treg and TIM3 + Treg cells were analyzed by flow cytometry. The concentration of leptin, adiponectin and ghrelin in plasma was measured by ELISA. Patients with breast cancer/ with insulin resistance have fewer CD69+CD127+ EM CD8 T lymphocytes, a phenotype that could be considered exhausted, compared to breast cancer/without insulin resistance. Patients with breast cancer with or without insulin resistance had a lower percentage of TIM3+ CD8 T cells, higher percentage of PD1+ CD8 T cells, CD69 CD8 T cells, Treg and TIM3+ Treg cells, higher expression of CD28 and CD127 compared with women without neoplasms; which suggests a profile associated with exhausted cells. Patients with insulin resistance with or without breast cancer had a lower percentage of PD1+ CD8 T cells, CD69+CD127+ CD8 T cells, lower expression of CD28 and CD127 compared to women without insulin resistance; which suggests a profile associated with inflammation. Several correlations were observed between Treg cells and CD8 T lymphocytes, suggesting that Treg cells could be associated with the generation of exhausted cells in patients with breast cancer. Negative correlations were also observed between the concentration of insulin with the frequency of PD1+TIM3- CD8 T cells and with the percentage of CD69 + CD127 + CD8 T cells, suggesting that high insulin levels may be related to a state of inflammation. Likewise, several correlations were observed between the plasma concentration of leptin, adiponectin and ghrelin with the phenotypic profile of CD8 T cells and correlations between the concentration of insulin with the concentration of leptin, adiponectin and ghrelin, suggesting that insulin could be associated with the modulation of the concentration of these, indirectly affecting the phenotypic profile, apparently towards a profile of inflammation. Finally, we can conclude that both breast cancer and insulin resistance, either together or separately, have an effect on the different subsets of CD8 T cells that is associated with an exhausted profile in the case of breast cancer and a profile of inflammation in the case of insulin resistance.

We also found that there are some interactions between breast cancer and insulin resistance associated with the phenotypic profile of circulating CD8 T cells.

## AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar este trabajo y por el apoyo recibido.

Al CONACYT por apoyarme económicamente con la beca número 243633 y darme la oportunidad de realizar este trabajo.

Al Servicio de Oncología, Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga por las facilidades otorgadas para desarrollar el proyecto.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa: por ser un gran profesional y excelente persona, compartirme su conocimiento y experiencia, brindarme su confianza y por apoyarme en momentos difíciles.

Al Dr. Joselín Hernández y Dr. Julio Carrero: por su orientación y apoyo durante el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Concepción Agundis: por su apoyo, ayuda y amistad en todo momento.

A los estudiantes y personal del HIPAM que me brindaron su amistad sincera y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A mi esposo Abel: por sus constantes muestras de cariño y amor y su apoyo incondicional que me han hecho muy feliz.

A mi futura hija Naomi Carolina: por alegrar mi vida con su existencia.

A mis padres y hermana: porque gracias a su apoyo, esfuerzo y cariño he podido soñar y cumplir mis sueños, he aprendido que nada es imposible y que la felicidad existe.

A mi mamá por escuchar, poner atención y tratar de comprender sobre PD1 y TIM3 a pesar de los problemas.

A mi papá porque a pesar de su enfermedad no se ha dejado derrotar, mostrando fortaleza.

A mi hermana porque sé que siempre podré contar contigo.

A mi abuela: por tu amor incondicional.

A las pacientes y controles que aceptaron participar en el proyecto: por contribuir desinteresadamente con esta investigación.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	I
ABSTRACT .....	III
AGRADECIMIENTOS .....	V
ÍNDICE.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE TABLAS.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. ANTECEDENTES .....	5
1.1    Cáncer de mama.....	5
1.1.1. Epidemiología .....	5
1.1.2. Factores pronósticos en el cáncer de mama.....	5
1.2. Obesidad.....	6
1.3. Resistencia a la insulina (IR).....	7
1.3.1. Resistencia a la insulina en obesos .....	7
1.3.2. Resistencia a la insulina en no obesos.....	9
1.3.3. Efectos de la Resistencia a la Insulina .....	10
1.3.4. Resistencia a la insulina y linfocitos T .....	10
1.4. Leptina, adiponectina y ghrelina .....	12
1.4.1. Efectos de la leptina, adiponectina y ghrelina en las células T.....	16
1.4.2. Relaciones entre la leptina, adiponectina, ghrelina y cáncer de mama .....	20
1.5. Sistema Inmune y Cáncer .....	21
1.5.1. Inmunovigilancia.....	21
1.5.2. Inmunoección .....	21
1.6. Linfocitos T CD8 exhaustos.....	23
1.6.1. PD1, CTLA4, TIM3, CD69 y CD127 .....	27
1.7.    Linfocitos Treg.....	41
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	43
3. HIPÓTESIS .....	43
4. OBJETIVOS .....	43
4.1. Objetivo general .....	43
4.2.    Objetivos específicos .....	43



<b>5. RELEVANCIA E IMPACTO .....</b>	<b>44</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
<b>6.1. Población de estudio.....</b>	<b>44</b>
<b>6.2. Toma y procesamiento de muestras.....</b>	<b>47</b>
<b>6.3. Determinación del perfil fenotípico de los linfocitos T CD8.....</b>	<b>47</b>
<b>6.4. Determinación de adipocitocinas y ghrelina en plasma .....</b>	<b>50</b>
<b>6.5. Estudios de laboratorio.....</b>	<b>52</b>
<b>6.6. Análisis estadísticos .....</b>	<b>52</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>7.1. Composición y características de los subconjuntos de las células T CD8 en pacientes con cáncer de mama y resistencia a la insulina .....</b>	<b>53</b>
<b>7.2. Interacciones entre el cáncer de mama y la resistencia a la insulina en el perfil fenotípico de los diferentes subconjuntos de células T CD8.....</b>	<b>54</b>
<b>7.3. Perfil fenotípico en los diferentes subconjuntos de células T CD8 en pacientes con cáncer de mama y resistencia a la insulina .....</b>	<b>56</b>
<b>7.4. Asociaciones entre la concentración de insulina y HOMA con el perfil fenotípico de células T CD8.....</b>	<b>64</b>
<b>7.6. Porcentaje y perfil fenotípico de las células Treg en pacientes con cáncer de mama y resistencia a la insulina .....</b>	<b>66</b>
<b>7.7. Asociaciones entre las Treg y Treg PD1-TIM3+ con el perfil fenotípico de células T CD8.....</b>	<b>67</b>
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>69</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>78</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE FIGURAS

Fig.1. Identificación de subconjuntos y subpoblaciones de linfocitos T CD8 por citometría de flujo.....	49
Fig. 2. Composición de los subconjuntos de las células T CD8 en la población estudiada....	54
Fig. 3. Interacción entre cáncer de mama y resistencia a la insulina para la expresión de TIM3 en células T Naïve.....	55
Fig. 4. Interacción entre cáncer de mama y resistencia a la insulina en la frecuencia de las células T CD8 CD69+CD127+ de EM.....	56
Fig. 5. Frecuencia de las células T CD8 PD1-TIM3 + en mujeres sin neoplasia (Neo-) y pacientes con cáncer de mama (BrCA).....	57
Fig. 6. Frecuencia de las células T CD8 PD1 + TIM3-.....	58
Fig. 7. Intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD28 en células T CD8 en mujeres sin neoplasia (Neo-) y pacientes con cáncer de mama (BrCA).....	59
Fig. 8. Intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD28 en células T CD8 de mujeres sin resistencia a la insulina (Non-IR) y con resistencia a la insulina (IR).....	60
Fig.9. Frecuencia de las células T CD8 CD69+CD127-, CD69+CD127+, CD69-CD127- en mujeres sin neoplasias (Neo-) y pacientes con cáncer de mama (BrCA).....	61
Fig.10. Frecuencia de las células T CD8 CD69+CD127+, CD69-CD127- de CM en mujeres sin resistencia a la insulina (Non-IR) y con resistencia a la insulina (IR).....	62
Fig. 11. Intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD127 en células T CD8.....	63
Fig. 12. Correlaciones entre Insulina, HOMA y los subconjuntos EM y TEMRA de células T CD8 PD1 + TIM3-.....	65
Fig. 13. Correlación entre Insulina, HOMA y las células T CD8 CD69+CD127+ de CM...65	
Fig.14. Frecuencia de las células Treg, PD1-TIM3+ y PD1-TIM3- en células Treg.....	67

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relaciones clínico patológicas y efectos en la biología del cáncer de mama de la leptina, adiponectina y ghrelina.....	20
Tabla 2. Características generales de las mujeres y el tumor.....	46
Tabla 3. Diseño de paneles multiparamétricos.....	48
Tabla 4. Correlaciones entre adiponectina, ghrelina, leptina y el perfil fenotípico de células T CD8.....	66
Tabla 5. Correlaciones entre Treg y el perfil fenotípico de células T CD8.....	68

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en las mujeres y es la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres en el mundo. La obesidad ha sido descrita como un factor pronóstico independiente asociado con un mayor riesgo de recurrencia de cáncer de mama, un mayor riesgo de desarrollar metástasis a distancia y un periodo de supervivencia global más corto. Además, se ha observado que en pacientes con cáncer de mama el sobrepeso y/o la obesidad son factores adversos para la supervivencia.

Las observaciones clínicas muestran que las personas sin o con obesidad pueden presentar un perfil metabólico sano o patológico, pudiendo clasificarse en personas:

- no obesas y sanas
- no obesas y enfermas (también conocidas como personas metabólicamente obesas)
- obesas y enfermas y
- obesas y sanas (también conocidas como personas obesas metabólicamente sanas o sensibles a la insulina).

La resistencia a la insulina distingue a los metabólicamente enfermos de los metabólicamente sanos y los estudios de asociación sugieren que la resistencia a la insulina favorece el desarrollo del cáncer de mama.

Varias investigaciones (Nieman, 1999; Yang *et al.*, 2009; Karlsson *et al.*, 2010; Sheridan, 2012; Paich, 2013) sugieren que la obesidad y el sobrepeso pueden alterar diversas etapas de la respuesta inmune adaptativa, afectando la activación, proliferación, frecuencia y función de los linfocitos T CD8, que se consideran como los principales mediadores de la respuesta inmune adaptativa contra el cáncer. Es importante tener en consideración que en estos estudios no se menciona si los sujetos de estudio con obesidad presentan resistencia a la insulina u otras alteraciones asociadas al síndrome metabólico. Los efectos de la resistencia a la insulina en la inmunidad permanecen relativamente inexplorados y poco se sabe acerca de cómo la insulina afecta al sistema inmunológico. Se cree que la resistencia a la insulina podría influir en la proliferación, función y diferenciación de las poblaciones de células T. Así mismo, se ha propuesto que la leptina, adiponectina y ghrelina son moléculas clave que relacionan la resistencia a la insulina con el cáncer de mama, ya que afectan a las células T e influyen en el progreso del tumor (Vona-Davis *et al.*, 2007; Paz-Filho *et al.*, 2011; Wilk *et al.*, 2011; Baatar *et al.*, 2011; Carbone *et al.*, 2012; Grönberg *et al.*, 2012; Giovanni *et al.*, 2013; Procaccini *et al.*, 2013).

El sistema inmune es un componente importante en la vigilancia, el desarrollo y la progresión del cáncer (Mittal *et al.*, 2014). Las interacciones que se dan entre el sistema inmune del paciente y el tumor se conocen con el término de inmunovigilancia. A pesar de la inmunovigilancia continua, los tumores se presentan incluso en presencia de un sistema inmune intacto, en parte, debido a los mecanismos de escape desarrollados por el tumor dentro de los cuales se encuentran las células T CD8 exhaustas y las células Treg (Töpffer *et al.*, 2011; Schriber *et al.*, 2011; Whiteside, 2010)

Las células T CD8 exhaustas o agotadas se caracterizan por la pérdida progresiva y jerárquica de sus funciones efectoras y presentan niveles altos de CD69 (*Antígeno temprano de activación de linfocitos T: P60*) y de receptores inmunomoduladores con efecto inhibitorio como PD-1 (*Programed Death 1*), TIM-3 (*T-cell immunoglobulin mucin 3*), CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*); y niveles bajos de CD127 (*subunidad alfa del receptor de la interleucina 7*) (Yi *et al.*, 2010; Wherry, 2011; Wherry *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2015).

Los Tregs son un pequeño subconjunto de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/Foxp3<sup>+</sup> que suprimen funciones de las células T (Najafi *et al.*, 2018). Recientemente, se ha identificado una población de Treg altamente supresoras caracterizadas por la expresión de TIM-3 (Sakuisi *et al.*, 2013).

Los linfocitos T CD8 exhaustos y los Treg se han encontrado en los tumores y sangre periférica de pacientes con cáncer de mama asociándolos con un peor pronóstico (Norde *et al.*, 2012; Muentz *et al.*, 2013; Ghebeh *et al.*, 2006; Poschke *et al.*, 2012; Whiteside, 2012).

No obstante, lo anterior, se desconoce la frecuencia de linfocitos T CD8 exhaustos y Tregs altamente supresoras en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y resistencia a la insulina. Tampoco se conoce la relación de los linfocitos T CD8 exhaustos con las células Treg altamente supresoras y su relación con los niveles plasmáticos de leptina, adiponectina o ghrelina. Por lo que en este trabajo se estudia el perfil fenotípico de las células T CD8 (CD69<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>, TIM-3<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup>, y CD127<sup>low</sup>) el porcentaje de células Treg y Treg TIM3<sup>+</sup> presentes en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y resistencia a la insulina. Además, se analiza la relación entre los linfocitos T CD8 fenotípicamente exhaustos con las células Treg y con las concentraciones plasmáticas de leptina, adiponectina y ghrelina.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 Cáncer de mama**

#### **1.1.1. Epidemiología**

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en las mujeres, que afecta a 2,1 millones de mujeres cada año y es la principal causa de muerte relacionada con el cáncer entre las mujeres del mundo. En el 2018, se estimó que 627,000 mujeres murieron de cáncer de mama (WHO, 2019).

En México tan sólo en el 2016 se detectaron 23 mil nuevos casos de cáncer de mama (Olguín M, 2017). En el 2013, el cáncer de mama fue la principal causa de morbilidad hospitalaria entre los tumores malignos para la población mexicana de 20 años y más (18.7%), observándose las tasas más altas de morbilidad hospitalaria en mujeres de 60 a 64 años de edad, seguidas por las mujeres de 65 a 74 años de edad y las de 50 a 59 años. Así mismo, en el año 2013, el cáncer de mama fue la cuarta causa de mortalidad por tumores malignos (7.7%), en la población mexicana femenina y masculina de 20 años y más y la segunda causa de mortalidad en las mujeres de 20 años y más (14.8%), observándose que las mujeres de 80 y más años presentan la tasa más alta de mortalidad (INEGI, 2015).

#### **1.1.2. Factores pronósticos en el cáncer de mama**

Algunas características objetivas del tumor y del paciente son factores pronósticos de la progresión del tumor. Un factor pronóstico es capaz de proporcionar información sobre el desenlace clínico del paciente en el momento del diagnóstico, independientemente de la terapia y se puede usar para ayudar a refinar las opciones de tratamiento. Dichos factores generalmente son indicadores de crecimiento, invasión y potencial metastásico. Los factores pronósticos influyen en el resultado de la enfermedad y no se ven afectados por el tratamiento.

Se han identificado varios factores clínicos y patológicos que pueden predecir el resultado a largo plazo en pacientes con cáncer de mama. Los factores pronósticos generalmente aceptados incluyen: edad, tamaño del tumor, estado de invasión tumoral de los ganglios linfáticos, tipo y grado histológico del tumor, índice mitótico, expresión de receptores hormonales (ER y PR) y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). También se han estudiado otros factores que proporcionan información sobre el comportamiento agresivo de los tumores dentro de los cuales se encuentra la obesidad (Bland KI *et al.*, 2018).

La obesidad ha sido descrita como un factor pronóstico independiente asociado con un mayor riesgo de recurrencia, un mayor riesgo de desarrollar metástasis a distancia y un periodo de supervivencia global más corto con un incremento del 33% en su tasa de mortalidad (HR:1.33 95% CI:1.19,1.50) en comparación con las pacientes no obesas (Protani *et al.*, 2010; Ewertz *et al.*, 2011; Sparano *et al.*, 2012; Arce-Salinas *et al.*, 2014). Se ha observado que las mujeres

jóvenes en el cuartil más alto de IMC presentan menor sobrevida a 5 años del diagnóstico primario, desarrollan tumores con mayor grado histológico, mayor fracción de células en fase S, una cuenta mitótica elevada y se asocian a tumores de mayor tamaño comparado con aquellas en los cuartiles más bajos (Daling *et al.*, 2001). Además, se ha encontrado que existe una relación continua entre el aumento del índice de masa corporal (IMC) y un peor pronóstico, lo que indica que el peso excesivo también puede contribuir con la recurrencia no solo en pacientes obesas sino también en pacientes con sobrepeso (Sparano *et al.*, 2012). Así mismo se ha demostrado que el IMC es un factor pronóstico independiente para la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama (Berclaz *et al.*, 2004). En un estudio realizado con pacientes con cáncer de mama localmente avanzado del Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México encontraron que el sobrepeso y/o la obesidad son un factor adverso para la supervivencia con un riesgo relativo de 1.79 (95 % CI, 1.09–2.97) comparado con aquellas mujeres con peso normal (Arce-Salinas *et al.*, 2014).

En México la obesidad y el sobrepeso son factores de riesgo muy importantes, ya que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en mujeres  $\geq 20$  años es del 75.6%, de las cuales 38.6 son obesas (ENSANUT MC, 2016). Mientras que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado es del 74% (Arce-Salinas *et al.*, 2014).

## 1.2. Obesidad

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud.

El IMC es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros. En el caso de los adultos, la OMS define el sobrepeso como un IMC igual o superior a 25 kg/m<sup>2</sup> y la obesidad como un IMC igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup> y el intervalo intermedio define la condición de sobrepeso. El IMC proporciona una medida práctica del sobrepeso y obesidad en la población, pues es la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades. Sin embargo, hay que considerarlo como un índice aproximado porque puede no siempre corresponder al mismo porcentaje de grasa corporal en diferentes individuos (WHO, 2018).

Las observaciones clínicas muestran que las personas de peso normal u obesas pueden presentar un perfil metabólico sano o patológico. De acuerdo con el IMC y el perfil metabólico, los individuos pueden clasificarse en los siguientes fenotipos: no obesos y sanos, no obesos y enfermos (también conocido como metabólicamente obeso) obeso y enfermo y obeso y sano (también conocido como obeso metabólicamente sano o sensible a la insulina). Algunas de las principales características que distinguen a los fenotipos metabólicamente sanos o enfermos son el aumento del VAI, la deposición de grasa ectópica y la resistencia a la insulina (IR) en el fenotipo metabólicamente enfermo, los cuales les confieren mayor riesgo de comorbilidades metabólicas y no metabólicas (cáncer) que sus contrapartes metabólicamente sanas. De hecho, algunos autores piensan que la IR (IR) es la característica con mayor influencia en la asociación entre la obesidad y las enfermedades metabólicas y no

metabólicas (Castro *et al.*, 2014). Es más, evidencia epidemiológica reciente, señala una relación entre la IR y el cáncer de mama, algunos estudios han mostrado que la IR es un factor de riesgo en pacientes con cáncer de mama (Sun W *et al.*, 2016; Gunter *et al.*, 2015; Garmendia *et al.*, 2007) y puede ser usado como un factor pronóstico para estos pacientes, pues la IR se asocia con factores pronóstico negativos como tumores más grandes y una proliferación elevada (Nam *et al.*, 2016). Igualmente, la IR contribuye al desarrollo del cáncer de mama en mujeres obesas (Engin, 2017; Nam *et al.*, 2016). Además, la hiperinsulinemia que es tanto una consecuencia como una desencadenante de la IR, está asociada con un aumento del 35% del riesgo de muerte por cáncer de mama (Irwin *et al.*, 2011). Así mismo, la prevalencia del cáncer de mama en mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas es mayor en aquellas con IR que en aquellas sin resistencia (0.45 vs 0.28% en las premenopáusicas y 0.86 vs 0.63 en las postmenopáusicas) (Sun *et al.*, 2016).

### **1.3. Resistencia a la insulina (IR)**

La IR; es un fenómeno en el cual la insulina no es capaz de ejercer sus efectos biológicos en concentraciones plasmáticas que resultan efectivas en sujetos normales. El mecanismo molecular de este efecto se produce por alteraciones en la vía de la señalización de la insulina (Morales-González, 2010).

#### **1.3.1. Resistencia a la insulina en obesos**

Los mecanismos implicados en la etiopatogenia de la IR relacionada con la obesidad abarcan los defectos pre-receptor, receptor y pos-receptor caracterizados, por ejemplo: i) acceso disminuido de insulina al músculo, secundario a un exceso de ácidos grasos libres (pre-receptor), ii) regulación negativa del receptor de insulina secundaria a hiperinsulinemia (receptor), iii) inhibición de las cascadas intracelulares por varios factores relacionados con la adiposidad, como ácidos grasos libres incrementados, adipocinas y / o secreción de citocinas (pos-receptor) (Castro *et al.*, 2014).

El aumento en la ingesta de azúcares y grasas, principalmente de glucosa, aumenta la secreción de insulina (Fu *et al.*, 2013), lo que favorece la expresión del factor transcripcional SREBP1c (proteína de unión del elemento sensible al estero1 1c), producto del gen maestro que promueve la transcripción de enzimas lipogénicas y por lo tanto favorece un aumento en la producción de triacilglicéridos a partir del excedente de glucosa y otros carbohidratos de la dieta (Morales-González, 2010).

El exceso de triacilglicéridos se almacena en el tejido adiposo, causando inicialmente la hipertrofia de adipocitos y en condiciones crónicas su disfunción. A estos cambios se asocia un incremento en la secreción de adipocitocinas como leptina, IL-6, IL-8, MCP-1, G-CSF; disminución de la producción de adipocitocinas como adiponectina e IL-10 (Bays *et al.*, 2008; Skurk *et al.*, 2007), migración de linfocitos y de macrófagos que secretan citocinas como TNF, IL-1 $\beta$ , e IL-6 (Cinkajzlová *et al.*, 2017), producción de hipoxia e incremento de la concentración de ácidos grasos libres en sangre (Morales-González, 2010). Cuando el



aporte crónico y continuo de energía sobrepasa la capacidad de expansión de los adipocitos, estos no pueden almacenar más triglicéridos, por lo que el exceso de triglicéridos se deposita en otros órganos como el hígado, músculo, corazón, islotes pancreáticos dañando el funcionamiento de estas células y contribuyen con la IR (Morales-González, 2010). Por lo tanto, los niveles de insulina y de ácidos grasos libres aumentan con el depósito de grasa y estos factores suprimen la secreción de ghrelina (Iwakura *et al.* 2015).

Los niveles de insulina en sangre son el resultado de un equilibrio entre la producción de insulina por el páncreas y su eliminación principalmente por el hígado. El aclaramiento de insulina ocurre por su absorción y degradación. En el hígado, la absorción de insulina esta principalmente mediada por receptores. Tanto la absorción como la degradación están reguladas por muchos factores, incluido un aumento de ácidos grasos libres que inhibe esos procesos (Castro *et al.*, 2014).

Los estados hiperinsulinémicos promueven la disminución de los receptores de insulina, lo que conduce a una disminución de la eliminación de ésta de la circulación. La hiperinsulinemia también promueve la IR debido a un ciclo de retroalimentación negativa que inhibe los sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1/2) (Castro *et al.*, 2014).

Diferentes estudios sustentan que un aumento en la concentración de ácidos grasos en plasma da como resultado un aumento de las concentraciones de acil-CoA intracelular y diacilglicerol, los cuales activan a la proteína cinasa C (PKC-0), lo que a su vez conduce al aumento de fosforilación de serinas del IRS-1. Esta fosforilación es dominante sobre la fosforilación en residuos de tirosina de IRS-1 y afectan la estabilidad del complejo receptor de insulina (INSR)-IRS-1. Estos cambios a su vez resultan en una disminución de la fosforilación de residuos de tirosina del IRS-1 y una activación disminuida de PI3-cinasa (PI3K) asociada a IRS-1. Esta disminución en el estado de fosforilación da como resultado una menor actividad de transporte de glucosa estimulada por insulina (Morales-González, 2010; Yu *et al.* 2002). Igualmente, el incremento de acil-CoA de cadena larga, favorece la producción de derivados como las ceramidas que interfieren con las acciones de la insulina a través de la acción de la cinasa Akt (Morales-González, 2010).

Así mismo, TNF- $\alpha$  causa IR al aumentar la lipólisis de los adipocitos estimulando la vía JNK e IKK $\beta$  / NF- $\kappa$ B que puede aumentar la fosforilación en residuos de serina / treonina del IRS-1 disminuyendo la estabilidad del complejo trimérico INSR-IRS-PI3K. Mientras que la IL-6 reduce la expresión de GLUT4 y del IRS-1 al activar la vía de señalización JAK-STAT y al aumentar la expresión de SOCS3. Además, la IL-6 también puede conducir a la IR en el músculo esquelético al inducir la expresión del gen TLR-4 mediante la activación de STAT3. Se sugiere que TLR4 es una molécula importante en la activación de NF- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2015). Por otro lado, la IL-1 $\beta$  reduce la expresión de IRS-1 (Jager *et al.*, 2007).

La adiponectina ejerce un potente efecto sensibilizante a la insulina, ya que reduce la glucogénesis y la lipogénesis, inhibe la lipólisis e incrementa la captación de glucosa (Yadave *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015). Además, la adiponectina, en el hígado, aumenta la sensibilidad a la insulina promoviendo la fosforilación del receptor de insulina y del IRS-1. En el páncreas, la adiponectina actúa sobre la proliferación celular estimulando la secreción

de insulina (Nigro *et al.*, 2014). Por el contrario, la leptina mejora la sensibilidad periférica a la insulina (hígado y músculo esquelético) y modula la función de las células  $\beta$  pancreáticas inhibiendo la secreción de insulina. La atenuación de la sensibilidad a la leptina en el cerebro que a menudo se observa en individuos obesos, conduce a una acumulación excesiva de triglicéridos en el tejido adiposo, así como en los músculos, el hígado y el páncreas, lo que daña la sensibilidad y la secreción de la insulina (Rabe *et al.*, 2008). Además, la leptina se correlaciona positivamente con la IR, independientemente del peso corporal o la adiposidad, tanto en pacientes normo glicémicos como diabéticos (Paz-Filho *et al.*, 2012). Por otro lado, los bajos niveles de ghrelina se asocian de forma independiente con la IR (Pöykkö *et al.*, 2003) y se sabe que la ghrelina inhibe la secreción de insulina (Chanbot *et al.*, 2014).

### **1.3.2. Resistencia a la insulina en no obesos**

La IR también se presenta en individuos con peso normal (IMC<25), y los mecanismos que contribuyen al deterioro de la señalización de la insulina en ausencia de obesidad están mucho menos caracterizados. Existen estudios que muestran que la desregulación del tejido adiposo no requiere obesidad per se, sino células adiposas hipertróficas disfuncionales (Hammarstedt *et al.*, 2012; Henninger *et al.*, 2014; Svensson *et al.*, 2016). Las características disfuncionales del tejido adiposo probablemente se deben a la incapacidad de reclutar y / o diferenciar los preadipocitos, lo que resulta en una deposición excesiva de lípidos en, y la hipertrofia de, adipocitos preexistentes. Sin embargo, aún se desconoce las bases mecánicas del bloqueo, aunque claramente, la hipertrofia del adipocito resultante se asocia con disfunción del tejido adiposo y con la reducción de la sensibilidad a la insulina independientemente de si la obesidad está presente o no. Una posible explicación a la IR es la alteración de los niveles de adiponectina, así como la incapacidad de almacenar lípidos adicionales en el depósito subcutáneo durante el aumento de peso. Esto lleva al almacenamiento de lípidos en sitios ectópicos que incluyen depósitos viscerales, hígado, músculos y vasos sanguíneos que, a su vez, promueven aún más la IR (Hammarstedt *et al.*, 2012). Un estudio mostró que la IR en sujetos normo glucémicos no obesos está asociada con la activación de la vía JNK con una mayor fosforilación de residuos de serina del IRS-1, relacionado con el aumento de los lípidos dentro de músculo esquelético y el aumento de la grasa abdominal y visceral. Si bien la activación de JNK en ese modelo se puede atribuir directamente, al menos en parte, al estrés oxidativo que resulta del aumento de la oxidación de los lípidos. Más allá del estrés oxidativo, las altas tasas de oxidación de lípidos también pueden conducir a una oxidación de lípidos incompleta, con una acumulación resultante de intermediarios de la  $\beta$  oxidación tales como acil-CoAs o acil-carnitinas. Por lo tanto, no se puede concluir si la activación de la cinasa JNK está asociada al metabolismo de los lípidos en exceso, o a un efecto directo de los intermediarios de los lípidos intracelulares en las vías de la cinasa del estrés. La enzima proteína cinasa C (PKC), por ejemplo, puede activarse directamente por intermediarios lipídicos como los acil-CoAs de cadena larga, diacilgliceroles y ceramidas que están asociados con la IR en los seres humanos (Masharani *et al.*, 2011).

### 1.3.3. Efectos de la Resistencia a la Insulina

Como resultado de la IR el metabolismo se afecta. La IR lleva a una profunda disminución en la captación de la glucosa en el músculo y en los adipocitos, acompañada de reducciones en la síntesis de glucógeno y la supresión defectuosa de la gluconeogénesis hepática. La IR también afecta el metabolismo de los lípidos, favoreciendo la lipólisis y la generación de ácidos grasos libres. La resistencia a la acción hipoglucémica de la insulina tiende a aumentar moderadamente la glucosa en sangre, lo cual estimula la secreción de insulina y causa hiperinsulinemia (Morales-González, 2010). Además, la IR, afecta la función de otros órganos como: i) los vasos sanguíneos resultando en la vasoconstricción y la consecuente hipertensión y ii) el páncreas ocasionando una disminución en la masa de células beta y en la detección de glucosa. Interesantemente, el efecto mitogénico celular de la insulina se conserva en estados resistentes a la insulina que conducen al crecimiento celular predisponiendo al cáncer (Castro *et al.*, 2014). Además, los niveles elevados de insulina contribuyen a un aumento en la liberación del factor de crecimiento semejante a la insulina I (IGF-I). Al igual que la insulina, el IGF-I puede activar la transcripción del receptor de estrógeno y disminuye la producción de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), que al unirse al estradiol disminuye su biodisponibilidad atenuando su función proliferativa (Lorincz *et al.*, 2006). Así mismo, el IGF-I tiene un efecto mitogénico y anti-apoptótico en las células ductales y lobulillares del epitelio, además aumenta la producción de HIF-1 $\alpha$  y VEGF que contribuyen con la angiogénesis y la metástasis del cáncer (Lorincz *et al.*, 2006; Giovanni *et al.*, 2013).

### 1.3.4. Resistencia a la insulina y linfocitos T

Varias investigaciones sugieren que la obesidad y el sobrepeso pueden dañar la respuesta inmune adaptativa, afectando principalmente a los linfocitos T CD8, los cuales son los principales mediadores de la respuesta inmune contra el cáncer (Nieman, 1999; Yang *et al.*, 2009; Karlsson *et al.*, 2010; Sheridan, 2012; Paich, 2013). En estudios realizados *ex vivo* comparando las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) estimuladas con el virus H1N1 de individuos sanos con las de individuos con obesidad y sobrepeso, expresaron niveles bajos de CD69, CD28, ligando de CD40 y receptor de IL-12 (Paich, 2013), así como una menor producción de IFN $\gamma$  y granzima. Lo anterior sugiere una deficiencia en la activación y función de las células T en personas obesas y con sobrepeso (Sheridan, 2012; Paich, 2013). En otro trabajo donde utilizaron un modelo murino con obesidad inducida por dieta, demostraron una alteración de la respuesta de las células T CD8 de memoria específicas para influenza, ya que su función fue significativamente reducida e ineficaz en los pulmones de los ratones obesos (Karlsson *et al.*, 2010). Nieman DC y col. (1999) encontraron que en individuos con obesidad el número de leucocitos y linfocitos estaba elevado a excepción de los linfocitos T CD8 y presentaron una menor proliferación de linfocitos inducida por mitógenos. Es importante tener en consideración que en estos estudios no se menciona si los individuos o animales obesos presentan IR. Por otro lado, se desconoce si las células T, especialmente las células T CD8 activadas se vuelven resistentes a la insulina durante eventos pato-fisiológicos como la IR observada principalmente en sujetos obesos y con sobrepeso (Tsai *et al.*, 2018).

Las células T en reposo cubren el 96% de su demanda de energía por fosforilación oxidativa (OXPHOS) y cambian a la glucólisis aeróbica tras su activación, este cambio metabólico es necesario para apoyar su crecimiento, diferenciación efectora y función. Mientras que el cambio a la  $\beta$ - oxidación acompaña a la conversión de células T efectoras a células T de memoria. En contraste, las células Tregs son en gran parte independientes de la glucosa porque obtienen su energía por la oxidación de ácidos grasos. Tras la activación de las células T por las APC, la captación de glucosa aumenta para satisfacer la alta demanda de este carbohidrato. La señalización de CD28 conduce a la fosforilación de Akt, lo que resulta en una regulación al alza del transportador de glucosa 1 (Glut1). Además, las células T activadas comienzan a expresar el receptor de insulina (INSR), que fomenta un aumento en Glut3 y Glut4 (Fischer *et al.*, 2017). Así, en el estado activo, los linfocitos T aumentan la expresión de Glut1, Glut3 y Glut4 y tras su activación, la insulina solo aumenta la expresión de las isoformas Glut3 y Glut4 (Maratou *et al.*, 2007).

Los efectos de la IR en la inmunidad permanecen relativamente inexplorados y poco se sabe acerca de cómo la insulina afecta al sistema inmunológico. Recientemente, un estudio en un modelo murino *in vivo*, donde solamente silenciaron al receptor de la insulina (INSR) de las células T, observaron que, durante la infección viral con influenza, los ratones sin el INSR montaron una respuesta de células T CD8 específicas de antígeno más débil contra la nucleoproteína de la influenza, tanto en porcentajes como en números absolutos. Además, encontraron que el porcentaje de células T CD8 productoras de IFN $\gamma$ , pero no de TNF, también fue significativamente más bajo en esta cepa que en los ratones con el INSR. Sugiriendo que la falta de la señalización del INSR disminuye el potencial inflamatorio de las células T CD8 (Tsa *et al.*, 2018). En otro estudio realizado en ratas, se demostró que el silenciamiento del receptor de insulina altera las funciones de las células T, provocando una disminución de la proliferación y citotoxicidad de las células T CD8 en respuesta a aloantígenos, lo que indica que las células T activadas necesitan del INSR para cubrir su gran demanda de glucosa, lo que les permite adquirir funciones efectoras completas (Fischer *et al.*, 2017). Por otro lado, se observó que en los niños con diabetes tipo uno, el porcentaje de células T CD8 PD1+ (proteína de muerte celular programada 1) se altera antes y después de 4-6 meses de tratamiento con insulina (Granados *et al.*, 2017). En cuanto a las células Tregs, se ha visto que los linfocitos Tregs de tejido adiposo visceral de ratones obesos inducidos por dieta con IR tienen una reducción significativa en la expresión de IL10 a nivel de mRNA y proteína. Este efecto podría ser mediado por el alto nivel de insulina en este modelo (Han *et al.*, 2014). Este panorama indica que la IR podría influir en la proliferación, función y diferenciación de las poblaciones de células T.

Así mismo, se ha propuesto que la leptina, adiponectina y ghrelina son moléculas clave que relacionan la IR con el cáncer de mama, ya que afectan a las células T e influyen en el progreso del tumor (Vona-Davis *et al.*, 2007; Paz-Filho *et al.*, 2011; Wilk *et al.*, 2011; Baatar *et al.*, 2011; Carbone *et al.*, 2012; Grönberg *et al.*, 2012; Giovanni *et al.*, 2013; Procaccini *et al.*, 2013). Se ha observado que los individuos con IR presentan una menor concentración de

adiponectina y ghrelina y una mayor concentración de leptina (Abbasi *et al.*, 2004; McLaughlin *et al.*, 2004; Zuo *et al.*, 2013). Así mismo, se ha reportado que la insulina disminuye los niveles de adiponectina (Yadav *et al.*, 2013) y ghrelinas circulantes (Chabot *et al.*, 2014) y estimula la síntesis y secreción de leptina (Paz-Filho *et al.*, 2012).

#### **1.4. Leptina, adiponectina y ghrelina**

##### **Leptina**

La leptina es una hormona proteica, que contiene 167 aminoácidos, sintetizada principalmente por el tejido adiposo blanco y sus niveles se correlacionan directamente con la masa de grasa corporal y el tamaño de los adipocitos. También se produce en otros tejidos, como el estómago, el músculo esquelético, la placenta y la médula ósea (Facey *et al.*, 2017; Carbone *et al.*, 2012). La leptina media sus efectos mediante la unión con el receptor de leptina (LepR). Existen seis isoformas de LepR con diferentes longitudes de dominios citoplasmáticos, conocidos como LepRa, LepRb, LepRc, LepRd, LepRe y LepRf. Entre todas las isoformas de LepR, solo la isoforma de longitud completa (LepRb) es capaz de transducir completamente las señales de activación en la célula ya que su región citoplásmica contiene varios motivos necesarios para la transducción de señales. La forma larga de LepR (LepRb), cuya longitud es de 1162 aminoácidos, se expresa en el hipotálamo, las células endoteliales, las células pancreáticas, el ovario, los precursores hematopoyéticos de la médula ósea CD34<sup>+</sup>, los monocitos / macrófagos y las células T y B (Carbone *et al.*, 2012). Los linfocitos T expresan constitutivamente bajos niveles de LepR y la expresión aumenta en respuesta a la activación de las células T en términos tanto de porcentaje de células positivas como de densidad de receptores (Papathanassoglou *et al.*, 2006).

La leptina es secretada con un ritmo circadiano (sus niveles aumentan en un 30% en la noche) y su producción está regulada por varios factores. La reducción de la secreción de leptina se produce después del ayuno. Su síntesis también es regulada por las hormonas sexuales, en particular la secreción de leptina es inhibida por la testosterona e incrementada por los esteroides sexuales de ovario. La insulina, los glucocorticoides, el alcohol, la endotoxina, la IL-1 y el TNF también aumentan la secreción de leptina. Mientras que la hormona del crecimiento y la somatostatina decremantan su nivel (Carbone *et al.*, 2012).

La leptina tiene efectos centrales y periféricos. En el hipotálamo, la leptina regula la homeostasis energética al disminuir el apetito, a través de la regulación positiva de neuropéptidos como la hormona estimulante de los melanocitos  $\alpha$ , que se sabe que es anorexigénica y la regulación negativa de factores orexigénicos como el neuropéptido Y (Facey *et al.*; 2017). También regula las funciones neuroendocrinas del hipotálamo, pues se ha visto que un decremento de leptina produce la disminución de hormonas de la reproducción, lo que previene el embarazo, la disminución de la hormona tiroidea, lo cual disminuye la tasa metabólica, el incremento de la hormona de crecimiento y el decremento del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), lo cual puede disminuir los procesos

relacionados con el crecimiento y las funciones de homeostasis energética (Kelesidis *et al.*, 2010).

En la periferia, la leptina aumenta la actividad nerviosa simpática en el riñón, influye en la función reproductiva (juega un papel en el crecimiento y la maduración folicular), regula las funciones de las células pancreáticas y la secreción de insulina (inhibe la secreción de insulina), es pro-angiogénica para las células endoteliales, regula la hematopoyesis de la médula ósea. Además, la leptina tiene efectos en el metabolismo de los carbohidratos (aumenta la síntesis de glucógeno en hígado y la disminuye en músculo) y en el metabolismo de los lípidos (estimula la lipólisis, la oxidación de los ácidos grasos y la síntesis de ácidos grasos) (Carbone *et al.*, 2012).

La obesidad se asocia con la resistencia a la leptina. La resistencia a la leptina se asocia con niveles circulantes elevados de leptina, así como con la incapacidad de la leptina exógena para disminuir la ingesta de alimentos y el peso corporal. La resistencia a la leptina en la obesidad parece ser selectiva. Este concepto se derivó de observaciones en modelos murinos, en los cuales la administración de leptina activó el nervio simpático renal y aumentó la presión arterial, pero no pudo ejercer una acción anoréxica o de reducción de peso. Actualmente, los mecanismos de resistencia selectiva a la leptina deben investigarse más a fondo (Cui *et al.*, 2017).

Los mecanismos hipotalámicos subyacentes a la resistencia a la leptina incluyen: defectos en el receptor de LepRb, inducción de inhibidores de la señalización de leptina y alteraciones en el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica (Kelesidis *et al.*, 2010).

Defectos en el receptor de LepRb: El transporte deteriorado de LepRb a la membrana en subpoblaciones neuronales de los núcleos hipotalámicos que controlan la homeostasis energética ha surgido como un mecanismo novedoso. Los ratones que son deficientes en las proteínas del síndrome de Bardet-Biedl (BBS) muestran un transporte deficiente de LepRb a la membrana plasmática, lo que conduce a la resistencia a la leptina, pero esta resistencia es independiente de la obesidad. BBS1 interactúa directamente con LepRb, lo que podría explicar cómo las proteínas BBS median el transporte de LepRb (Cui *et al.*, 2017).

Inducción de inhibidores de la señalización de leptina: La sobreexpresión de SOCS3 bloquea la transducción de señales inducida por leptina. Se sabe que SOCS3 puede ser inducido rápidamente por la IL- 6 y en respuesta a la administración periférica de leptina (Cui *et al.*, 2017).

Alteraciones en el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica: Se sabe que el transporte de la leptina a través de la barrera hematoencefálica (BBB) es menor en los ratones obesos. Los astrocitos han emergido como mediadores potenciales de la resistencia a la leptina en la obesidad, ya que participan en el transporte de leptina a través de la BBB. Los tanicitos también están involucrados en la resistencia a la leptina asociada a la obesidad, puesto que la leptina transportada por la sangre primero es absorbida por estas células en la

eminencia media del hipotálamo y luego liberada en el hipotálamo medio basal, un proceso que se interrumpe en ratones con obesidad inducida por dieta (Cui *et al.*, 2017).

### **Adiponectina**

La adiponectina es una hormona proteica de 244 aminoácidos, secretada principalmente por el tejido adiposo, aunque se ha visto que existen otros tejidos que también expresan niveles bajos de adiponectina, como los osteoblastos, las células del parénquima hepático, los miocitos, células epiteliales, y tejido placentario. Los niveles séricos de adiponectina disminuyen con la obesidad y se asocian positivamente con la sensibilidad a la insulina (Achari *et al.*, 2017). La adiponectina actúa principalmente a través de la interacción con dos receptores diferentes: AdipoR1 y AdipoR2. AdipoR1 se expresa principalmente en el músculo esquelético, mientras que AdipoR2 se expresa principalmente en el hígado, ambos receptores se expresan en tejido adiposo. Estos receptores también se expresan sobre la mayoría de los monocitos, un número sustancial de células B y células NK, pero solo en un pequeño porcentaje de células T. La expresión en la superficie de AdipoR1 y AdipoR2 se detectó en el 7.5% y 7.3% de células T CD8, respectivamente. Sin embargo, la mayoría de las células T expresan AdipoRs intracelularmente y la expresión de estos receptores aumenta en la superficie celular de las células T después de su estimulación antígeno-específica (Wilk *et al.*, 2011). Aparte de AdipoR1 y AdipoR2, también se ha identificado otro receptor para la adiponectina, llamado T-cadherina (Achari, *et al.*, 2017), el cual se expresa en las células endoteliales, células del músculo liso y miocitos cardiacos (Wang *et al.* 2016). La liberación de adiponectina es regulada negativamente por la insulina, las hormonas sexuales y las citocinas proinflamatorias. El TNF suprime la secreción de adiponectina en el adipocito y su producción es regulada también por otras citocinas proinflamatorias, como la IL-6 (Wilk *et al.*, 2011).

La adiponectina muestra funciones metabólicas clave en el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo. En el músculo e hígado aumenta la sensibilidad a la insulina y activa la oxidación de ácidos grasos. En el hígado la adiponectina activa el transporte de glucosa, inhibe la gluconeogénesis, inhibe la lipogénesis, disminuye los triacilglicéridos y la producción de glucosa. En el músculo esquelético incrementa los niveles de Glut-4 y en los adipocitos inhibe la lipólisis. En el músculo esquelético y el tejido adiposo estimula la captación de la glucosa. En el páncreas, la adiponectina actúa sobre la proliferación celular estimulando la secreción de insulina (Nigro *et al.*, 2014; Carbone *et al.*, 2012; Sowers, 2008). La adiponectina, parece ejercer una protección cardiovascular, ya que reduce la apoptosis de las células endoteliales y ejerce efectos antiaterogénicos. También reduce la cantidad de lipoproteínas de baja densidad. Además, la adiponectina puede reducir el riesgo de aterosclerosis al reducir la expresión vascular de las moléculas de adhesión y la formación de células espumosas y la proliferación de células del músculo liso vascular (Sowers, 2008; Achari *et al.*, 2017).

### **Ghrelin**

Es una hormona peptídica de 28 amino ácidos, derivada de un procesamiento específico de su péptido precursor proghrelina. Es producida y secretada principalmente por las células enteroendocrinas tipo X/A del estómago (Lee, 2011). Recientemente se ha visto que la unión del TCR de las células T CD8 y T CD4 resulta en la secreción de niveles substanciales de ghrelina con un pico a las 48 h (Dixit *et al.*, 2004). La ghrelina y su receptor (GHS-R) también se expresa en células T, B, monocitos y neutrófilos (Lee, 2011). En las células T humanas, la expresión de GHS-R aumenta significativamente con la activación celular. Además, la leptina aumenta la expresión de GHS-R en los linfocitos T humanos (Dixit *et al.*, 2004). La ghrelina es la primera hormona peptídica en la que se identificó una modificación por un ácido graso (ghrelina acilada), posee principalmente una modificación n-octanoil en su serina 3, que es esencial para su actividad (del Rincon Jarero, 2007; Kojima *et al.*, 2005). Inicialmente su forma acilada se determinó como la forma activa, pero también la forma no acilada ha mostrado una serie de efectos desde el punto de vista farmacológico. Aunque la ghrelina se identificó como el ligando endógeno del GHS-R (receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento), los efectos de su forma no acilada no son mediados por este receptor. La ghrelina es una molécula inestable y su forma acilada produce efectos distintos de los de la forma no acilada, y ambas formas se encuentran en estómago y sangre (del Rincon Jarero, 2007).

Inicialmente se observó que la ghrelina estimulaba la liberación hipofisiaria de GH (hormona del crecimiento) de una manera dosis dependiente; más tarde se encontró que desempeñaba un papel importante en la regulación hipotalámica de la homeostasis energética al estimular el apetito y la alimentación, a través de vías centrales y periféricas, y a través del nervio vago. Los niveles de ghrelina circulantes aumentan en condiciones de ayuno o bajo índice de masa corporal (IMC), como caquexia relacionada con la enfermedad, anorexia nerviosa y otros estados de desnutrición. Por el contrario, los niveles de ghrelina disminuyen en respuesta al aumento del IMC y la obesidad, y los niveles elevados de glucosa, insulina, lípidos, leptina, GH, somatostatina, péptido YY, urocortina-1 y gastrina. La ghrelina también aumenta la gluconeogénesis, la síntesis de ácidos grasos y la lipogénesis a través de mecanismos principalmente independientes de la GH. Además, la ghrelina parece contribuir a través de vías tanto dependientes de GH como independientes de GH a la regulación de los sistemas cardiovascular (aumenta la contractilidad cardíaca, el gasto cardíaco y la vasodilatación) y reproductor, la función gastrointestinal (incrementa la motilidad gastrointestinal y la secreción de ácido gástrico), la función pancreática (modulación de las secreciones endocrinas y exocrinas), la adipogénesis (la incrementa), la angiogénesis (estimula la angiogénesis en las células endoteliales), la formación ósea (aumenta la diferenciación de osteoblastos y la densidad mineral de huesos)(Sever *et al.*, 2016) la modulación del sueño (promueve el sueño), la supresión de termogénesis de la grasa parda, modulación del estrés y ansiedad (ansiolítico y antidepresivo), protección contra la atrofia muscular (Müller *et al.*, 2015), la función antiinflamatoria y la función inmune (Severe *et al.*, 2016).



### 1.4.1. Efectos de la leptina, adiponectina y ghrelina en las células T

Aparte de sus funciones metabólicas, la leptina, adiponectina y ghrelina están implicadas en la regulación de las células T. Además, se ha reportado que la leptina es una citocina proinflamatoria, la adiponectina tiene propiedades tanto antiinflamatorias como proinflamatorias y la ghrelina es un potente mediador antiinflamatorio (Carbone *et al.*, 2012; Baatar *et al.*, 2011).

#### Leptina

La leptina regula la respuesta adaptativa del sistema inmune y sus efectos han sido ampliamente investigados en las células T CD4, mientras que son menormente conocidos en las células T CD8 y Treg (Carbone *et al.*, 2012).

La leptina es capaz de aumentar de manera dosis dependiente la activación y proliferación de los linfocitos T estimulados con fitohemaglutinina (PHA) y/o concanavalina A (Con A), logrando un efecto máximo a una concentración de 10 nM. Por lo tanto, la leptina aumenta la expresión de marcadores de activación temprana como CD69, así como la expresión de marcadores de activación tardía, como CD25 o CD71 en linfocitos T CD4 y T CD8 en presencia de concentraciones subóptimas de activadores como PHA (2 mg / mL) y Con-A (4 mg/ml). Además, 10 nM de leptina incrementan el porcentaje de células T CD4 y T CD8 productoras de IFN $\gamma$ , cuando las células son estimuladas con 2 mg/ml de PHA. Sin embargo, cuando se emplean concentraciones máximas de PHA (8 mg/ml) o Con A (10 mg/ml), la leptina no tiene ningún efecto adicional en la activación y en la proliferación. Es importante mencionar que la leptina por sí sola no es capaz de activar a los linfocitos T *in vitro*, es necesario de la estimulación de los linfocitos T para que ésta pueda aumentar su activación y proliferación, lo cual tal vez se debe a que cuando los linfocitos T se activan, aumenta la expresión del receptor de leptina en su superficie (Martín-Romero *et al.*, 2000; Fernández-Riejos *et al.*, 2010).

La leptina tiene diferentes efectos sobre la proliferación y la producción de citocinas por las células T CD4 Naïve y T CD4 de memoria. La leptina promueve la proliferación y la secreción de IL-2 por las células T Naïve; mientras que inhibe la proliferación, promueve el cambio hacia Th1 y aumenta la secreción de IFN $\gamma$  por las células T de memoria (La Cava *et al.*, 2004). El efecto de la polarización de las células T hacia una respuesta Th1 parece estar mediado por la estimulación de la síntesis de IFN $\gamma$  y la inhibición de la producción de IL-4. (Fernández-Riejos *et al.*, 2010). El marcado aumento en el IFN $\gamma$  inducido en la población de memoria podría explicar la inhibición de la proliferación observada en esta población, ya que se sabe que los niveles altos de IFN $\gamma$  pueden inhibir la proliferación de células T (Lord *et al.*, 2002).

Además, la leptina promueve la expresión de moléculas de adhesión en células T CD4, como VLA-2 (CD49b) o ICAM-1 (CD54) (Fernández-Riejos *et al.*, 2010), posiblemente a través de la inducción de citocinas proinflamatorias como el IFN $\gamma$ . El aumento de la expresión de las moléculas de adhesión podría ser responsable de la inducción del agrupamiento, la

activación y la migración de las células inmunes a los sitios de inflamación (La Cava *et al.*, 2004). Asimismo, la leptina promueve la supervivencia de las células T y la supervivencia de los linfocitos T Jurkat mediante la modulación de la expresión de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-xL en la apoptosis inducida por estrés (Fernández-Riejos *et al.*, 2010). En ratones, la leptina también promueve la supervivencia de las células T CD4 *in vitro* al suprimir la apoptosis mediada por Fas, pero no la promueve en las células T CD8 (Papathanassoglou *et al.*, 2006).

La leptina también está involucrada en el metabolismo de los linfocitos. En un modelo de ratones, las células T CD4 efectoras activadas (Th1, Th17), pero no las células T reguladoras requirieron de leptina para que el transportador de glucosa Glut1 aumente, el cual apoya la captación y el metabolismo de la glucosa necesarios para la proliferación y la producción de citocinas inflamatorias. Esta capacidad de la leptina para incrementar la expresión de Glut1 en las células T y el metabolismo de la glucosa se observó solo en los linfocitos activados a través de TCR junto con la coestimulación. La sobreexpresión de Glut1 no rescató el número de células T de ratones en ayuno, lo que sugiere que la capacidad de la leptina para rescatar parcialmente el número de células T en ratones en ayuno es a través de un mecanismo independiente del incremento de la captación de glucosa. La leptina podría rescatar el número de células al oponerse a las acciones apoptóticas de los glucocorticoides tanto en los timocitos como en los linfocitos periféricos. En contraste, la inyección *in vivo* de leptina durante el ayuno rescató por completo los defectos persistentes de las células T en la producción de citocinas y el metabolismo de la glucosa luego de su activación (Saucillo *et al.*, 2014; Gerriets *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha reportado que la leptina puede actuar como una señal negativa para la expansión de las células Tregs presentes en el ser humano. Las células Treg humanas recién aisladas producen leptina y expresan altos niveles de LepR. La neutralización *in vitro* con anticuerpo monoclonal anti-leptina después de la estimulación anti-CD3 / CD28 dio lugar a la proliferación de células Treg, consistente con este efecto, la neutralización de la leptina revirtió el estado anérgico de las células Treg. Además, en condiciones normales, los Tregs secretaban leptina, que activaba a mTOR de manera autocrina para mantener su estado de hiporrespuesta. Finalmente, se ha demostrado que las células Treg de ratones db / db mostraron una actividad mTOR disminuida y una proliferación aumentada en comparación con la de las células de ratones silvestres (Carbone *et al.*, 2011).

Otro papel importante de la leptina en la inmunidad adaptativa se destaca por la observación de que la deficiencia de leptina en ratones ob / ob está asociada con la inmunosupresión y la atrofia tímica (La Cava *et al.* 2004). La capacidad de la leptina para prevenir la atrofia tímica se debe a un efecto anti apoptótico directo sobre las células T. Por lo tanto, el tratamiento con leptina aumenta la expresión tímica de la interleucina 7, un importante factor de crecimiento de timocitos solubles producido por las células epiteliales del timo medular (TEC). La hormona leptina tiene un papel en el mantenimiento del epitelio tímico sano y en la promoción de la timopoyesis, que se revela cuando la homeostasis del timo se ve perturbada por la endotoxemia. En este caso, el tratamiento con leptina disminuye la apoptosis *in vivo* de timocitos doble positivos y promueve la proliferación de timocitos doble negativos. La

leptina proporciona una señal de supervivencia en las células T dobles positivas (CD4 + CD8 +) y en los timocitos CD4+ CD8 + positivos simples durante la maduración del timo (Fernández-Riejos *et al.*, 2010).

Como se mencionó anteriormente, la obesidad se asocia con la resistencia a la leptina y la resistencia a la leptina se asocia con niveles circulantes elevados de leptina, así como con la incapacidad de la leptina exógena para disminuir la ingesta de alimentos y el peso corporal. Sin embargo, no se sabe mucho acerca de la resistencia a la leptina en los linfocitos T. La señalización de la leptina mediada por LepR / STAT-3 en linfocitos T disminuye en el modelo de obesidad y resistencia a la leptina (HFD) de ratones obesos inducida por la dieta, en comparación con los controles (LFD). No se detectaron diferencias significativas entre HFD y LFD con respecto a los niveles de expresión de LepR reflejados por los valores de MFI. Esto último puede sugerir que la disminución en la activación de STAT-3 en animales HFD no se debe a la disminución de LepR inducida por la dieta. Los autores sugieren que la señalización de LepR afectada podría deberse a defectos post-receptor, pues se ha encontrado que la dieta HFD está asociada en parte con el aumento del nivel del supresor de la señalización de citocinas 3 en el hipotálamo de estos ratones (Papathanassoglou *et al.*, 2006). El papel de la leptina en la modulación de la función de células T en humanos se ha definido en estudios clínicos en casos específicos y raros de pacientes con obesidad y deficiencia congénita de leptina. La deficiencia de leptina se asoció con un número reducido de células T CD4 circulantes y con la alteración de la proliferación y liberación de citocinas de las células T, lo cual se revirtió mediante la administración de leptina humana recombinante (Fernández-Riejos *et al.*, 2010). Por otro lado, los nonagerianos con concentraciones más altas de leptina presentan porcentajes más altos de células T CD8 Naïve, sugiriendo que el aumento de los niveles de leptina puede ser un factor importante que promueve el mantenimiento de la reserva de células T Naïve en nonagenarios (Chen *et al.*, 2010).

### **Adiponectina**

Estudios recientes que abordan el papel de la adiponectina en la expansión de poblaciones de células T específicas de antígeno de CMSP humanas también han dado resultados discordantes como se describe a continuación. Wilk S *et al* (2011) demostraron que la adiponectina juega un papel importante como regulador negativo de las células T CD8 específicas de antígeno generadas a partir de CMSP estimuladas con péptido de influenza, ya que la adición de adiponectina disminuye la producción de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , e IL-2 por las células T CD8 antígeno-específicas, disminuye la expansión e incrementa la apoptosis de éstas células y de las células T activadas con anti-CD3/CD28. Sin embargo, Palmer (2008) observaron que en individuos infectados por hepatitis C, la estimulación ex vivo de PBMC (TCD8, TCD4, NK) con adiponectina resultó en una inducción sustancial de la producción de IFN $\gamma$  (Palmer *et al.*, 2008). Así mismo, Cheng y col. (2000) reportaron que el tratamiento de las células T CD4 con adiponectina aumentó la frecuencia de células que contienen IFN $\gamma$ , indicando que la adiponectina promueve la diferenciación de las T CD4 a hacia un fenotipo Th1 (Cheng *et al.*, 2012).

Otros estudios sugieren que el efecto de la adiponectina sobre las células T podría estar mediada, al menos parcialmente, por su capacidad para alterar las funciones de las células dendríticas. Un estudio *in vitro* donde se acondicionaron células dendríticas con 40 µg/ml adiponectina, se observó que la adiponectina interactúa con sus receptores (AdipoR1 / R2) en las células dendríticas para inhibir la activación de NF-κB. La inhibición de la activación de NF-κB bloquea la maduración de las células dendríticas en términos del incremento de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad y de las moléculas coestimuladoras, lo que resulta en anti inflamación e inhibición de la coestimulación, llevando a la anergia de las células T (Tan *et al.*, 2014; Resigno *et al.*, 1998). Sin embargo, en otro estudio mostraron que la adiponectina usada a 10 µg/ml puede inducir la degradación de IκB y la traslocación nuclear de NF-κB, lo cual es capaz de generar respuestas Th1 y Th17 debido a la maduración y producción de IL-12 por las células dendríticas. Este efecto parece ser independiente de la interacción de la adiponectina con sus receptores AdipoR1 y / o AdipoR2 (Jung *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2014). En contraste, otros informaron que 5 µg/ml de adiponectina puede reducir la expresión de moléculas coestimuladoras y de MHC II, pero incrementa la expresión de la molécula co inhibidora PDL-1 durante el desarrollo de las células dendríticas. El incremento de la expresión de PDL-1 conduce a una inhibición de la capacidad aloestimuladora de las células dendríticas tratadas con adiponectina, pero mejora su capacidad para inducir la expansión de las células T reguladoras (Tsang *et al.*, 2011).

## **Ghrelin**

La ghrelina atenúa significativamente las respuestas proinflamatorias y Th1 inducidas por leptina en células T y células mononucleares humanas (Taub, 2008). La ghrelina inhibe las células Th1 y aumenta la polarización de Th2 y de células T reguladoras (Pereira *et al.*, 2017). Dixit y col. (2004) *et al* demostraron que el tratamiento con ghrelina *in vitro* inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias en monocitos humanos, células T y células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Las células T humanas estimuladas con anticuerpo anti-CD3 inmovilizado en presencia de ghrelina durante 24 horas presentaron una inhibición significativa dependiente de dosis de IL-1β e IL-6. La secreción de TNF-α por las células T también mostró una tendencia decreciente en respuesta a la ghrelina; sin embargo, debido a las variaciones individuales en la producción de TNF-α entre estos donantes, esta inhibición no alcanzó la significación estadística. Por otro lado, la ghrelina no tuvo un efecto significativo sobre la proliferación o la secreción de IL-2 e IFNγ de las células T humanas (Dixit *et al.*, 2004).

Además, la ghrelina afecta a las células dendríticas. Las células dendríticas tratadas con ghrelina presentan una capacidad reducida para inducir la secreción de IL-17A e INF-γ por células T humanas cultivadas. La ghrelina impide la formación de Th1 y Th17 al afectar las células dendríticas de tal manera que su producción de TGFβ1 e IL-10 aumenta, mientras que su síntesis de IL-12 (p40) disminuye. Se sabe que TGF-β e IL-10 favorecen la diferenciación predominante de células T CD4 Naïve en Treg. (Orlova *et al.*, 2015).

Así mismo, se ha demostrado que la ghrelina promueve el desarrollo de linfocitos en los órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) y reduce la involución del timo asociada

con la edad al aumentar el número de progenitores hematopoyéticos y tímicos en la médula ósea y el timo, así como la integridad del timo, el número de timocitos, la salida de células T de novo y la diversidad de células T periféricas (Baatar *et al.*, 2011). La ghrelina también modula las células dendríticas tímicas, pues la administración de ghrelina en el timo induce la proliferación de células dendríticas en ratones de edad avanzada, lo que contribuye a una maduración y respuesta más efectiva de la diferenciación de células T efectoras y reguladoras (Treg) (Pereira *et al.*, 2017).

#### 1.4.2. Relaciones entre la leptina, adiponectina, ghrelina y cáncer de mama

El aumento de leptina y el decremento de ghrelina y adiponectina están relacionados con un mayor riesgo de cáncer de mama, un estado clínico patológico más maligno y una pobre supervivencia de pacientes con cáncer de mama como se resume en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Relaciones clínico patológicas y efectos en la biología del cáncer de mama de la leptina, adiponectina y ghrelina

	Leptina	Adiponectina	Ghrelina
Riesgo de cáncer de mama	Incrementa con niveles altos en plasma (Pan <i>et al.</i> , 2018)	Incrementa con niveles bajos en plasma (Vona-Davis <i>et al.</i> , 2012)	Pacientes con expresión en tumores: tienen un riesgo 2,5-3 veces menor de recurrencia o muerte por BrCA que los que no la expresan (Grönberg <i>et al.</i> , 2012; Grönberg <i>et al.</i> , 2017)
Crecimiento celular del cáncer de mama	Mitogénico (Vona-Davis <i>et al.</i> , 2012)	Antimitogénico (Vona-Davis <i>et al.</i> , 2012)	¿? (Lin <i>et al.</i> , 2017)
Apoptosis de células tumorales	Reducida (Vona-Davis <i>et al.</i> , 2012)	Aumentado (Vona-Davis <i>et al.</i> , 2012)	ND
Angiogénesis del tumor	Estimulado (Vona-Davis <i>et al.</i> , 2012)	Inhibido (Vona-Davis <i>et al.</i> , 2012)	ND (Chopin <i>et al.</i> , 2012)
Grado histológico, Receptores hormonales (RH), Tamaño de tumor	Altos niveles: alto grado histológico, RH negativos, tumor más grande (Vona-Davis <i>et al.</i> , 2012)	Bajos niveles: alto grado histológico, no relacionado con RH, tumor más grande (Vona-Davis <i>et al.</i> , 2012)	Expresión de ghrelina: bajo grado histológico, receptores de estrógeno positivos, tamaño del tumor pequeño (Grönberg <i>et al.</i> , 2012)

¿? Es controversial, algunos estudios dicen que estimula la proliferación y otros que la inhiben.  
 ND: no determinado

## **1.5. Sistema Inmune y Cáncer**

### **1.5.1. Inmunovigilancia**

El concepto de inmunovigilancia, propuesto por Macfarlane Burnet en la década de 1950 sostiene que el sistema inmune actúa como centinela en el reconocimiento y eliminación de células nacientes transformadas. La primera demostración experimental de que los tumores pueden inducir respuestas inmunes protectoras procede de estudios de tumores trasplantados; en estos estudios indujeron un sarcoma en un ratón endogámico pintando su piel con el carcinógeno químico metilcolantreno (MCA), luego extirparon el tumor y lo trasplantaron a otro ratón singénico y el tumor creció, sin embargo, cuando volvieron a trasplantar el tumor al huésped original, el ratón rechazó el tumor, mientras que el mismo ratón que se había vuelto inmune a su tumor fue incapaz de rechazar los tumores inducidos por MCA generados en otros ratones (Abbas *et al.*, 2010).

Sin embargo, la idea de la inmunovigilancia se aceptó hasta la década de 1990, cuando los modelos animales experimentales que usaron ratones knock-out validaron la existencia de la inmunovigilancia del cáncer tanto en tumores inducidos químicamente como espontáneos (Kim *et al.*, 2007). Algunos de estos estudios llevaron al descubrimiento de la importancia del interferon gama (IFN $\gamma$ ) en el rechazo inmunológico de células tumorales trasplantadas y a la demostración de que los ratones que carecen de respuesta al IFN $\gamma$  (ratones con genes seleccionados sin el receptor de IFN $\gamma$  o el factor de transcripción STAT1 requerido para la señalización del receptor de IFN $\gamma$ ) o inmunidad adaptativa (RAG2 - / - : ratones que carecen de células T y células B) eran más susceptibles a la formación de tumores primarios espontáneos o inducidos químicamente (Schriber *et al.*, 2011).

En las últimas dos décadas, numerosos estudios han establecido que los ratones inmunodeficientes son más propensos a los tumores que los ratones inmunocompetentes después del tratamiento con carcinógenos como el MCA y que tienen una mayor susceptibilidad e incidencia de formación de tumores espontáneos que los ratones inmunocompetentes. Los ratones inmunodeficientes probados en tales experimentos incluyen ratones genéticamente inactivados con déficits de inmunidad innata o adaptativa, así como ratones que se hicieron inmunodeficientes mediante la administración crónica de anticuerpos monoclonales que depletan las células T CD4, T CD8, NK y NKT, IFN $\gamma$  o IFN $\alpha/\beta$  (Schriber *et al.*, 2011). Debido a estos estudios actualmente se sabe que las células inmunes como T, NK y NKT y los interferones tipo I y II y perforina son importantes en la inmunovigilancia del cáncer (Kim *et al.*, 2007).

### **1.5.2. Inmunoedición**

La inmunoedición es un proceso dinámico, mediante el cual el sistema inmune no solo protege contra el desarrollo del cáncer, sino que también da forma a las características de los tumores emergentes y se compone de tres fases: Eliminación, Equilibrio y Escape (Mittal *et al.*, 2014).

1. Eliminación: el sistema inmune innato y adaptativo trabajan juntos para detectar la presencia de un tumor en desarrollo y destruirlo antes de que se vuelva clínicamente aparente. Los mecanismos por los que el sistema inmune es alertado de la presencia de un tumor en desarrollo son:
  - Señales de peligro: producción de IFN tipo 1 que activa a las células dendríticas las cuales activan al sistema inmune adaptativo
  - DAMPS (Patrones moleculares asociados a daño): liberados de células tumorales que mueren como HMGB1 o liberadas de tejidos dañados como fragmentos de hialuronano.
  - Ligandos de estrés: MICA/B que se unen a receptores en el sistema inmune innato, lo que lleva a la liberación de citoquinas proinflamatorias e inmunomoduladoras, que a su vez establecen un microambiente que facilita el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa específica de tumor (Schriber *et al.*, 2011).

El proceso de eliminación incluye respuestas inmunes innatas y adaptativas en contra de las células tumorales. Cuando un tumor sólido ha crecido a más de 2-3 mm, elimina material inmunogénico de células tumorales muertas, libera señales de peligro, requiere un suministro de sangre y remodelación estromal para la progresión tumoral, que a su vez induce señales proinflamatorias y todo esto conduce al reclutamiento y activación de células como NK, NKT, células T $\gamma\delta$ , macrófagos y células dendríticas en el sitio del tumor. Las células transformadas pueden ser reconocidas por linfocitos infiltrantes tales como NK, NKT y células T $\gamma\delta$ , las cuales producen IFN $\gamma$ . Todo esto contribuye con la apoptosis de las células tumorales, liberándose antígenos tumorales que son captados por las células dendríticas las cuales migran a los ganglios linfáticos donde presentan antígenos tumorales a las células T Naïve produciendo su activación y proliferación, generando linfocitos T CD4 y T CD8 específicos de antígeno, los cuales son reclutados al sitio primario del tumor eliminando a las células tumorales que expresan el antígeno tumoral (Kim *et al.*, 2007).

2. Equilibrio: algunas variantes de células tumorales que sobreviven a la fase de eliminación entran a la fase de equilibrio. Dado que esta fase implica la eliminación continua de células tumorales y la producción de variantes tumorales resistentes al sistema inmune por la presión de selección del sistema inmune adaptativo, es probable que el equilibrio sea la fase más larga de la inmunoección del cáncer y que puede ocurrir en un período de muchos años (Kim *et al.*, 2007).

Se piensa que la inmunidad adaptativa específicamente IL-12, IFN $\gamma$ , las células T CD4 y T CD8, pero no la inmunidad innata es responsable de mantener la fase de equilibrio, la cual parece ser el resultado de las acciones inhibitoras de crecimiento y citotóxicas del sistema inmune sobre las células tumorales y posiblemente las mismas funciones inmunológicas también proporcionan la presión selectiva que promueve el crecimiento de las células tumorales que han adquirido las mutaciones más inmuno evasivas (Schriber *et al.*, 2011).

3. Escape: Las células tumorales que han adquirido la capacidad de eludir el reconocimiento y la destrucción inmune comienzan a crecer progresivamente, se vuelven clínicamente aparentes y establecen un microambiente inmunosupresor tumoral. La progresión del equilibrio a la fase de escape puede ocurrir porque la población de células tumorales cambia en respuesta a las funciones de edición del sistema inmune o porque el sistema inmune del huésped cambia en respuesta a una mayor inmunosupresión inducida por cáncer o por deterioro del sistema inmune (Schriber *et al.*, 2011).

El escape de las células tumorales puede ocurrir a través de muchos mecanismos diferentes:

- Reconocimiento inmune reducido: alteraciones que conducen a un reconocimiento inmunitario reducido como pérdida de expresión de antígenos, pérdida de MHCI, pérdida de la función de procesamiento de antígeno de la célula tumoral.
- Resistencia o supervivencia incrementada: una mayor resistencia a los efectos citotóxicos de la inmunidad por la inducción de mecanismos anti- apoptóticos que implican la activación persistente de la transcripción pro-oncogénica como STAT3 o expresión de moléculas efectoras anti-apoptóticas como BCL-2 (Mittal *et al.*, 2014).
- Desarrollo de microambiente tumoral inmunosupresor: las células tumorales pueden promover el desarrollo de este estado produciendo citocinas inmunosupresoras tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), TGF-B, IL-10 o indol-2,3-dioxigenasa (IDO); expresando ligandos de receptores co-inhibidores como PD-L1 y galectina 9 que se unen a PD1 y TIM3 respectivamente que se encuentran principalmente en la superficie de linfocitos T disminuyendo su proliferación, producción de citocinas y funciones efectoras, los cuales son conocidos como linfocitos T exhaustos; reclutando y generando células T reguladoras(Treg) mediante la secreción de CCL22 y TGF-B respectivamente y reclutando células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) a través de la secreción de GM-CSF, VEGF e IL10. Las Treg y las MDSCs son dos tipos principales de poblaciones de leucocitos inmunosupresores que desempeñan un papel clave en la inhibición de respuestas antitumorales protectoras del huésped (Schriber *et al.*, 2011; Whiteside, 2010).

Los linfocitos T CD8 exhaustos y los Treg tienen un papel importante en los mecanismos de escape de las células tumorales y estos se han encontrado en los tumores y sangre periférica de pacientes con cáncer de mama (Norde *et al.*, 2012; Muents *et al.*, 2013; Ghebeh *et al.*, 2006; Poschke *et al.*, 2012; Whiteside, 2012)

### **1.6. Linfocitos T CD8 exhaustos**

Durante la infección inicial, las células T Naïve se activan y proliferan, luego se diferencian en células T efectoras. Después del pico de expansión efector, la resolución de la inflamación y la eliminación del antígeno, la mayoría (90-95%) de las células T efectoras mueren, pero persiste un subconjunto que se diferencia en células T de memoria, las cuales son capaces de



reactivar rápidamente las funciones efectoras tras la re estimulación (Wherry *et al.*, 2015; Wherry, 2011; Jiang *et al.*, 2015). Estas células también tienen una capacidad de supervivencia considerable y se mantienen a largo plazo sin antígeno a través de la auto renovación homeostática mediada por IL-7 e IL-15 (Wherry *et al.*, 2015). Un aspecto clave del desarrollo de células de memoria persistentes y funcionales es que después de la fase efectora, el desarrollo de la memoria ocurre en ausencia de estimulación antigénica y altos niveles de inflamación persistente. Por el contrario, durante las infecciones crónicas y el cáncer que implican la exposición y/o inflamación persistente del antígeno, este programa de diferenciación de las células T de memoria se modifica notablemente, dando como resultado un estado de diferenciación alterado, denominado agotamiento de células T CD8 (Células T CD8 exhaustas) (Wherry, 2011).

Las células T CD8 exhaustas presentan un perfil transcripcional distinto del de las células T efectoras o de memoria funcionales. Los factores transcripcionales BLIMP1, NFAT y BATF han sido implicados en el agotamiento de las células T CD8. La expresión de Blimp1, NFATc1 y BAFT es muy alta en las células TCD8 exhaustas. La expresión alta de Blimp1 está asociada con la sobre regulación de muchos receptores inhibidores incluyendo a PD-1 y LAG-3. La expresión alta de NFAT en el citoplasma se debe a su translocación defectuosa al núcleo, lo cual se asocia a una pobre producción de citocinas mientras que BATF regula negativamente a AP-1 el cual es importante para la diferenciación y ciclo celular de los linfocitos T (Wherry, 2011).

Las vías implicadas en la regulación del agotamiento de las células T pueden agruparse en tres categorías principales: receptores inhibidores de la superficie celular, factores solubles y tipos de células inmunoreguladoras. Sin embargo, como se mencionó anteriormente una característica clave en el desarrollo de células T CD8 exhaustas parece ser la exposición elevada y crónica al antígeno (Wherry, 2011; Wherry *et al.*, 2015).

Los receptores inhibidores tienen un papel clave en muchos aspectos de la inmunidad adaptativa, incluida la tolerancia y la prevención de la autoinmunidad. Aunque las células T efectoras funcionales pueden expresar transitoriamente receptores inhibidores durante la activación, la expresión prolongada y/o elevada de múltiples receptores inhibidores es el sello distintivo de las células T CD8 exhaustas (Wherry, 2011). Aunque PD1 es el principal receptor inhibidor que regula el agotamiento de las células T y es el mejor caracterizado, muchos otros receptores inhibidores regulan el agotamiento de las células T CD8 en pacientes con cáncer, estos receptores son: CTLA4, TIM3, LAG-3, BTLA y TIGIT (Wherry *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2015; Catakovic *et al.*, 2017). Se piensa que el patrón de co-expresión de receptores inhibidores y el número de receptores expresados simultáneamente por la misma célula T CD8 pueden afectar sustancialmente la severidad de su disfunción (Wherry *et al.*, 2015, Jiang *et al.*, 2015). En modelos murinos de cáncer de colon y ovario se observó que los linfocitos infiltrados en tumor (TIL) T CD8 PD1+CTLA4+ son más disfuncionales en cuanto a su habilidad para proliferar y secretar citocinas efectoras que los que presentan solo una de estas moléculas. Igualmente, en pacientes con melanoma encontraron que los T CD8 PD1+TIM3+ específicos de tumor son más disfuncionales en cuanto a su producción de citocinas que los linfocitos T PD1+TIM3- y PD1-TIM3-. En pacientes con cáncer de ovario

las células T CD8 PD1+LAG3+ produjeron menos IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  comparados con los T CD8 PD1-LAG3+ y PD1-LAG3-. Así mismo en pacientes con melanoma las células T CD8 PD1+BTLA+ produjeron menos IFN $\gamma$  que las T CD8 PD1+BTLA- y PD1-BLA- (Jiang *et al.*, 2015). Además, la recuperación de la función antitumoral se incrementa considerablemente mediante el bloqueo simultáneo de la vía de PD1 y CTLA-4, la vía PD1 y TIM3, la vía PD1 y LAG3, la vía PD1, TIM3 y BTLA4 y la vía PD1 y TIGIT (Wherry *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2015). Aunque todos los bloqueos de los receptores inhibidores tienen algún efecto sobre las funciones de las células T CD8, el efecto del bloqueo de las vías PD1 y CTLA4 es proporcionalmente mayor que el del bloqueo único de las vías TIM3, LAG-3, BTLA o TIGIT (Anderson *et al.*, 2016).

En cuanto a cáncer de mama, la presencia de PD1 en los TIL de estos pacientes se asocia con una menor supervivencia general y se correlaciona con factores pronóstico pobres como tamaño del tumor más grande, alta clasificación histológica y tipos triple negativos (Muenst *et al.*, 2013; Ghebeh *et al.*, 2006). Además, la expresión de PD1 sobre las células T CD8 de sangre periférica es mayor en las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales, en comparación con las pacientes que presentan lesiones benignas en mama (Poschke *et al.*, 2012). Igualmente, el porcentaje de linfocitos T CTLA4+ de sangre periférica es mayor en pacientes con cáncer de mama en comparación con individuos sanos y presentan una pobre proliferación al ser estimulados con PHA (Mao *et al.*, 2010). Recientemente, se reportó la expresión de TIM3, LAG3 y TIGIT en las células T de pacientes con cáncer de mama, de los cuales, TIM3 ha sido el receptor inhibidor más ampliamente estudiado en pacientes con cáncer (Burugu *et al.*, 2018; Burugus *et al.*, 2017; Tian, 2018). La presencia de TIL TIM3+ en tumores tempranos de cáncer de mama se asocia con una mayor supervivencia específica y se relaciona con factores pronóstico pobres como menor edad al presentar la enfermedad, mayor grado histológico, ausencia de receptores hormonales y alto índice de proliferación (Burugu *et al.*, 2018).

Aunque los mecanismos moleculares por los que los receptores inhibidores controlan el agotamiento de las células T no han sido totalmente descritos, existen varios mecanismos por los cuales los receptores de inhibición podrían regular la función de las células T: secuestro de ligandos de receptores co-estimuladores, reclutamiento de fosfatasa intracelulares e inducción de genes que codifican proteínas involucradas en la inhibición de las funciones inmunes (Wherry, 2011; Thaventhiran *et al.*, 2012).

Aparte de los receptores inhibidores de la superficie celular, los factores solubles también influyen en el agotamiento de las células T. Estos incluyen citocinas como IL-10, TGF- $\beta$ , IFN tipo I e IL-21 (Wherry, 2011; Wherry *et al.*, 2015). Se ha visto que el bloqueo de IL-10 mediante anticuerpos restaura la función de las células T y mejora el control viral, durante infecciones virales crónicas, mostrando que IL-10 promueve la formación de células exhaustas. A pesar de la evidencia de que el bloqueo de IL-10 revierte el agotamiento, los eventos moleculares de la señalización de IL-10 que causan el agotamiento de las células TCD8 no se han definido con precisión (Wherry, 2011). En cuanto a TGF- $\beta$  en un modelo murino en el que utilizaron la cepa crónica del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) descubrieron que la atenuación selectiva de la ruta del TGF- $\beta$  sobre las células T

disminuye la expresión de la proteína pro-apotótica BIM, aumenta la supervivencia y el número de células T CD8 específicas del virus y que las células T muestran una citotoxicidad potenciada, aumento de la producción de citocinas antivirales y disminución de las moléculas inhibitoras, PD1 e IL-10. Sin embargo, mientras que el efecto de TGF- $\beta$  sobre el número de células T CD8 y la supervivencia es intrínseco a las células, su impacto sobre la función de las células T CD8 y la expresión de PD1 es indirecto o extrínseco a la célula, relacionado con la eliminación rápida de LCMV (Tinoco *et al.*, 2009). Los interferones tipo I también han sido implicados en el agotamiento de las células T, ya que se ha visto que en ratones trasplantados subcutáneamente con una línea celular de carcinoma de colon (MC38) tratados diariamente por 11 días con una inyección de INF $\alpha$  se induce un aumento en la frecuencia de células PD1+ dentro de los linfocitos T CD8 infiltrados en tumor y en la expresión de PD1 (Terawaki *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha descrito que la ausencia de IL-21 o de su receptor no tiene un impacto significativo en la respuesta primaria de las células T CD8 inducidas después de la infección con la clona 13 del virus LCMV, sin embargo, subsecuentemente las células específicas de virus pierden su habilidad para producir IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 y también muestran una alta expresión de PD1 (Yi *et al.*, 2010).

Asimismo, las citocinas de la cadena  $\gamma$  común IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21, que tienen funciones clave en la expansión y supervivencia de las células T, también pueden inducir la expresión de PD1 y TIM3 en las células T (Francisco *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2017). Las células T reguladoras también participan en la regulación del agotamiento de las células T, sin embargo, no está claro cómo pueden afectar el desarrollo de células T CD8 exhaustas y si las Treg pueden causar directamente el agotamiento de las células T CD8 o si la supresión de las funciones efectoras y la persistencia del patógeno resultante refuerzan el camino hacia el agotamiento (Wherry, 2011; Wherry *et al.*, 2015).

En resumen, el agotamiento de las células T es un estado de disfunción de estas células que se desarrolla bajo condiciones de persistencia del antígeno (estimulación antigénica crónica) causada por infecciones crónicas por varios patógenos crónicos y desarrollo de cáncer (Jin *et al.*, 2011). Se caracteriza por la pérdida progresiva y jerárquica de la función efectora (producción de IL-2, alta capacidad proliferativa, actividad citotóxica, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ), aumento sostenido de la expresión de receptores inhibidores como PD1, CTLA4 y TIM3, niveles altos de CD69, niveles bajos de CD127, un estado transcripcional distinto del de las células T efectoras o de memoria funcionales y una falla en la adquisición de una respuesta homeostática de célula T de memoria independiente de antígeno y que puede culminar en la eliminación de las células T específicas de antígeno (Yi *et al.*, 2010; Wherry, 2011; Wherry *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2015). Las células T exhaustas no son inertes, estas células retienen funciones sub-óptimas pero cruciales que limitan la replicación de patógenos o el progreso del tumor. En situaciones de infección crónica donde puede producirse inmunopatología, el agotamiento de las células T puede servir como un mecanismo para proteger contra el daño tisular. En este contexto, los virus o tumores que no pueden ser completamente erradicados, al menos son contenidos a niveles bajos, lo cual podría ser el factor evolutivo del agotamiento de las células T (Wherry, 2011).

### 1.6.1. PD1, CTLA4, TIM3, CD69 y CD127

#### PD1

PD1 es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28 y es una proteína transmembranal de tipo I de 288 aminoácidos (aa) compuesta por un dominio de la superfamilia de inmunoglobulina (IgV), un tallo 20 aa, un dominio transmembranal y un dominio intracelular de aproximadamente 95 residuos que contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) así como un motivo de cambio del inmunorreceptor basado en tirosina (ITSM) (Keir *et al.*, 2008; Buchbinder *et al.*, 2016). PD1 se expresa en células T activadas, timocitos en maduración, células B, células NK, células NKT, monocitos, células dendríticas (DC) (Keir *et al.*, 2008; Sharpe *et al.*, 2018). PD1 regula la activación de las células T a través de la unión de sus ligandos; el ligando de muerte programado 1 (PD-L1) y el ligando de muerte programado 2 (PD-L2) (Sharpe *et al.*, 2018).

PD1 no se expresa en las células T Naïve, pero se expresa en todas las células T durante la activación mediada por antígeno inicial a través del TCR. Si el antígeno activador se elimina de manera aguda, los niveles de expresión de PD1 disminuyen en las células T que responden. Si el antígeno no se elimina (durante infecciones crónicas y cáncer), la expresión de PD1 permanece alta y sostenida. Varios factores de transcripción regulan la expresión de PD1 en células T activadas por antígeno, incluido el factor nuclear de células T activadas 1, citoplásmico (NFATC1), proteína de la caja de Forkhead O1 (FOXO1) T-bet y proteína de maduración inducida por linfocito B1 (BLIMP). Aunque el regulador más importante de la expresión de PD1 en células T es la unión al TCR, los mecanismos independientes de TCR también regulan PD1 (Sharpe *et al.*, 2018).

#### Funciones de PD1

Durante la infección aguda:

PD1 desempeña un papel en el ajuste fino de las respuestas de las células T efectoras, mitigando la sobre activación, limitando la inmunopatología y regulando la formación de células T de memoria y el retorno a la homeostasis tisular (Sharpe *et al.*, 2018).

Regula la diferenciación y las respuestas de las células T de memoria. Experimentos en ratones quiméricos mixtos de médula ósea infectados con virus vaccinia demostraron que en comparación con las células T silvestres, las células T deficientes en PD1 expresaban niveles más altos de receptor de quimiocina CC62L y CCR7, inclinándose hacia un fenotipo de células T de memoria central (Sharpe *et al.*, 2018).

Durante la progresión del cáncer:

PD1 puede inhibir las funciones efectoras de las células T y promover la disfunción de las células T (células exhaustas), lo que contribuye a la resistencia adaptativa (Sharpe *et al.*, 2018).

Durante el desarrollo de la autoinmunidad:

Desempeña papeles cruciales en la tolerancia de las células T centrales y periféricas, lo que ayuda a la protección de los tejidos propios de las respuestas autoinmunes:

- Durante el desarrollo de las células T en el timo, la señalización de PD1 regula el umbral de señalización de TCR durante la selección positiva; en consecuencia, la pérdida de señalización de PD1 en esta etapa da como resultado más células T doblemente positivas. PD1 inhibe la selección positiva mediada por TCR a través del ligando PD-L1. Ratones transgénicos que constitutivamente sobre expresan PD1 en los timocitos CD4+CD8+ muestran defectos en la selección positiva *in vivo*. La co-unión del TCR y PD1 en los timocitos CD4+CD8+ con un anticuerpo monoclonal agonista de PD1, inhibe la activación de ERK y la sobre expresión de Bcl2, los cuales son mediadores esenciales para la selección positiva (Sharpe *et al.*, 2018; Keir *et al.*, 2005).
- PD1 frena la activación, proliferación y función de las células T autorreactivas y regula la expresión del receptor de quimiocina por estas células. En un modelo murino encontraron que la deficiencia de PD1 incrementa la expresión del receptor de quimiocina CXCR3, receptor asociado con la migración de Th1 a las islas del páncreas por la quimiocina CXCL10 durante la diabetes tipo1 (Sharpe *et al.*, 2018; Pauken *et al.*, 2013).
- Las perlas recubiertas con PD-L1 inducen células Treg *in vitro*, lo que indica que PD-L1 regula el desarrollo de las células Treg. Además, PD-L1 aumenta y mantiene la expresión de Foxp3 y la función supresora de las células Treg. Por lo tanto, PD-L1 puede inhibir las respuestas de las células T al promover tanto la inducción como el mantenimiento de las células Treg (Francisco *et al.*, 2009).

En el metabolismo de células T:

Existe evidencia de una conexión entre la señalización PD1 y la actividad metabólica en las células T. Durante la activación de las células T, el cambio de la fosforilación oxidativa a la glucólisis aeróbica permite que las células T efectoras cumplan con sus requerimientos de energía para la proliferación y la diferenciación. La señalización PD1 puede modular la reprogramación metabólica durante la activación inicial de las células T, inhibiendo la regulación al alza del metabolismo de la glucosa y la glutamina que es impulsada por el TCR y la señalización CD28. Además, la señalización de PD1 puede promover la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos en las células T CD4. Teniendo en cuenta que la competencia metabólica en el microambiente tumoral puede impulsar la progresión tumoral al inducir un estado hiporreactivo de células T a través de la privación de glucosa (Sharpe *et al.*, 2018).

La unión de PD1 a PDL-1 (B7-H1) o PD-L2 (B7-DC), inhibe la proliferación de células T, producción de IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 y reduce la supervivencia de las células T (Buchbinder *et al.*, 2016). PD1 puede ejercer sus efectos sobre la supervivencia directamente inhibiendo los

eventos de activación temprana que son regulados positivamente por CD28 o indirectamente a través de IL-2. Tanto CD28 como IL-2 promueven la expansión celular y la supervivencia a través de los efectos sobre los genes anti apoptóticos, del ciclo celular y de las citocinas. Existe una fuerte evidencia de que la activación de PD1 por su ligando inhibe la inducción del factor de supervivencia celular Bcl-XI (Keir *et al.*, 2008).

### Ligandos de PD1

PD-L1 y PDL-2 son miembros de la familia B7 y son proteínas transmembranales tipo I, compuestos por dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgV) e (IgC) (Keir *et al.*, 2008; Chen, 2004).

PD-L1 es expresada por muchos tipos diferentes de células y se encuentra tanto en células hematopoyéticas, incluyendo células T, células B, DC y macrófagos, como en células no hematopoyéticas, incluyendo células endoteliales vasculares y estromales, islotes pancreáticos, sincitiotroblastos placentarios y queratinocitos. Se ha demostrado que las señales proinflamatorias inducen niveles más altos de expresión de PD-L1 (Sharpe *et al.*, 2018). La expresión de PD-L2 es mucho más restringida, y este ligando se expresa predominantemente en DC, macrófagos y poblaciones de células B. La expresión de PD-L2 es generalmente baja en estado estable, pero de forma similar a PD-L1, es inducida por estímulos inflamatorios (Sharpe *et al.*, 2018).

Tanto PD-L1 como PD-L2 pueden expresarse en células cancerosas, pero PD-L1 se encuentra más comúnmente en estas células. La expresión de PD-L1 a menudo se asocia con respuestas inflamatorias continuas, aunque algunas mutaciones en células cancerosas pueden causar niveles aumentados de PD-L1 en ausencia de niveles altos de inflamación (Sharpe *et al.*, 2018). La capacidad de señalización de PD-L1 y PD-L2 es un área de investigación activa. Las colas intracelulares de PD-L1 y PD-L2 no contienen motivos de señalización conservados. Sin embargo, evidencia sugiere que los ligandos de PD1 pueden conducir la señalización después de su unión con PD1, pero se desconocen los motivos y los mecanismos de señalización involucrados (Sharpe *et al.*, 2018).

Además de interactuar con PD1, PD-L1 y PD-L2 se unen a otras moléculas, las interacciones entre PD-L1-CD80 y PD-L2-RGMB parecen ser generalmente inhibitoras (Sharpe *et al.*, 2018).

Además, la señalización a través de PD-L1 y PD-L2 puede tener otras funciones:

- PD-L1 puede funcionar co-estimulando el crecimiento de las células T CD4 y la secreción de IL-10 sugiriendo que PD-L1 podría estar involucrada en promover una respuesta Th2, esto se observó al estimular las células T con una proteína de fusión de inmunoglobulina (B7-H1Ig), junto con el anticuerpo monoclonal CD3 (Chen, 2004; Dong *et al.*, 2001).
- PD-L1 induce la apoptosis celular, y se ha visto que la estimulación de linfocitos con anti-CD3 y B7-H1Ig, aumenta la expresión de Fas y FasL en las células T, lo que

indica que la interacción de Fas y FasL es un componente de la apoptosis mediada por B7-H1 de las células T activadas (Chen, 2004; Dong *et al.*, 2001).

- La comunicación cruzada o “cross-linking” de PD-L2 en las células dendríticas por un anticuerpo IgM pentamérico (IgM humana derivada de suero 12) resulta en la activación de las células dendríticas (Chen, 2004)

#### Mecanismo de señalización de PD1 en las células T

Para que PD1 mande una señal inhibitoria, el complejo péptido-MHC clase I debe ser presentado por la misma célula que expresa ligandos PD1. PD1 puede inhibir las funciones de las células T mediante el reclutamiento de fosfatasa, incluida SHP2, al ITSM en la cola de PD1. Estas fosfatasas inhiben las rutas de señalización de ZAP70 y fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K)-AKT y RAS. Colectivamente, esto da como resultado una inhibición de los factores de transcripción, como AP-1, NFAT y NF- $\kappa$ B, que son importantes para conducir la activación, proliferación, funciones efectoras y supervivencia de la célula T. Además, PD1 puede inhibir las funciones de las células T aumentando la expresión de factores de transcripción como BATF, que regula negativamente a AP-1 el cual es importante para la diferenciación y ciclo celular de los linfocitos T. Evidencia sugiere que los ligandos de PD1 pueden dirigir la señalización después de su interacción con PD1, pero las colas intracelulares de PD-L1 y PD-L2 no contienen motivos de señalización y los mecanismos implicados son desconocidos. Se ha visto que el bloqueo de PD-L1 en líneas celulares tumorales *in vitro* puede afectar directamente el metabolismo de las células tumorales en la ausencia completa de células T que expresan PD1. En este estudio, la expresión de las células tumorales de las enzimas glucolíticas, la fosforilación de AKT y la captación de glucosa se redujeron después del tratamiento con anticuerpos anti PD-L1 *in vitro* (Sharpe *et al.*, 2018).

#### CTLA-4

CTLA-4 es un miembro inhibitorio de la familia de receptores CD28 y es una proteína transmembranal compuesta por un dominio de la super familia de inmunoglobulina (IgV) (Dong *et al.*, 2001), un dominio transmembranal y una cola citoplásmica de 36 aminoácidos que carece de actividad enzimática intrínseca y carece de un motivo ITIM genuino (Walker *et al.*, 2015). Tiene una afinidad de unión mucho mayor para B7 (CD80 y CD86) que CD28; sin embargo, a diferencia de CD28, la unión de CTLA-4 a B7 no produce una señal estimuladora. Como tal, esta unión competitiva puede evitar la señal co-estimuladora normalmente proporcionada por la unión de CD28: B7. La cantidad relativa de unión de CD28: B7 frente a la unión CTLA-4: B7 determina si una célula T experimentará activación o anergia (Buchbinder *et al.*, 2016). Existen diversas formas de competencia por ligando:

- Las células T activadas expresan tanto CD28 como CTLA-4, estableciendo una competencia intrínseca de las células para el acceso al ligando (Walker *et al.*, 2015).
- Las células T reguladoras (Treg) que expresan CTLA-4 se unen a las células presentadoras de antígeno (APC) y secuestran físicamente los ligandos, esta es una forma de competencia ligando extrínseca, así como la competencia celular, porque

tanto Treg como las células T convencionales (Tconv) están compitiendo por la misma APC simultáneamente. (Walker *et al.*,2015).

- CTLA-4 elimina ligandos de la APC mediante trans-endocitosis, esta es una forma de competencia extrínseca celular que está espacialmente y temporalmente separada de la activación de Tconv. En este modelo, la Treg que expresa CTLA-4 interactúa continuamente con las APC, elimina los ligandos y luego se separa, la APC no puede proporcionar co-estimulación CD28 hasta que se produce la re-expresión del ligando (Walker *et al.*,2015).

Hay que tener en cuenta que la regulación extrínseca celular puede ser llevada a cabo por Tconv y por Treg, aunque con Treg que tiene niveles más altos de CTLA-4 y proporciona una regulación más robusta (Walker *et al.*,2015).

Por otro lado, evidencia sugiere que la unión de CTLA-4 a B7 puede en realidad producir señales inhibitoras que contrarrestan las señales estimuladoras de la unión de CD28: B7 y TCR: MHC. En caso de una señal neta negativa a través de la unión de CTLA-4: B7, la activación completa de las células T se previene mediante la inhibición de la producción de IL-2 y la progresión del ciclo celular. Los mecanismos propuestos para tales señales inhibitoras incluyen la inhibición directa en la sinapsis inmune de TCR, inhibición de CD28 o su ruta de señalización, o aumento de la movilidad de las células T que conduce a una menor capacidad para interactuar con las APC (Buchbinder *et al.*, 2016). Se han propuesto numerosas interacciones moleculares para explicar la señalización inhibitora de CTLA-4 en células T por un lado se ha descrito que CTLA-4 interrumpe la formación de micro cluster de ZAP-70 (Walker *et al.*,2015) y que CTLA-4 aumenta la motilidad de las células T, lo que conduce a una menor capacidad para interactuar con las APC (Waler *et al.*, 2015; Buchbinder *et al.*, 2016). Por otro lado, ha reportado que tras la unión de B7-1 o B7-2, CTLA-4 recluta las fosfatasas SHP2 y PP2A a través del motivo YVKM en su dominio citoplasmático y el reclutamiento de SHP2 da como resultado la atenuación de la señalización de TCR des fosforilando las cadenas zeta de CD3, mientras que el reclutamiento de PP2A da como resultado la desfosforilación de AKT atenuando la vía de activación de las células (Nirscl *et al.*, 2013). Sin embargo, es sorprendente que ninguna de estas vías de señalización propuestas se haya demostrado reproduciblemente hasta el punto de proporcionar algo que se acerque a una plataforma robusta, como se ha logrado para otros receptores de señalización importantes (Walker *et al.*, 2015).

CTLA-4 en sí misma está sujeta a regulación, particularmente por localización dentro de la célula. En células T Naïve CTLA-4 se localiza principalmente en el compartimento intracelular. Las señales estimulantes resultantes de la unión de TCR y CD28: B7 inducen la regulación positiva de CTLA-4 en la superficie celular por exocitosis de vesículas que contienen CTLA-4, el proceso opera en un ciclo de retroalimentación gradual por el cual una señalización de TCR más fuerte provoca más translocación de CTLA-4 a la superficie de la célula (Buchbinder *et al.*, 2016). Sin embargo, Walker y col (2015) proponen un modelo en que el dominio citoplasmático contribuye a la función supresora controlando la cantidad, la localización celular y el tiempo de expresión de CTLA-4 en la membrana. De acuerdo con este modelo, el papel del dominio citoplasmático no es transmitir señales inhibitoras, sino



dirigir el tráfico apropiado de la molécula de CTLA-4. Al hacerlo, el dominio citoplasmático se convierte en un modificador clave de la eficacia de la función CTLA-4. El papel del dominio citoplasmático en la regulación de los patrones de expresión de CTLA-4 es bien conocido. Específicamente, el motivo basado en tirosina YVKM media la endocitosis rápida de la membrana plasmática mediante la interacción con el adaptador de clatrina que activa la proteína 2 (AP-2), la endocitosis probablemente involucra otros motivos porque los mutantes YVKM no son completamente defectuosos en la endocitosis. Se ha sugerido que el motivo de prolina también contribuye a la unión de AP-2 y la secuencia de tirosina C terminal YFIPIN funciona como un adaptador endocítico alternativo (aunque más débil) (Walker *et al.*, 2015).

CTLA-4 también está involucrado en otros aspectos del control inmune. Las células T reguladoras (Tregs) controlan las funciones de las células T efectoras, las cuales son células clave en el mantenimiento de la tolerancia periférica. A diferencia de las células T efectoras, las Tregs expresan constitutivamente CTLA-4, que es importante para sus funciones supresoras. Un mecanismo por el cual se cree que las Treg controlan las células T efectoras es disminuir la expresión de los ligandos B7 en APC mediante la unión de CTLA-4 como se mencionó anteriormente, lo que lleva a una co-estimulación CD28 reducida (Buchbinder *et al.*, 2016). Otro mecanismo supresor de las Treg mediado por la interacción de CTLA-4 con B7 en las células APC es inducción de la producción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por las células dendríticas, la cual cataboliza el triptófano (Vignali *et al.*, 2008), por lo cual su efecto supresor puede ser debido al agotamiento del aminoácido esencial triptófano, que conduce a la inhibición del crecimiento de las células T, y/o apoptosis de las células T inducidas por catabolitos de triptófano (Chen *et al.*, 2004).

### **TIM3**

TIM3 consta de 302 residuos de aminoácidos y pertenece a la súperfamilia de inmunoglobulinas (Ig SF), con un dominio extracelular que consiste en un dominio de inmunoglobulina N-terminal (IgV) distal a la membrana, seguido de un dominio de mucina proximal a la membrana que contiene sitios potenciales para la glicosilación ligada a O. El dominio del tallo que se extiende entre la mucina y el dominio transmembranal tiene sitios para los azúcares ligados a N, que es seguido por un dominio transmembranal y una cola citoplasmática (Das *et al.*, 2017).

La cola citoplasmática de TIM3 carece de ITIM o ITSM, los clásicos motivos inhibidores y de cambio encontrados en otros receptores inhibidores, pero contiene una región conservada de cinco residuos de tirosina, dos de los cuales (Tyr 265, 272 en humanos) son importantes para el acoplamiento de las vías de señalización río abajo. Las secuencias peptídicas que rodean a estos dos residuos de tirosina funcionan como motivos de unión al dominio SH2, donde se encuentran varias cinasas que contienen el dominio SH2, incluidas Fyn, Lck, PI3K, p85 e Itk. Muchas de estas moléculas son componentes clave de la vía de señalización del receptor de células T (TCR), lo que indica una relación funcional entre TIM3 y la vía TCR (Das *et al.*, 2017).

TIM3 se expresa en un subconjunto de células T CD4 activadas, en células Th1 diferenciadas, en las células T CD8, en niveles más bajos en células Th17 (Freeman *et al.*, 2010) y en T reguladoras (Gorman *et al.*, 2014). TIM-3 también se expresa en células del sistema inmune innato que incluyen células cebadas de ratón, subpoblaciones de macrófagos y DC, células NK y NKT, y monocitos humanos. La expresión de TIM-3 está regulada por el factor de transcripción T-bet, ya que los ratones deficientes en T-bet muestran niveles reducidos de expresión de TIM3 (Freeman *et al.*, 2010).

## Ligandos de TIM3

### Galectina 9

Es una lectina tipo S (Catakovic *et al.*, 2017), una proteína soluble que contiene dos dominios de reconocimiento de carbohidratos unidos en tándem, reconoce específicamente la estructura de las cadenas de azúcar unidas a N en el dominio TIM3 IgV (Gorman *et al.*, 2014). La interacción entre galectina 9 y TIM3 desencadena el flujo de calcio intracelular, muerte celular y agregación en las células Th1 efectoras. Del mismo modo, galectina 9 también induce la muerte celular en células T CD8 TIM3+ infiltradas en tumor en cáncer de colon. Sin embargo, no todas las interacciones TIM3-galectina 9 resultan en muerte celular, por ejemplo, la galectina 9 aumenta la producción de IFN $\gamma$  mediada por TIM3 en células NK (Das *et al.*, 2017).

Galectina 9 se expresa en las células inmunes y en el epitelio del tracto gastrointestinal. La expresión de galectina 9 es particularmente alta en células cebadas y también se encuentra en células T, células B, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos. La producción de galectina 9 es regulada positivamente por IFN $\gamma$  (Freeman *et al.*, 2010).

La interacción TIM3-galectina 9 también puede transducir señalización inversa. Estudios en un modelo de tuberculosis (TB) de ratón demostraron que TIM3 es crítico para la inducción de IL-1 $\beta$  y para potenciar la actividad anti micobacteriana en macrófagos a través de un mecanismo dependiente de galectina 9 tanto en células de ratón como humanas (Das *et al.*, 2017). La unión de TIM3 a Galectina 9 conduce a la supresión de las respuestas inmunes dependientes de Th1 y la inyección de galectina 9 tiene varios efectos distintos sobre el sistema inmune, incluyendo la expansión de las células T reguladoras (Treg) y las células supresoras mieloides (Gorman *et al.*, 2014). Debido a que la unión de galectina 9 es relativamente promiscua, es probable que galectina 9 tenga múltiples moléculas diana. La deficiencia de TIM3 solo reduce la muerte de Th1 mediada por galectina 9 en aproximadamente un 40%, lo que sugiere que algunos de los efectos de la administración in vivo de galectina-9 pueden estar mediados por galectina 9 uniéndose a otros receptores distintos de TIM3 (Freeman *et al.*, 2010).

## Ceacam1

Ceacam1 (Molécula de adhesión celular de antígeno carcinoembrionario 1) tiene un peso molecular de alrededor de 60 kDa. Los dominios de IgV de membrana de Ceacam1 y TIM3 comparten similitudes estructurales e interactúan a lo largo de su interface FG- CC, una estructura altamente conservada que se predijo como un sitio de unión a ligando. La co-expresión de Ceacam1 es necesaria para la glicosilación de TIM3 y la estabilidad de la proteína, y la función inhibidora de TIM3 está comprometida en ausencia de su expresión (Das *et al.*, 2017).

Galectina 9 y Ceacam1 se unen a diferentes regiones en el dominio IgV de TIM3 y las interacciones Ceacam1-TIM3 y galectina 9-TIM3 dan como resultado señalizaciones similares, en las cuales Bat3, un regulador inhibidor de la vía de señalización de TIM3, se libera de su sitio de unión en la cola citoplasmática TIM3. Por lo tanto, estos dos ligandos podrían tener efectos cooperativos en la regulación de la señalización de TIM3 (Das *et al.*, 2017).

## HMGB1

HMGB1 (Caja de grupo 1 de alta movilidad) es una proteína de patrón molecular asociada al daño. HMGB1 se une al ADN liberado de las células que están muriendo y facilita su entrega a las células innatas mediante su unión a receptores RAGE y Toll-like (TLR 2, 4 y 9), desencadenando así la activación celular innata y la producción de citocinas proinflamatorias. La unión de TIM3 a HMGB1 puede interferir con este proceso, suprimiendo así la activación de la respuesta inmune innata (Anderson *et al.*, 2016). En las DC, HMGB1 juega un papel crítico en el transporte de ácidos nucleicos en vesículas endosomales, que es un paso clave para que las DCs detecten factores de estrés derivados del tumor o patrones moleculares asociados a patógenos y para generar respuestas inmunes protectoras a tumores o infecciones de patógenos. En microambientes tumorales, las DC infiltradas en tumor expresan niveles más altos de TIM3 que las DC en tejidos normales. TIM3 se une a HMGB1 para bloquear el transporte de ácidos nucleicos en los endosomas, suprimiendo de ese modo las respuestas inmunes innatas mediadas por receptores de reconocimiento de patrones a los ácidos nucleicos derivados de tumor. Curiosamente, el epítipo de unión a HMGB1 en TIM3 está superpuesto en gran medida con epítipos de unión a Ceacam1 en la región de asa FG-CC en el dominio de IgV de TIM3. En humanos, E62 en el bucle FG-CC es el residuo de aminoácido esencial para la interacción con HMGB1 y Ceacam1, lo que plantea la cuestión de la posible unión competitiva a TIM3 entre HMGB1 y Ceacam1 (Das *et al.*, 2017).

Un estudio informó que las células T CD8<sup>+</sup> TIM3<sup>+</sup> activadas en hígado durante la infección por adenovirus exhibieron una función supresora, ya que TIM3 actuó secuestrando HMGB1, evitando que HMGB1 activara células dendríticas y por ende a las células T CD8<sup>+</sup> hepáticas (Das *et al.*, 2017).

## PtdSer

A diferencia de todos los demás ligandos de TIM3, la fosfatidilserina (PtdSer) es un ligando no proteico para TIM3. PtdSer se une a los bucles FG-CC 'del dominio TIM3 IgV (Das *et al.*, 2017).

La unión de PtdSer a las proteínas TIM está involucrada en la fagocitosis de células apoptóticas. Se desconoce la relevancia biológica de la interacción TIM3-PtdSer en las células T, ya que las células T no desempeñan un papel en la eliminación de los cuerpos apoptóticos. Sin embargo, la interacción de TIM3 con PtdSer puede dar como resultado la inducción de IL-10 en células T, ya que se ha demostrado que IL-10 coexpresa con células T que expresan TIM3 (Das *et al.*, 2017).

Debido a la superposición de sitios de unión en el bucle FG-CC 'en el dominio TIM3 IgV, es importante comprender cómo Ceacam1, HMGB1 y PtdSer coordinan sus interacciones con TIM3 y regulan la función de tipos específicos de las células inmunes (Das *et al.*, 2017).

## Funciones e importancia de TIM3

Nuevos hallazgos plantean la posibilidad de que la función de TIM3 esté influenciada por el contexto y que TIM3 pueda inhibir o promover respuestas de células T CD8 dependiendo del microbio involucrado y las características de la respuesta inmune provocada por la infección (Gorman *et al.*, 2014). En un modelo de ratones TIM3 *Knock out* (KO), hay menos células T que se activan inicialmente, con una respuesta de memoria deficiente tanto en el entorno agudo como en el crónico (Avery *et al.*, 2018). En entornos que implican estimulación crónica, generalmente la expresión de TIM3 sirve como un marcador para las células T CD8 que han entrado en un estado disfuncional o agotado. Sin embargo, algunos estudios han sugerido que TIM3 no siempre marca las células T CD8 agotadas en contextos que involucran estimulación crónica (Qui *et al.*, 2012; Meggyes *et al.*, 2014; Gorman *et al.*, 2014). Hay evidencia de que las células T CD8+TIM3+ de pacientes infectados con *Mycobacterium tuberculosis* aumentaron las respuestas citotóxicas y la capacidad de producción de citocinas en comparación con las células T CD8+TIM3- (Qui *et al.*, 2012) y que en la interface materno fetal, las células T CD8 TIM3+ no muestran agotamiento, en cambio, son altamente proliferativas y producen grandes cantidades de citocinas antiinflamatorias (Meggyes *et al.*, 2014).

La expresión de TIM3 en células aloreactivas T CD4+ y CD8+ ayuda a suprimir las respuestas aloinmunes y a promover la tolerancia inmunológica en diferentes modelos de trasplante. Se ha observado la regulación previa de TIM3 en células T CD8 deciduales y se ha sugerido que desempeña un papel clave en la mediación de la tolerancia inmune materno-fetal (Das *et al.*, 2017). La expresión de TIM3 en células T también juega un papel crítico en la generación de MDSCs que se requieren para mantener el entorno inmunosupresor. La expresión transgénica de TIM3 en TIL (linfocitos infiltrados en tumor) parece tener un papel directo en la diferenciación de MDSCs en el microambiente tumoral para suprimir la inmunidad antitumoral (Das *et al.*, 2017; Anderson *et al.*, 2016). Por otro lado, las células

Treg TIM3<sup>+</sup> son funcionalmente superiores a las células Treg TIM3<sup>-</sup> en ensayos de supresión *in vitro*, y exhiben una expresión más robusta de IL-10, CD39, CD73 y TGFβ, y también expresan altos niveles de otros receptores inhibidores como CTLA4, Lag3 y PD1. TIM3 marca una población de células Treg con función supresora mejorada. Sin embargo, TIM3 raramente se encuentra en las células Treg de sangre periférica, principalmente se expresa en los Treg infiltrados en tumor. Los Treg TIM3<sup>+</sup> se acumulan en el tejido tumoral antes de la aparición de las células T CD8 exhaustas y su depleción en esta etapa interfiere con el agotamiento de las T CD8 (Das *et al.*, 2017).

#### Mecanismos de señalización de TIM3 en las células T

Los estudios destinados a establecer vínculos entre TIM3 y las vías de señalización intracelulares son algo conflictivos, y algunos sugieren un papel inhibitorio para TIM3 y otros sugieren un rol estimulante (Das *et al.*, 2017).

El TIM3 humano contiene cinco residuos de tirosina conservados, y la fosforilación de dos, de los cuales, Y265, 272 (Y256 e Y263 en ratones) han demostrado ser críticamente importantes para el acoplamiento a vías de señalización *in vivo* (Das *et al.*, 2017).

Un estudio en células Jurkat demostró que la expresión ectópica de TIM3 en éstas seguida por la unión de TCR y de CD28 conduce al aumento de la fosforilación de los residuos Y256 e Y 263 de TIM3 mediada por Fyn o Lck. La fosforilación de Y256 e Y263 permite el reclutamiento de una o más proteínas que contienen el dominio SH2, incluyendo la p85 de PI3K y PLC-γ1 a la cola fosforilada de TIM3. La interacción de TIM3 con los componentes de la vía de señalización TCR, que incluye Zap 70 y SLP-76, aumenta aún más la activación de NFAT y NF-κB, lo que lleva a un aumento de la señalización de las células T. También se ha demostrado que la fosforilación específica mediada por ITK de Y265 de TIM3 ocurre en presencia de galectina 9, probablemente a través de una interacción receptor-ligando. La fosforilación de Y265, que se localiza en un motivo de unión al dominio SH2 altamente conservado, podría resultar en el reclutamiento de proteínas que contienen el dominio SH2 y desencadenar en eventos de señalización *in vivo*, que pueden incluir reguladores negativos de la señalización de citocinas en condiciones en las que TIM3 desempeña un papel inmunosupresor, regulando así la función de las células T que expresan TIM3 (Das *et al.*, 2017).

Una investigación posterior demostró que Y256 e Y263 son críticos para la unión de la transcripción 3 asociada a HLA-B (Bat3) a la cola C-terminal de TIM3. Bat3 está unido a TIM3 y bloquea los sitios de unión del dominio SH2 en la cola de TIM3. En este estado, Bat3 recluta la forma catalíticamente activa de Lck, formando así un complejo molecular intracelular con TIM3 que preserva y potencialmente promueve la señalización de las células T y reprime la muerte celular y el agotamiento mediados por TIM3. Las interacciones entre TIM3 con sus ligandos, galectina 9 y Ceacam-1, da como resultado la fosforilación de Y256 e Y263 y la liberación de Bat3 de la cola TIM3, promoviendo así la función inhibitoria de las células T mediadas por TIM3 permitiendo la unión de Src cinasas que contienen el dominio SH2 y la posterior regulación de la señalización de TCR. Curiosamente, Fyn se une a la

misma región en la cola de TIM3 que Bat3. Fyn ha sido implicado en la inducción de anergia de células T y se sabe que es una cinasa clave para activar la fosfoproteína asociada a micro dominios de glicoesfingolípidos (PAG), que recluta Csk para suprimir la función Lck. Debido a que Fyn y Bat3 se unen en el mismo dominio de la cola citoplasmática de TIM3, un cambio molecular entre TIM3- Bat3 y TIM3- Fyn podría desencadenar el cambio de la función de TIM3 de permitir la señalización TCR a inhibirla. De acuerdo con estos datos, se ha demostrado que la pérdida de Bat3 resulta en la desfosforilación y degradación de las cadenas zeta de TCR. Por lo tanto, la función de TIM3 se ve alterada por la unión del ligando a través de la regulación de la unión de Bat3 a la cola citoplasmática de Tim-3. La unión a ligando libera Bat3, evitando el reclutamiento de Lck activado y permitiendo la fosforilación de Y256 e Y263 por Fyn u otras cinasas, y la señalización de TIM3 para promover la inhibición de las células T (Das *et al.*, 2017; Anderson *et al.*, 2016).

## CD69

CD69 es una proteína homodímera unida por disulfuro con dos subunidades glicosiladas diferencialmente. Cada subunidad consiste en un dominio de lectina extracelular de tipo C (CTLD) conectado con una región transmembrana de extensión única seguida de una cola citoplasmática corta (Cibrian *et al.*, 2017). La expresión de CD69 es inducida rápidamente en la mayoría de los leucocitos (linfocitos T y B, células NK, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos) después de su activación (Radulovic *et al.*, 2015). La expresión de CD69 se induce rápidamente en la superficie de los linfocitos T después de la unión de su TCR, de su estimulación con IFN  $\alpha/\beta$  y TNF $\alpha$  y de su estimulación mitogénica policlonal. La expresión de la proteína CD69 se puede detectar tan pronto como 2-3 horas después de la estimulación (Cibrian *et al.*, 2017) pero su expresión es transitoria ya que alcanza un máximo de 18 a 24 h después de la estimulación y luego disminuye (Radulovic *et al.*, 2015). La aparición de CD69 en la membrana plasmática de las células activadas es más rápida que la de CD25, por lo que es usada como un marcador muy temprano de la activación de linfocitos. Además, el CD69 es un marcador típico de las células T de memoria residentes en tejido periférico (TRM). La expresión de CD69 aumenta en las células precursoras de TRM después de la entrada en los tejidos periféricos, donde bloquea la función de S1P1 (receptor 1 de esfingosina 1 fosfato), promoviendo la retención de las células en el tejido (Cibrian *et al.*, 2017).

### Ligandos de CD69

Los ligandos identificados de CD69 son la proteína Galectina-1 (Gal-1), el complejo S100A8/S100A9, el receptor 1 de esfingosina 1 fosfato (S1P1) y el complejo transportador heteromérico de aminoácidos LAT1-CD98 (Cibrian *et al.*, 2017)

Gal-1 es una proteína de unión a carbohidratos expresada en células dendríticas y macrófagos. La unión de CD69 a Gal-1 en las células dendríticas modula negativamente la diferenciación *in vitro* de las células Th17, que podrían controlar las respuestas inflamatorias *in vivo*. Gal-1 también aumenta la secreción de IL-10 en las células T (Cibrian *et al.*, 2017)

El complejo S100A8/S100A9 se expresa de forma constitutiva y es secretada por células mieloides, incluyendo neutrófilos, monocitos y células dendríticas. Este complejo promueve la diferenciación de las células Treg (Lin *et al.*, 2015)

El S1P1 se expresa ampliamente en el cuerpo, en particular en las células endoteliales, el cerebro y el corazón, y también en las células del sistema inmunológico como los linfocitos T (Allende *et al.*, 2004). Este ligando regula el egreso de las células T de los ganglios linfáticos (Cibrian *et al.*, 2017).

El complejo transportador heteromérico de aminoácidos LAT1-CD98 es un receptor de captación de aminoácidos aromáticos como el L-Triptófano (L-Trp) (Cibrian *et al.*, 2016). El CD69 se asocia con LAT1-CD98 en la membrana plasmática de las células T activadas y esta asociación aumenta la expresión de LAT1 en la superficie de las células T, la captación de L-triptófano (L-Trp) y la cantidad intracelular de activadores del receptor de hidrocarburos arilo (AHR) derivados de L-Trp. (Cibrian *et al.*, 2016)

### Funciones de CD69

CD69 es un importante regulador de las respuestas inmunes. Aunque el papel preciso de la expresión de CD69 en la función de las células inmunitarias aún no se ha dilucidado, la evidencia experimental acumulada ha revelado que CD69 puede controlar la diferenciación de las células Th, así como la localización y migración de linfocitos activados (Cibrian *et al.*, 2017).

### Diferenciación de las células Th

CD69 contrarresta la señalización S1P1 que favorece la polarización Th1/Th17. La expresión de CD69 en linfocitos activados previene la señalización inducida por S1P1 al promover la internalización y degradación del receptor y al aumentar la vía JAK3 / pSTAT5, que contrarresta la expresión de IL-17 inducida por STAT3 y promueve el desarrollo de Treg (Cibrian *et al.*, 2017).

El 50% de las células Treg que residen en los órganos linfoides expresan CD69 y las células Treg FOXP3+ CD69+ expresaron niveles más altos en la superficie de los marcadores asociados a la supresión y mostraron una actividad supresora mejorada en comparación con las células Treg FOXP3+ CD69- en un modelo de ratón de tolerancia inmune pulmonar inducida por antígenos inocuos. Además, un informe reciente mostró que la expresión de CD69 es necesaria para el desarrollo de las células Treg del timo (Cibrian *et al.*, 2017).

La asociación de CD69 con el complejo transportador de aminoácidos LAT1-CD98 en la membrana plasmática de las células T promueve el desarrollo de Th1 y Th17 y previene la diferenciación de las células Treg. CD69 aumenta el transporte de L-Trp a través de LAT1-CD98 y favorece la activación de AHR a través de la unión del ligando FICZ derivado de L-Trp. La activación de la actividad transcripcional de AHR favorece la secreción de IL-22. La captación de aminoácidos a través del complejo CD69 /LAT1-D98 también favorece la

activación de mTOR, que promueve el desarrollo de Th1 y Th17 y previene la diferenciación de células Treg (Cibrian *et al.*, 2017).

Como podemos observar las asociaciones laterales de CD69 con S1P1 y el transportador de aminoácidos LAT1-CD98 ejercen efectos opuestos en la diferenciación de linfocitos T (Cibrian *et al.*, 2017).

#### Localización y migración de linfocitos activados

La salida de células T de los órganos linfoides está mediada por la expresión de S1P1 y su interacción con la esfingosina 1 fosfato (S1P) del torrente sanguíneo. S1P es un metabolito esfingolípido que estimula diversas vías de señalización, incluida la movilización de calcio, la polimerización de actina, la quimiotaxis / migración y la supervivencia. S1P se mantiene a baja concentración en el timo y los órganos linfoides y está en alta concentración en sangre (Cibrian *et al.*, 2017).

El aumento de la expresión de CD69 en la superficie de las células T activadas promueve la internalización y degradación del receptor S1P1 que causa la retención de células T en los ganglios linfáticos y en todo el cuerpo para favorecer su activación completa. Por esta razón, se encuentran pocas células T CD69+ en la circulación en comparación con los ganglios linfáticos o los tejidos inflamados, aunque aparecen en algunas afecciones inflamatorias crónicas. CD69 se expresa en leucocitos infiltrados en sitios inflamados en varias afecciones inflamatorias crónicas humanas, por ejemplo, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, asma alérgica y dermatitis atópica (Cibrian *et al.*, 2017). Aunque este patrón de expresión de CD69 sugirió inicialmente que esta molécula ejerce un efecto patógeno proinflamatorio, vale la pena señalar que la mayoría de los informes sobre CD69 en humanos sugieren que su expresión *in vivo* refleja una respuesta inmune en curso, asociada con daño tisular. Además, varios informes recientes indican que este receptor es un elemento importante de la maquinaria inmunorreguladora, destinado a limitar el fenómeno inflamatorio y el daño tisular. (Cibrian *et al.*, 2017; González-Amaro *et al.*, 2013).

La existencia de células reguladoras CD4+ CD69+ ha sido confirmada en humanos por Gandhi y col. (2010), quien caracterizó un subconjunto pequeño de células CD4+CD69+Foxp3-TGFβ+ en sangre periférica. Estas células muestran una expresión variable de CD25, su diferenciación es independiente de Foxp3 y son capaces de ejercer una fuerte función inmunosupresora *in vitro*, que está mediada por TGFβ e IL-10 (González-Amaro *et al.*, 2013). En diferentes modelos de enfermedades murinas, como asma, artritis y miocarditis la ausencia de expresión de CD69 afectó profundamente el curso de la enfermedad al exacerbar su gravedad (Radulovic *et al.*, 2015).

#### **CD127**

El receptor de IL-7 (IL-7R) está compuesto por dos cadenas: la cadena α (IL-7Rα), también conocida como CD127 y el receptor de citocinas común la cadena γ (γc) también conocida como CD132. Los dominios intracelulares de CD127 y CD132 están unidos a las tirosinas



cinastas JAK1 y JAK3, respectivamente (Mazzucchelli *et al.*, 2007). El IL-7R se expresa en las células T, NK, B y monocitos (Fry *et al.*, 2002).

La producción de IL-7 se ha detectado en múltiples tejidos del estroma, incluyendo células del timo y médula ósea. Los sitios adicionales de producción de IL-7 incluyen epitelio intestinal, queratinocitos, hígado fetal, hígado adulto, células dendríticas, y células dendríticas foliculares (Fry *et al.*, 2002). La producción IL7 por células estromales parece ocurrir a una tasa constitutiva fija y no está influenciada por estímulos extrínsecos como la retroalimentación de IL-7 o el tamaño del conjunto de linfocitos. En un sujeto con un compartimiento linfático completo se cree que la cantidad de IL-7 es suficiente para mantener la supervivencia de un número finito de células T; el exceso de células T no sobreviviría. Después de agotar el compartimiento linfoide, una célula T introducida en el nicho se encontraría con abundante IL-7 y proliferaría hasta que se restableciera el equilibrio (Mazzucchelli *et al.*, 2007).

Las células T Naïve requieren de IL-7 para su supervivencia y proliferación homeostática (Mazzucchelli *et al.*, 2007). Igualmente, la homeostasis de las células T de memoria está regulada por una combinación de IL-7 e IL-15, las cuales apoyan la viabilidad celular e inducen la proliferación homeostática basal (Surh *et al.*, 2008). En general, se ha encontrado que IL-7 es importante para la generación y persistencia de células T de memoria (Mazzucchelli *et al.*, 2007). La ausencia de niveles fisiológicos de IL-7 conduce a una reducción significativa en el número de células T de memoria generadas después de un estímulo antigénico primario *in vivo* (Fry *et al.*, 2002).

Las respuestas de las células T a IL-7 parecen estar altamente reguladas a través de la modulación de CD127, el cual después de su unión con la IL-7, se dimeriza con la cadena CD132, que también tiene sitios de unión para IL-7 (Surh *et al.*, 2008). La señalización de IL-7R se inicia cuando IL-7 se une a CD127 y a CD132, reuniendo a JAK1 y JAK3, que se fosforilan mutuamente entre sí, aumentando su actividad cinasa. Las proteínas JAK entonces fosforilan a CD127, creando un sitio de acoplamiento para varias moléculas de señalización. STAT5 (transductor de señal y activador de la transcripción 5), se fosforila después de ser reclutado a CD127. El STAT5 fosforilado luego dimeriza y se transloca al núcleo donde induce la transcripción de genes.

Como se mencionó anteriormente, una consecuencia significativa de la señalización de IL-7R es el mantenimiento de la supervivencia celular al promover un equilibrio favorable de los miembros de la familia BCL-2 (linfoma de células B2) al aumentar la expresión de las proteínas de supervivencia BCL-2 y MCL1, y redistribuyendo las proteínas de muerte celular BAX (proteína X asociada a BCL-2) y BAD (antagonista de muerte celular de BCL-2) (Mazzucchelli *et al.*, 2007).

La IL-7 también modula la función de las células T, puesto que, la IL-7 estimula la activación de las células T al aumentar la proliferación y la producción de citocinas, especialmente en el contexto de una activación de TCR subóptima. Además, aunque generalmente no se considera que la IL-7 juegue un papel central en la determinación de la diferenciación de

células T tipo 1 versus tipo 2, la IL-7 tiende a inducir respuestas inmunes de tipo 1 porque regula positivamente la producción de IFN $\gamma$  e IL-2 y solo induce débilmente la producción de IL-4, y sinergiza con IL-12 en la inducción de la producción de IFN $\gamma$ . Asimismo, la IL-7 aumenta la actividad lítica de los linfocitos T CD8. Los mecanismos responsables del aumento de la actividad citolítica por IL-7 no se han estudiado completamente, pero probablemente implican la inducción de proteínas y gránulos formadores de poros y el aumento en la producción de IFN $\gamma$  (Fry *et al.*, 2002).

La expresión de CD127 en las células T es influenciada por estímulos extrínsecos, que incluyen antígenos y citocinas. La activación del TCR de las células T disminuye la expresión de CD127. Por lo tanto, las células T de memoria central y de memoria efectora disminuyen la expresión de CD127 si se reencuentran con su antígeno. Igualmente existen varias citocinas que inhiben la expresión de CD127 como la IL-7, IL-2, IL-4 e IL6. Mientras que las citocinas como IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  y TNF inducen la expresión de CD127 (Mazzucchelli *et al.*, 2007).

Se ha visto que en las infecciones virales crónicas disminuye la expresión de CD127 en las células de memoria, sin embargo, los factores que causan esto no han sido determinados; probablemente puede deberse a una continua señalización del TCR debido a la persistencia del antígeno viral o a la estimulación continua por parte de citocinas, como la IL-2 o la IL-4 (Mazzucchelli *et al.*, 2007).

### **1.7. Linfocitos Treg**

Las células Treg se generan por el reconocimiento del antígeno propio en el timo y por el reconocimiento de antígenos propios y extraños en tejidos periféricos (Josefowicz *et al.*, 2012). En el timo, se originan de un subconjunto de células T que expresan receptores con afinidad alta por antígenos propios. Algunas de estas células regulan al alza el factor de transcripción Foxp3 y luego se convierten en células Treg capaces de suprimir la reacción a antígenos propios. Sin embargo, la diferenciación Treg en el timo sigue siendo poco conocida, se sugiere que su desarrollo no requiere una población de células presentadoras de antígeno específicas, ya que varios estudios indican que las células epiteliales tímicas (TEC), células dendríticas mieloides (mDC) y plasmacitoides (pDC), así como los macrófagos y las células B pueden estar implicados en la selección de Treg y que las citocinas IL-2 e IL-15, son mediadores importantes de la estabilización de estas células (Caramalho *et al.*, 2015). La diferenciación de las Treg en la periferia requiere de una señal de TCR de alta afinidad más una coestimulación subóptima. Las altas cantidades de TGF $\beta$  facilitan la inducción de Foxp3 en las células T CD4 Naïve. Asimismo, cuando el TCR de los linfocitos T de tejidos periféricos reconocen antígenos a los cuales el organismo es expuesto crónicamente bajo condiciones homeostáticas y no inflamatorias puede apoyar la diferenciación de las células Treg (Josefowicz *et al.*, 2012). Además, se encontró que en presencia de anti-CD3 y TGF- $\beta$ , PD-L1-Ig puede inducir un aumento en la generación de novo de Tregs de células T CD4 Naïve (Francisco *et al.*, 2010).

Las células Tregs son un pequeño subconjunto de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> que suprimen la respuesta inmune. CD25 y CD4 no son marcadores específicos para las Treg, ya que también se expresan en otras células T. CD25 es un receptor de alta afinidad para la IL-2. Foxp3 es un factor de transcripción que se considera como el marcador más específico y el factor de transcripción regulador maestro para Tregs, ya que Foxp3 es de importancia crítica para el desarrollo y la función de las Tregs (Najafi *et al.*, 2018).

Los linfocitos Treg suprimen la respuesta inmune por diversos mecanismos: i) la producción de citocinas inmunosupresoras como IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35; ii) eliminación de células dendríticas, linfocitos B y T por medio de granzimas y perforinas; iii) inhibición de la maduración y función de las células presentadoras de antígeno por las moléculas LAG3 y CTLA4 expresadas en las Treg y iv) disrupción metabólica que incluye la apoptosis de células T debido a la deprivación de IL-2 e inhibición de células T mediada por AMP cíclico (cAMP) (Vignali *et al.*, 2008; Josefowicz *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2017).

Las Treg se acumulan en los tumores y en la sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, y promueven el crecimiento tumoral a través de la supresión de la respuesta inmune antitumoral por los mecanismos antes mencionados (Whiteside, 2012; Watanabe *et al.*, 2010). Se ha observado que el número de linfocitos Treg en el tejido de la mama es mayor en pacientes con cáncer de mama que en mujeres sanas y es mayor en pacientes con cáncer invasivo que en aquellas con carcinoma ductal in situ (DCIS). Además, un número de Treg elevado identifica a las pacientes con DCIS con mayor riesgo de reincidencia y a las pacientes con tumores invasivos con una supervivencia general y un periodo libre de enfermedad más corto. Asimismo, un número alto de Treg está presente en tumores de alto grado, en pacientes con metástasis de ganglios linfáticos y en tumores negativos para receptores de estrógeno (Bates *et al.*, 2006). En sangre periférica de pacientes con cáncer de mama el número de Treg también es mayor comparado con mujeres sanas (Liyanage *et al.*, 2002; Abo-Elenein *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2010). Mientras que en pacientes con obesidad se ha visto una disminución del número de Treg y una correlación negativa de las Treg con el BMI (Wagner *et al.*, 2013).

Recientemente, se ha identificado una población de Treg altamente supresoras caracterizadas por la expresión de TIM3. Estas células se han descrito en tumores sólidos murinos de cáncer de mama, colon y melanoma (Sakuishi *et al.*, 2013) de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, donde su presencia se asocia con etapas avanzadas de cáncer (Gao *et al.*, 2012) y en tumores sólidos y sangre periférica de pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), donde observaron que los Treg TIM3<sup>+</sup> infiltrados en tumor tienen una mayor capacidad para inhibir la proliferación de las células T Naïve que las Treg TIM3<sup>-</sup> (Liu *et al.*, 2018). En un modelo murino de cáncer de colon, encontraron que los Tregs TIM3<sup>+</sup> son aproximadamente 2 veces más supresores que las células Treg TIM3<sup>-</sup>, pues los linfocitos Treg TIM3<sup>+</sup> contienen una mayor frecuencia de células que producen IL-10 y expresan más perforina, granzima A y G que los linfocitos Treg TIM3<sup>-</sup>. Además, en un modelo murino de melanoma observaron que los Treg TIM3<sup>+</sup> se acumulan en tejido tumoral antes de la aparición de las células T CD8 exhaustas y su depleción en esta etapa interfiere con el agotamiento de las células TCD8 (Sakuishi *et al.*, 2013).

En los linfocitos infiltrados de tumor de pacientes con HNSCC y en un modelo murino de cáncer de colon han visto que algunas células Treg TIM3+ co-expresan PD1 (Liu *et al.*, 2018; Sakiishi *et al.*, 2013).

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por neoplasia maligna entre las mujeres en el mundo. La obesidad y IR contribuye con el progreso del cáncer de mama. La IR distingue a las personas obesas enfermas y metabólicamente obesas de las obesas sanas y de las no obesas sanas, respectivamente. Se ha visto que la obesidad y el sobrepeso alteran la respuesta inmune adaptativa afectando a los linfocitos T CD8, los cuales son los principales mediadores de la respuesta inmune contra el cáncer. Se cree que la IR podría influir en la proliferación y función de las poblaciones de células T. Así mismo, se ha propuesto que la leptina, adiponectina y ghrelina son moléculas clave que relacionan la IR con el cáncer de mama, ya que afectan a las células T e influyen en el progreso del tumor. Se sabe que los linfocitos T CD8 exhaustos y las Treg tienen un papel importante en los mecanismos de evasión inmune explotados por el cáncer, y estos se han encontrado en tumores sólidos y sangre periférica de pacientes con cáncer de mama asociándolos con un peor pronóstico. Sin embargo, se desconoce si la frecuencia de linfocitos T CD8 exhaustos y Tregs altamente supresoras en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y IR, es diferente a aquellas sin IR, así como la relación de los T CD8 exhaustos con las Treg altamente supresoras, con la leptina, con la adiponectina y con la ghrelina. Por lo que nos preguntamos si la IR marcará diferencias en el perfil fenotípico de las células T CD8 y Treg presentes en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama (BrCA).

## **3. HIPÓTESIS**

Si la obesidad afecta la proliferación y función de las células T CD8 y la IR contribuye con el desarrollo de cáncer de mama, entonces las pacientes con cáncer de mama con IR tendrán un mayor porcentaje de células T CD8 fenotípicamente exhaustas comparado con pacientes con cáncer de mama sin IR.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Determinar el perfil fenotípico de las células T CD8 presentes en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y IR.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Determinar y comparar el perfil de expresión de PD1, TIM3, CTLA4, CD28, CD69 y CD127 en las células T CD8 presentes en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y IR

- Determinar y comparar el porcentaje de Treg y Treg altamente supresoras en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y IR
- Analizar la relación de la frecuencia de linfocitos T CD8 fenotípicamente exhaustos de las mujeres incluidas en el estudio con el porcentaje de Treg altamente supresoras en sangre periférica
- Analizar la relación de la frecuencia de linfocitos TCD8 exhaustos de las mujeres incluidas en el estudio con la concentración de adiponectina, leptina y ghrelina en sangre periférica

## **5. RELEVANCIA E IMPACTO**

La IR contribuye con el desarrollo del cáncer de mama, por lo que el estudio de la presencia de células T CD8 exhaustas ayudará a tener una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la interacción metabólica-inmunológica durante la IR que puedan estar favoreciendo el progreso del cáncer de mama.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Población de estudio**

Se realizó el cálculo de tamaño de muestra en el programa R usando el método de cálculos de potencia para el análisis unidireccional equilibrado de pruebas de varianza con el siguiente código de programación: `pwr.anova.test(f=0.57, k=4, power= 0.80, sig.level=0.05)`. En el cual *f* es el tamaño del efecto, *k* es el número de grupos, *power* es la probabilidad de error tipo II, *sig.level* es la probabilidad de error tipo I. Para lo anterior se tomó en cuenta un tamaño del efecto de 0.57, el cual se obtuvo del artículo de Poschke y col. (2012), una probabilidad de error tipo I de 0.05, una probabilidad de error tipo II de 0.8 y los siguientes 4 grupos: mujeres sin neoplasias (Neo-) sin resistencia a la insulina (Non-IR), mujeres sin neoplasia (Neo-) con resistencia a la insulina (IR), pacientes con cáncer de mama (BrCA) sin resistencia a la insulina (Non-IR), pacientes con cáncer de mama (BrCA) con resistencia a la insulina (IR). El resultado del cálculo de tamaño de muestra fue de 9 sujetos por grupo.

Las pacientes con BrCA que participaron en este estudio fueron tratadas en la unidad de tumores mamarios del servicio de Oncología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en la Ciudad de México y la mayoría de las mujeres sin neoplasia son trabajadoras de este hospital. Las pacientes con BrCA y mujeres sin neoplasias fueron invitadas a participar en este estudio y aquellas que aceptaron participar firmaron el consentimiento informado (ANEXO 2 y 3) basado en el protocolo de estudio revisado y aprobado por la dirección de investigación y los comités de ética y de investigación del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” (no. de registro: DI/15/UME/03/47) (ANEXO 1). Después se recabaron sus datos clínicos en una hoja de recolección de datos (ANEXO 4).

Se analizaron las muestras de sangre periférica de 17 mujeres Neo-, Non-IR; 17 mujeres Neo-, IR; 16 pacientes con BrCA, Non-IR sin tratamiento previo y 15 pacientes con BrCA, IR sin

tratamiento previo. El punto de corte para definir la IR fue la evaluación del modelo de homeostasis para la valoración de la IR (HOMA-IR) > 2.5, el cual se calculó usando la siguiente fórmula:  $(\text{Glucosa (mg / dl)} * \text{insulina } (\mu\text{UI / ml})) / 405$ . Los datos clínicos de los individuos que participaron en este estudio se resumen en la Tabla 2. Se excluyeron a mujeres con diabetes o comorbilidades conocidas (enfermedad autoinmune, proceso alérgico, infecciones virales, hipertiroidismo, hipotiroidismo y procesos infecciosos agudos) y se eliminaron aquellas en donde no se consiguió una muestra adecuada, que tuvieran una concentración de glucosa en ayuno >126 o no se realizaran los estudios de laboratorio para la determinación de la concentración de glucosa e insulina en suero.

**Tabla 2.** Características generales de las mujeres y el tumor. Las variables cuantitativas se describen como medias y  $\pm$  desviaciones estándar y las variables cualitativas se definen como frecuencias.

<b>Características</b>	<b>Neo- Non- IR n=17</b>	<b>Neo- IR n=17</b>	<b>BrCA Non-IR n=16</b>	<b>BrCA IR n=15</b>
<b>Edad <math>\pm</math> SD</b>	52 $\pm$ 9	51 $\pm$ 7	49 $\pm$ 9	49 $\pm$ 7
<b>Clasificación TNM</b>				
Etapa II	NA	NA	3	4
Etapa III	NA	NA	9	8
Etapa IV	NA	NA	4	3
<b>Diámetro de tumor cm<math>\pm</math>SD</b>				
Etapa II	NA	NA	2.3 $\pm$ 1	2.9 $\pm$ 0.2
Etapa III	NA	NA	8.3 $\pm$ 3.8	7.6 $\pm$ 3.8
Etapa IV	NA	NA	9.0 $\pm$ 3.1	8.9 $\pm$ 3.8
<b>Grado histológico</b>				
G1	NA	NA	1	1
G2	NA	NA	11	6
G3	NA	NA	3	4
Sin datos			1	4
<b>Tipo histológico</b>				
Ductal	NA	NA	14	14
Lobular	NA	NA	1	1
Mixto	NA	NA	1	0
<b>Clasificación molecular</b>				
Sin datos	NA	NA	1	1
Luminal A	NA	NA	4	2
Luminal B	NA	NA	8	9
Her2-neu	NA	NA	2	2
Triple negativo	NA	NA	1	1
<b>IMC</b>	27.2 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>	32.6 $\pm$ 5.3 <sup>b</sup>	28.1 $\pm$ 4.8 <sup>ab</sup>	32.5 $\pm$ 6.5 <sup>b</sup>
<b>Postmenopáusicas</b>	11	9	7	6
<b>Con síndrome metabólico</b>	1	10	0	10
<b>Hipertensión</b>	2	3	3	5
<b>Triglicéridos<math>\geq</math>150 mg/dl</b>	6	9	6	10
<b>HDL Colesterol<math>&lt;</math> 39mg/dl</b>	8	7	1	4
<b>Obesidad</b>	4	13	8	10

Neo-, Non-IR: mujeres sin neoplasia sin resistencia a la insulina

Neo-, IR: mujeres sin neoplasias con resistencia a la insulina

BrCA, Non-IR: pacientes con cáncer de mama sin resistencia a la insulina

BrCA IR: pacientes con cáncer de mama con resistencia a la insulina

SD Desviación estándar, NA no aplica

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ )

## 6.2. Toma y procesamiento de muestras

A cada uno de los sujetos se le tomó una muestra de 20 ml de sangre venosa en tubos de BD Vacutainer con EDTA-K2. A uno de los tubos Vacutainer se le adicionaron 10  $\mu$ L de una solución 100 mM de ácido P-hidroximercuribenzoico (PHMB) (un inhibidor de proteasa) por ml de sangre para evitar la degradación de la ghrelina acilada y se guardó en refrigeración junto con los demás tubos para su traslado.

### Procesamiento de muestras

El plasma se obtuvo al centrifugar dos tubos BD Vacutainer (uno con el inhibidor de proteasa y otro sin el inhibidor) a 3,500 rpm por 10 min a 4 °C. Se extrajeron 2,000  $\mu$ L de plasma del tubo que no contenía el inhibidor de proteasa usando una micropipeta de 1000 y se colocaron en dos tubos de 1.5 ml, los cuales se centrifugaron a 10,000 g por 10 min a 4° C. Se pasaron 450  $\mu$ L de los sobrenadantes a 4 tubos de 0.6 ml y se congelaron a -70°C, para la determinación de adipocitocinas. Del tubo Vacutainer con el inhibidor de proteasa se colectaron 1000  $\mu$ L de plasma, se trataron con 100  $\mu$ L de HCL 1 N, se centrifugaron a 3,500 rpm por 5 min a 4°C y se guardaron 500  $\mu$ L en dos tubos de 0.6 ml en el congelador (-20 °C) para la determinación de la ghrelina acilada.

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se separaron por centrifugación en gradiente de densidad con Histopaque®-1077 (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante para su posterior análisis por citometría de flujo. Brevemente, a 4 tubos cónicos de 15 ml se les agregó 3 ml de Ficoll a 25°C y 6 ml de sangre diluida con PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) en una relación 1:1. La sangre se depositó sobre el Ficoll con cuidado de no mezclarla con éste y los tubos se centrifugaron a 400 g por 30 min a 20°C sin freno. Las CMSP se extrajeron con pipeta Pasteur, y se lavaron dos veces con 14 ml de PBS, se centrifugaron a 2,000 rpm/min por 10 min a 20°C, el sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de PBS.

## 6.3. Determinación del perfil fenotípico de los linfocitos T CD8

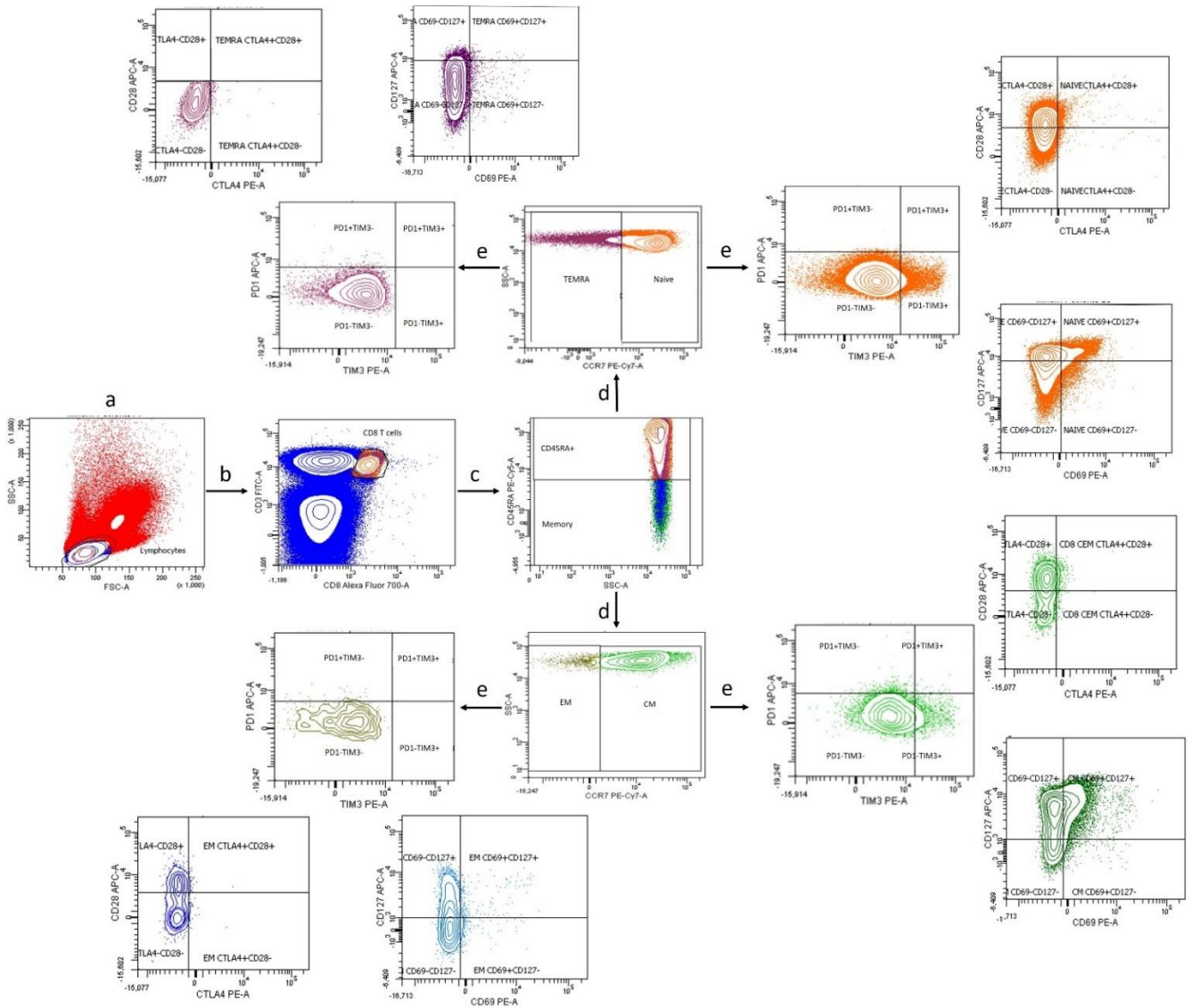
Las células se contaron en el citómetro, y se realizaron las diluciones pertinentes para obtener una densidad final de  $1.3 \times 10^6$  linfocitos en 50  $\mu$ l de PBS en cada tubo para los tubos 1,3 y 5 y de  $2.5 \times 10^6$  linfocitos en 70  $\mu$ L de PBS para el tubo 2. Las CMSP se marcaron con 3  $\mu$ l tomados directamente de los viales de cada anticuerpo monoclonal conjugado con fluorocromo según lo descrito en la Tabla 3. Se incubaron 20 min en refrigeración y en oscuridad, después se realizó el marcaje intracelular con FoxP3 para el tubo 2 y se agregaron 200  $\mu$ l de PBS a los tubos 1, 3 y 5. Finalmente los tubos 1, 3 y 5 se pasaron a tubos de citómetro y se analizaron usando el citómetro de flujo BD FACS Canto II con 6 canales y el software FACS Diva Versión 6.1.3. Los linfocitos fueron identificados por tamaño y complejidad, y fueron analizados para determinar la expresión de CD8. Las células T CD8 fueron separadas en los subconjuntos de memoria y CD45RA+, que a su vez se dividieron en los subconjuntos Naïve, TEMRA, CM y EM por CCR7. Finalmente, se identificaron los límites de cuadrantes de CD45RA, CCR7, TIM3, PD1, CD28 CTLA-4, CD69 y CD127



dentro de los subconjuntos de los linfocitos T CD8 utilizando el método de fluorescencia menos uno (FMO) (Figura 1).

**Tabla 3.** Diseño de paneles multiparamétricos

Tubo1	Tubo2	Tubo3	Tubo5
anti-CD3 FITC Clona OKT3 Biolegend	anti-CD3 FITC Clona OKT3 Biolegend	anti-CD3 FITC Clona OKT3 Biolegend	anti-CD3 FITC Clona OKT3 Biolegend
anti-CD8 Alexa 700 Clona Hit88a Biolegend	anti-FoxP3 Alexa 700 Clona 1054C R & D	anti-CD8 Alexa 700 Clona Hit88a Biolegend	anti-CD8 Alexa 700 Clona Hit88a Biolegend
anti-CD45RA PeCy5 Clona HI100 Biolegend	anti-CD4 PeCy5 Clona RPA-T4 Biolegend	anti-CD45RA PeCy5 Clona HI100 Biolegend	anti-CD45RA PeCy5 Clona HI100 Biolegend
anti-CCR7 PECy7 Clona G043H7 Biolegend	anti-CD25 PECy-7 Clona BC96 Biolegend	anti-CCR7 PECy7 Clona G043H7 Biolegend	anti- CCR7 PECy7 Clona G043H7 Biolegend
anti-TIM3 PE Clona F38-2E2, Biolegend	anti-TIM3 PE Clona F38-2E2, Biolegend	anti-CTLA4 PE Clona BN13 BD Pharmigen	anti-CD69 PE Clona FN50 Biolegend
anti-PD1 APC Clona EH12.2H7 Biolegend	anti-PD1 APC Clona EH12.2H7 Biolegend	anti-CD28 APC Clona Cd28.2 Biolegend	anti-CD127 APC Clona A01405 Biogend



**Fig. 1.** Determinación de subconjuntos y subpoblaciones de linfocitos T CD8 por citometría de flujo. Los linfocitos se identificaron por tamaño y complejidad (a) y se analizaron para determinar la expresión de CD8 (b). Las células T CD8, se separaron en subconjuntos de memoria y no de memoria por la expresión de CD45RA (c), que a su vez se dividieron en los subconjuntos Naïve, TEMRA, CM y EM por la expresión de CCR7 (d). Finalmente, se identificaron los límites de cuadrantes de TIM3, PD1, CD28 CTLA-4, CD69 y CD127 dentro de cada uno de los subconjuntos de los linfocitos T CD8 utilizando el método de fluorescencia menos uno (FMO) (e).

Para el marcado intracelular de FoxP3, después de marcar los anticuerpos de superficie las células se lavaron 3 veces en 300  $\mu$ L de PBS frío, se centrifugaron a 2,000 rpm por 5 min a 4  $^{\circ}$ C y se resuspendieron en 10  $\mu$ L de PBS. Se agregaron 50 $\mu$ L de Citofix y se incubaron 10 min en refrigeración y en oscuridad. Posteriormente se lavaron una vez con 200  $\mu$ L de Permash y se resuspendieron en 50  $\mu$ L de éste. A continuación, se agregaron 3  $\mu$ L de FoxP3 y se dejaron incubando toda la noche en refrigeración y oscuridad. Finalmente, las células

se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ L de Permwash, se retiró el sobrenadante, se agregaron 200  $\mu$ L de PBS y se pasaron a tubos de citómetro para poder analizarlos en el citómetro de flujo. Se realizó la regionalización de linfocitos y la determinación de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> siguiendo el método descrito por Finney y col. (2010). Brevemente la población doble negativa (CD4<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) se usó para definir el corte de la expresión de CD4 y CD25. Las CD25<sup>hi</sup> se determinaron como aquellas arriba del 90% de la población considerada CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y la población restante se definió como CD25<sup>lo</sup>. La población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> se delimitó utilizando el método de la fluorescencia menos uno (FMO).

#### **6.4. Determinación de adipocitocinas y ghrelina en plasma**

Se eliminaron las muestras de plasma de 12 mujeres, ya que se descongelaron debido a fallas en el congelador, por lo que solamente se determinó la concentración de ghrelina de 53 mujeres, siguiendo las instrucciones del kit de ELISA comercial *Human Acylated Ghrelin Enzyme Immunoassay Kit*, SPI-BIO, France (No. Catálogo: A05106). Brevemente, se lavó la placa 5 veces con 300  $\mu$ l de “Wash Buffer”, se colocaron 100  $\mu$ L de “EIA buffer” como diluyente en los pozos control para uniones no específicas, 100  $\mu$ L de cada una de las 8 concentraciones estándar de ghrelina acetilada humana por duplicado previamente diluidas en el “EIA buffer” (250 pg/ml, 125pg/ml, 52.5 pg/ml, 31.3 pg/ml, 15.6 pg/ml, 7.81 pg/ml, 3.91 pg/ml y 1.96 pg/ml). Se colocaron 100  $\mu$ L de plasma de cada una de las mujeres previamente diluido 1/5 en “EIA buffer” y 100  $\mu$ L del control de calidad (27.8 pg/ml de ghrelina acilada). Después se agregaron 100  $\mu$ L del conjugado de Acetilcolinesterasa (AChE)- anti-ghrelina acetilada presente en el kit a todos los pozos, excepto al blanco y se incubaron 20 h a 4°C. Luego la placa se lavó 5 veces con “Wash Buffer”, se añadieron 200  $\mu$ L del reactivo de Ellman a cada uno de los pozos y se incubó en un agitador orbital en la obscuridad a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, las muestras se leyeron a 410 nm en un lector de ELISA. La concentración de ghrelina de cada una de las muestras se determinó utilizando la curva estándar de ghrelina acetilada humana.

Se determinó la concentración de leptina de 65 mujeres, siguiendo las instrucciones del kit de ELISA comercial *Human Leptin Standard ABTS ELISA Development Kit*, PEPROTECH (No. Catálogo: 900-K90). Brevemente, se agregaron 100  $\mu$ L de anticuerpo de captura presente en el kit a una concentración de 1.0  $\mu$ g/ml según lo indicado en las instrucciones a cada pozo y se dejó incubando toda la noche a temperatura ambiente. La placa se lavó 4 veces con 300  $\mu$ L de PBS con 0.05% de Tween-20 (Solución amortiguadora de lavado) por pozo; los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con 300  $\mu$ L de PBS con 1% de BSA incubándola por 1.5 h a temperatura ambiente y luego se lavaron 4 veces con 300  $\mu$ L de solución amortiguadora de lavado. Después se colocaron 100  $\mu$ L de PBS con 0.05% de Tween y 0.1% de BSA (Solución amortiguadora de dilución) en los pozos control para uniones no específicas, 100  $\mu$ L de cada una de las 8 concentraciones estándar de leptina humana previamente diluidas en la solución amortiguadora de dilución (4000 pg/ml, 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml y 31.5 pg/ml) y 100  $\mu$ L de plasma de cada una de las mujeres previamente diluido en solución amortiguadora de dilución (1/15 para mujeres con IMC  $\leq$ 20 kg/m<sup>2</sup>, 1/15 para mujeres con IMC de 30 a 32 kg/m<sup>2</sup>, 1/35 para mujeres con IMC >32 kg/m<sup>2</sup> a 39 y 1/40 para mujeres con IMC  $\geq$ 40) y se

incubaron por 2 h. Posteriormente se lavó la placa 4 veces con solución amortiguadora de lavado y se agregaron 100  $\mu$ L del anticuerpo de detección presente en el kit a una concentración de 0.25  $\mu$ g/ml según lo indicado en las instrucciones a todos los pozos excepto al blanco y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Luego la placa se lavó 4 veces con solución amortiguadora de lavado, se añadieron 100  $\mu$ L del conjugado avidina-HRP en una dilución 1:2000 y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. La placa fue lavada 4 veces con solución amortiguadora de lavado y se añadieron 100  $\mu$ L del sustrato ABTS<sup>TM</sup> SIGMA a cada uno de los pozos y se incubó en un agitador orbital en la obscuridad a temperatura ambiente por 1 h. Finalmente, las muestras se leyeron en un lector de ELISA a 405nm con una corrección de longitud de onda establecida a 650 nm. La concentración de leptina de cada una de las muestras se determinó utilizando la curva estándar de leptina humana.

Se determinó la concentración de adiponectina de 65 mujeres, siguiendo las instrucciones del kit de ELISA comercial *Human Adiponectin PENTASET*, BioVendor (No. Catálogo: RD120023). Brevemente, se agregaron 100  $\mu$ L de anticuerpo de captura presente en el kit en una dilución a una concentración de 4.0  $\mu$ g/ml según lo indicado en las instrucciones a cada pozo y se dejó incubando toda la noche a temperatura ambiente. La placa se lavó 1 vez con 350  $\mu$ L de PBS con 0.05% de Tween-20 (Solución amortiguadora de lavado) por pozo; los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con 300  $\mu$ L de PBS con 1% de BSA incubándola por 1 h a temperatura ambiente y luego se lavó 1 vez con 350  $\mu$ L de solución amortiguadora de lavado. Después se colocaron 100  $\mu$ L de PBS con 1% de BSA (Solución amortiguadora de dilución) en los pozos control para uniones no específicas, 100  $\mu$ L en los blancos, 100  $\mu$ L de cada una de las 8 concentraciones estándar de adiponectina humana previamente diluidas en solución amortiguadora de dilución (150 ng/ml, 75 ng/ml, 37.5 ng/ml, 18.75 ng/ml, 9.37 ng/ml, 4.6 ng/ml, 2.34 ng/ml y 1.18 ng/ml) y 100  $\mu$ L de plasma de cada una de las mujeres previamente diluido 1/300 en solución amortiguadora de dilución y se incubaron en un agitador orbital (225 rpm) por 1 h. Posteriormente se lavó la placa 3 veces con solución amortiguadora de lavado y se agregaron 100  $\mu$ L del anticuerpo de detección presente en el kit a una concentración de 0.03  $\mu$ g/ml en una dilución según lo indicado en las instrucciones a todos los pozos, excepto al blanco y se incubaron en un agitador orbital (225 rpm) por 2 h a temperatura ambiente. Luego la placa se lavó 3 veces con solución amortiguadora de lavado, se añadieron 100  $\mu$ L del conjugado estreptavidina-HRP en una dilución 1:200 y se incubó en agitador orbital (120 rpm) a temperatura ambiente por 30 minutos. La placa fue lavada 3 veces con solución amortiguadora de lavado y se añadieron 100  $\mu$ L del sustrato TMB SIGMA a cada uno de los pozos, se mezcló y se incubó en obscuridad a temperatura ambiente por 9.5 min. La reacción se detuvo al agregar 100  $\mu$ l de 0.2 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e inmediatamente después las muestras se leyeron en un lector de ELISA a 450 nm con una corrección de longitud de onda establecida a 630 nm. Lavados 5 min a 250 rpm. La concentración de adiponectina de cada una de las muestras se determinó utilizando la curva estándar de adiponectina humana.

## 6.5. Estudios de laboratorio

A cada una de las participantes se les solicitó los siguientes estudios de laboratorio: biometría hemática, química sanguínea, insulina, hemoglobina glicosilada y perfil hepático, que se realizaron de manera gratuita en el Laboratorio Central del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” gracias al apoyo de recursos de la dirección de Investigación de esta institución. La química sanguínea incluyó los siguientes elementos: glucosa, triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad y lipoproteínas de baja densidad. El perfil hepático incluyó bilirrubina total, bilirrubina directa e indirecta, proteínas totales, albúmina amino transferasa de alanina (ALT), amino transferasa de aspartato (AST), fosfatasa alcalina, gammaglutamil transferasa y tiempo de protrombina. Estos análisis nos ayudaron a identificar mujeres diabéticas, mujeres que cursaran con procesos infecciosos o alérgicos y mujeres con síndrome metabólico. La concentración de glucosa y de insulina en ayuno se utilizaron para determinar el HOMA-IR.

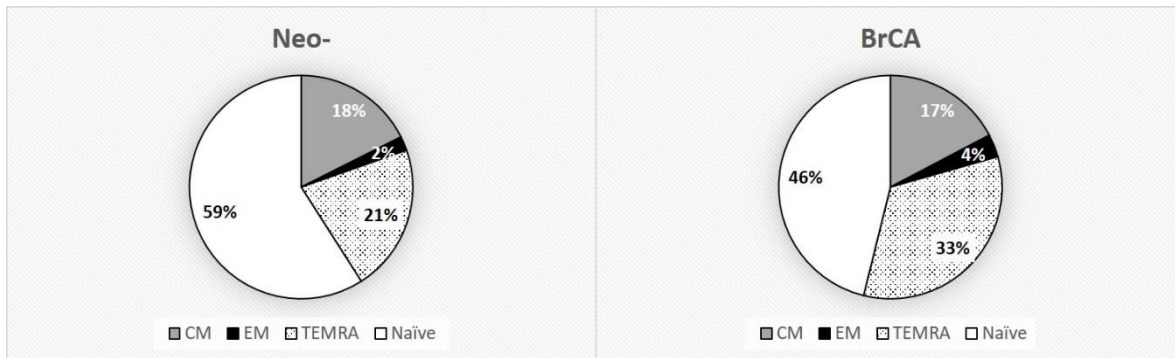
## 6.6. Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico, se usó el software SPSS versión 21.0 y el software R estadística versión 3.4 y la significación estadística se estableció en  $p < 0.05$  para todas las pruebas. La distribución normal y la homocedasticidad se evaluaron mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Para la descripción de las características demográficas, las variables cuantitativas se describieron como medias y desviaciones estándar (SD), mientras que las variables cualitativas se definieron como frecuencias. Las comparaciones de las medias y las frecuencias de la Tabla 2 se realizaron con las pruebas t de Student o ANOVA de una vía y prueba de chi cuadrada, respectivamente. Se utilizó ANOVA de dos vías (factor 1: BrCA, presente o ausente; factor 2: IR, presente o ausente) o la función gamma del modelo lineal generalizado según la normalidad y la homocedasticidad de los datos para analizar las diferencias e interacciones entre los grupos en las siguientes variables: i) el porcentaje de los subconjuntos de T CD8 (Naïve, CM, EM, TEMRA), ii) el porcentaje de las subpoblaciones dentro de los subconjuntos de T CD8 (PD1<sup>+</sup>TIM3<sup>-</sup>, PD1<sup>+</sup>TIM3<sup>+</sup>, PD1<sup>-</sup>TIM3<sup>-</sup>, PD1<sup>-</sup>TIM3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>CTLA4<sup>-</sup>, CD28<sup>+</sup>CTLA4<sup>+</sup>, CD28<sup>-</sup>CTLA4<sup>-</sup>, CD28<sup>-</sup>CTLA4<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, CD69<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>, CD69<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>, CD69<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>), iii) la intensidad media de fluorescencia (MFI) de PD1, TIM3, CD28, CTLA4, CD69 y CD127 en los subconjuntos y subpoblaciones de T CD8, iv) el porcentaje de células Treg y v) el porcentaje de Treg altamente supresoras. Se realizó ANOVA de una vía y análisis de Tuckey para comparar los grupos de mujeres sin neoplasias (Neo-)/ sin resistencia a la insulina (Non-IR), mujeres sin neoplasia (Neo-)/ con resistencia a la insulina (IR), pacientes con cáncer de mama (BrCA)/ sin resistencia a la insulina (Non-IR), pacientes con cáncer de mama (BrCA)/ con resistencia a la insulina (IR) en caso de que se observara una interacción entre los dos factores en las variables antes mencionadas. Las correlaciones entre el porcentaje linfocitos T CD8 fenotípicamente exhaustos con la concentración de adiponectina, ghrelina, leptina en plasma, el porcentaje de células Treg y el porcentaje de células Treg altamente supresoras se calcularon con el coeficiente de correlación de Spearman o Pearson de acuerdo con la normalidad de los datos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Composición y características de los subconjuntos de las células T CD8 en pacientes con cáncer de mama y resistencia a la insulina

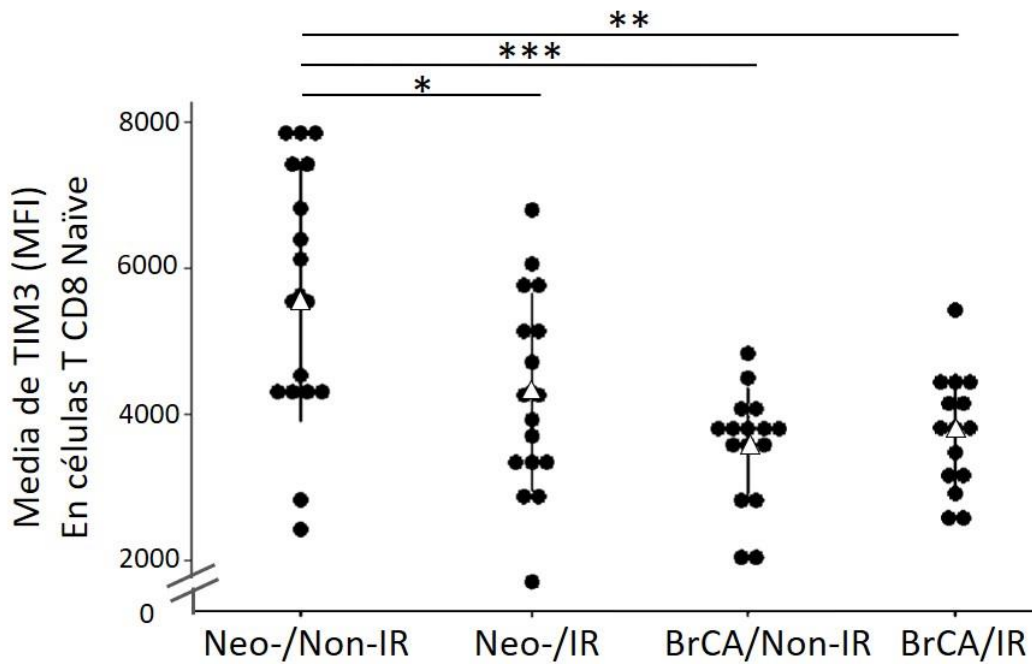
Las células T CD8 se dividieron en cuatro subconjuntos basados en las moléculas CCR7 y CD45RA: Naïve (Naïve CCR7+ CD45RA+), memoria central (CM CCR7+ CD45RA-), memoria efectora (EM CCR7-CD45RA-) y células de memoria diferenciadas terminalmente (TEMRA CCR7- CD45RA+). Al analizar las frecuencias de estos subconjuntos por ANOVA de dos vías, no se detectó alguna interacción entre BrCA e IR. Sin embargo, como se había reportado anteriormente, los pacientes con BrCA tienen un porcentaje significativamente menor de células T CD8 Naïve ( $p = 0.005$ ) y una frecuencia significativamente más alta tanto de linfocitos T CD8 de EM ( $p = 0.002$ ) como de linfocitos T CD8 TEMRA ( $p = 0.001$ ) al compararse con las mujeres sin neoplasias (Poschke *et al.*, 2012) (Figura 2). Por el contrario, no se pudo detectar ninguna diferencia al comparar mujeres con IR y sin IR. Se sabe que los subconjuntos de células T CD8 son intrínsecamente diferentes en la expresión de receptores inhibidores, los cuales están estrechamente relacionados con el estado de diferenciación. Esta distinción está presente en la homeostasis inmunitaria de individuos sanos, por ejemplo, PD1 se expresa particularmente en células EM y TEMRA, mientras que TIM3 está presente principalmente en células T Naïve (Fuertes Marraco *et al.*, 2015). Se identificaron varias moléculas en los subconjuntos de linfocitos T CD8: TIM3, CD28, CTLA4, CD69 y CD127 en los Naïve; PD1, TIM3, CD28, CTLA4, CD69, CD127 en los de CM; PD1, CD28, CTLA4, CD69, CD127 en los de EM; y PD1, CTLA4, CD69, CD127 en los TEMRA. Por lo tanto, hubo coexpresión de PD1 y TIM3 en los subconjuntos de CM; coexpresión de CD28 y CTLA4 en las poblaciones de células Naïve, CM y EM; y coexpresión de CD69 y CD127 en los linfocitos Naïve, CM, EM y TEMRA. Debido a que las pacientes con BrCA tienen una frecuencia menor de células Naïve y una mayor frecuencia de células de EM y de TEMRA, se realizaron correlaciones entre el porcentaje de estos subconjuntos y la expresión de los co-receptores PD1, TIM3, CTLA4, CD28, CD69 y CD127. Los estudios de correlación revelaron que hay una relación entre la expresión de TIM3 ( $r = 0.4$ ,  $p = 0.002$ ) en células T CD8 Naïve, la expresión de CD127 ( $r = -0.3$ ,  $p = 0.028$ ) en linfocitos Naïve y el porcentaje de células Naïve; y una relación entre la expresión de CD127 ( $r = 0.4$ ,  $p = 0.001$ ) en linfocitos TEMRA y el porcentaje de células TEMRA, lo cual se tuvo en cuenta para la discusión de resultados.



**Fig. 2.** Composición de los subconjuntos de las células T CD8 en la población estudiada. Frecuencia de las células T CD8 Naïve, de memoria central (CM), de memoria efectora (EM) y de memoria diferenciada terminalmente (TEMRA) en pacientes con cáncer de mama (BrCA) y mujeres sin neoplasias (Neo-)

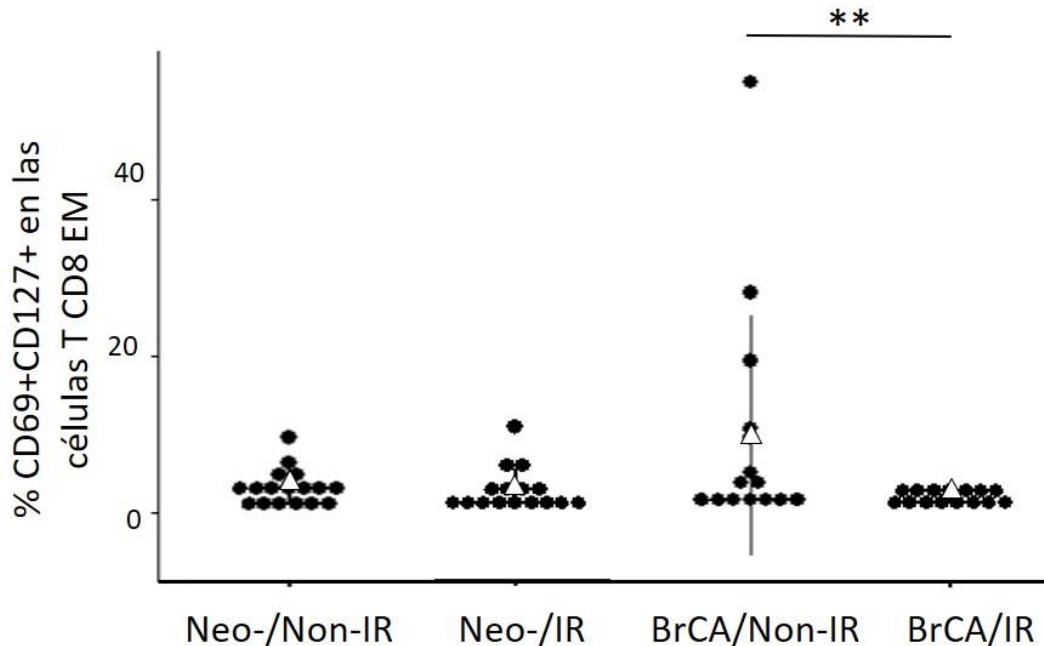
### 7.2. Interacciones entre el cáncer de mama y la resistencia a la insulina en el perfil fenotípico de los diferentes subconjuntos de células T CD8

Un modelo lineal generalizado para la expresión de TIM3 en células T CD8 Naïve reveló una interacción significativa entre BrCA y IR ( $p = 0.04$ ). En el grupo de individuos sin BrCA, el análisis post hoc de Tuckey demostró que los individuos con IR tienen menos expresión de TIM3 en células T CD8 Naïve al compararlos con individuos sin IR ( $p = 0.01$ ). Los pacientes con BrCA y IR o sin IR tienen menos expresión de TIM3 que las mujeres sin neoplasias ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.000$  respectivamente). En contraste, la expresión de TIM3 no mostró diferencia entre IR y no IR en pacientes con BrCA ( $p = 0.978$ ) (Fig.3). Si bien no encontramos un efecto general de los factores BrCA o IR en la expresión de TIM3 en células T CD8 de CM PD1-TIM3+ ( $p = 0.1$  y  $p = 0.6$  respectivamente), sí se registró una interacción cruzada significativa ( $p = 0.02$ ), sugiriendo que el efecto de BrCA sobre la expresión TIM3 es inverso, dependiendo de la presencia o ausencia de IR. Asimismo, se observó una interacción cruzada entre BrCA y IR en el porcentaje de las células T CD8 de EM CD28+CTLA4+ ( $p=0.046$ ) sugiriendo que el efecto de BrCA sobre la frecuencia de estas células es inverso, dependiendo de la presencia o ausencia de IR. Además, se encontró una interacción entre BrCA y IR en el porcentaje de las células T CD8 de EM CD69+CD127+. El análisis post hoc de Tuckey mostró que en el grupo de mujeres con cáncer de mama las mujeres con IR tienen una frecuencia menor de TCD8 de EM CD69+CD127+ que las mujeres sin IR ( $p=0.001$ ) (Fig.4).



**Fig. 3.** Interacción entre cáncer de mama y resistencia a la insulina para la expresión de TIM3 en células T Naïve. Intensidad media de fluorescencia (MFI) de TIM3 en células T CD8 Naïve en pacientes con cáncer de mama sin resistencia a la insulina (BrCA / No IR), pacientes con cáncer de mama con resistencia a la insulina (BrCA / IR), mujeres sin neoplasias sin resistencia a la insulina (Neo / No IR) y mujeres sin neoplasias con resistencia a la insulina (Neo- / IR). El triángulo blanco representa el promedio de la MFI de TIM3 en las células T CD8. Las líneas verticales dentro de los grupos representan el rango de desviación estándar (SD). La significación estadística se indica como \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

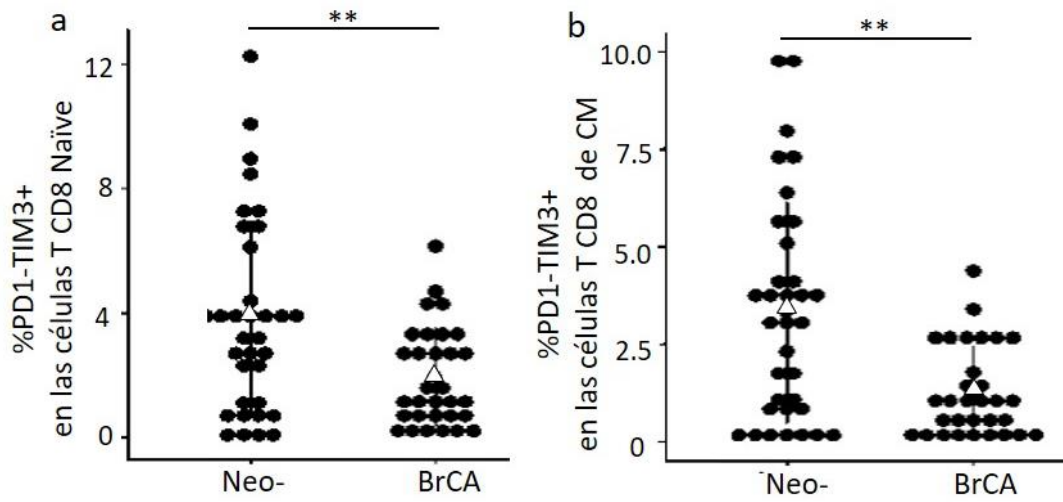




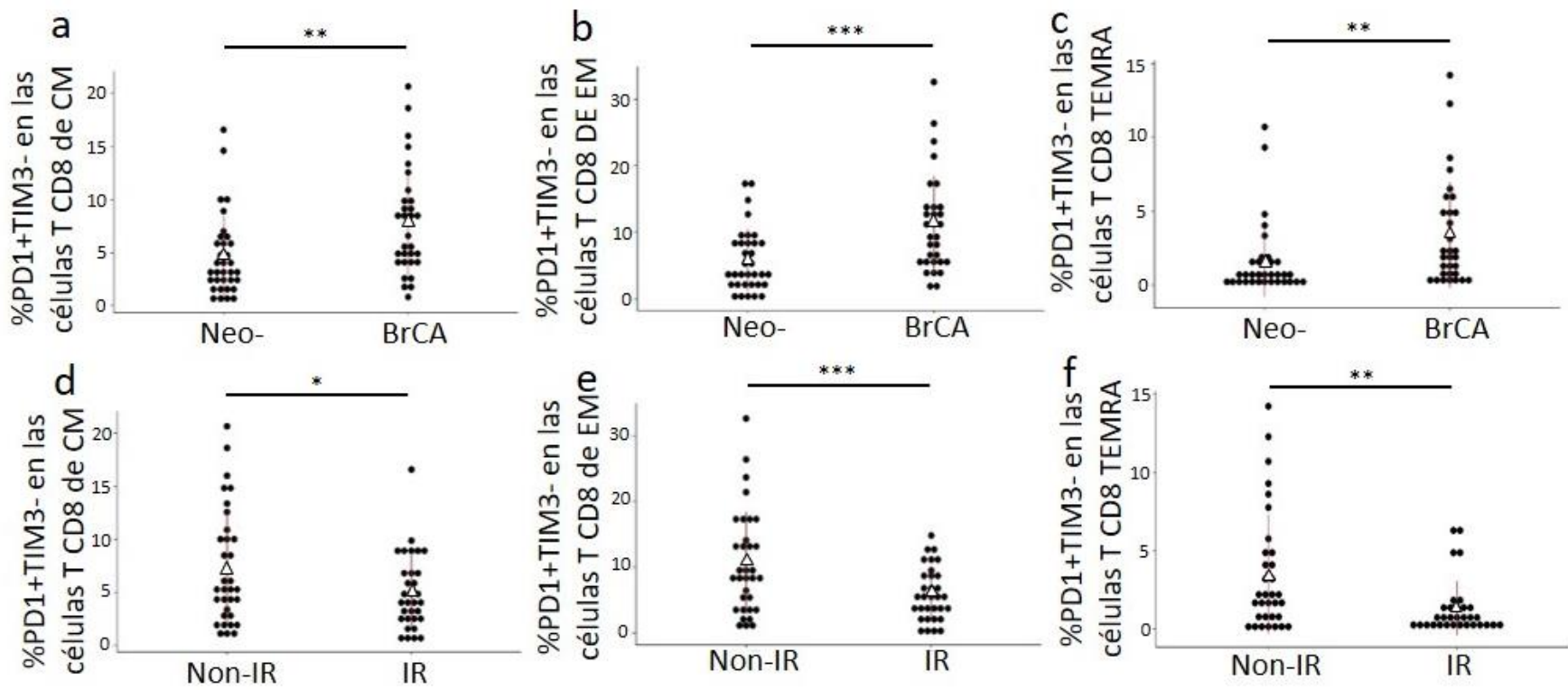
**Fig. 4.** Interacción entre cáncer de mama y resistencia a la insulina en la frecuencia de las células T CD8 CD69+CD127+ de EM en mujeres sin neoplasias sin resistencia a la insulina (Neo / Non- IR), mujeres sin neoplasias con resistencia a la insulina (Neo- / IR) pacientes con cáncer de mama sin resistencia a la insulina (BrCA / Non-IR) y pacientes con cáncer de mama con resistencia a la insulina (BrCA / IR). El triángulo blanco representa el porcentaje medio de CD69+CD127+ en las células T CD8 de EM. Las líneas verticales dentro de los grupos representan el rango de desviación estándar (SD). La significación estadística se indica cómo \*  $p < 0.05$

### 7.3. Perfil fenotípico en los diferentes subconjuntos de células T CD8 en pacientes con cáncer de mama y resistencia a la insulina

Como mencionamos anteriormente, encontramos expresión de TIM3 en los subconjuntos Naïve y CM, inesperadamente en los pacientes con BrCA hay un menor porcentaje de células T CD8 PD1-TIM3+ en estos subconjuntos en comparación con las mujeres sin neoplasias ( $p = 0.003$  para ambos) (Fig. 5a, 5b). Las pacientes con BrCA tienen una frecuencia de células T CD8 PD1 + TIM3- significativamente mayor en los subconjuntos de CM ( $p = 0.004$ ) (Fig. 6a), de EM ( $p = 0.000$ ) (Fig. 6b) y de TEMRA ( $p = 0,006$ ) (Fig. 6c) en comparación con las mujeres sin neoplasia. En contraste, las mujeres con IR presentan una frecuencia significativamente menor de células T CD8 PD1+TIM3- en los subconjuntos de CM, EM y TEMRA que aquellas sin IR (CM  $p = 0.036$ , EM  $p = 0.000$ , TEMRA  $p = 0.005$ ) (Fig. 6 d-f). Además, la frecuencia de células T CD8 PD1-TIM3- es significativamente menor en BrCA en comparación con mujeres sin neoplasias en los subconjuntos de EM ( $p = 0.000$ ) y de TEMRA (0.000), pero en mujeres con IR es más alta en comparación con las mujeres no IR ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.05$  respectivamente). En los subconjuntos Naïve y CM, el porcentaje de células T CD8 PD1-TIM3- es más alto en las mujeres resistentes a la insulina que en las no resistentes ( $p = 0.03$ ,  $p = 0.02$  respectivamente).

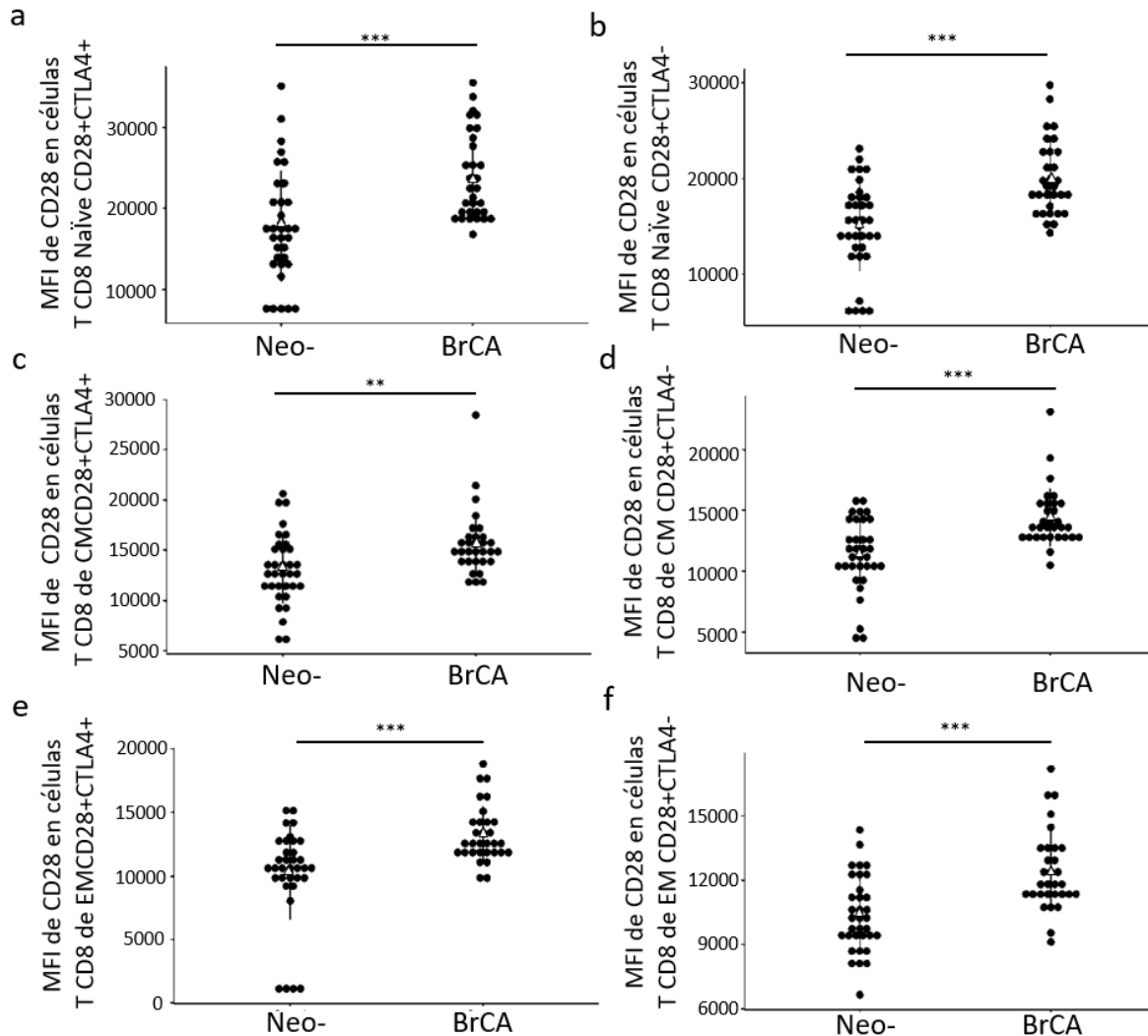


**Fig. 5.** Frecuencia de las células T CD8 PD1-TIM3 +. Porcentaje de PD1-TIM3 + en células T CD8 Naïve (a) células T CD8 de CM (b) en mujeres sin neoplasia (Neo-) y pacientes con cáncer de mama (BrCA). El triángulo blanco representa el porcentaje medio de PD1-TIM3+ en los subconjuntos de células T CD8. Las líneas verticales dentro de los grupos representan el rango de desviación estándar (SD). La significancia estadística se indica cómo \*\*  $p < 0.01$

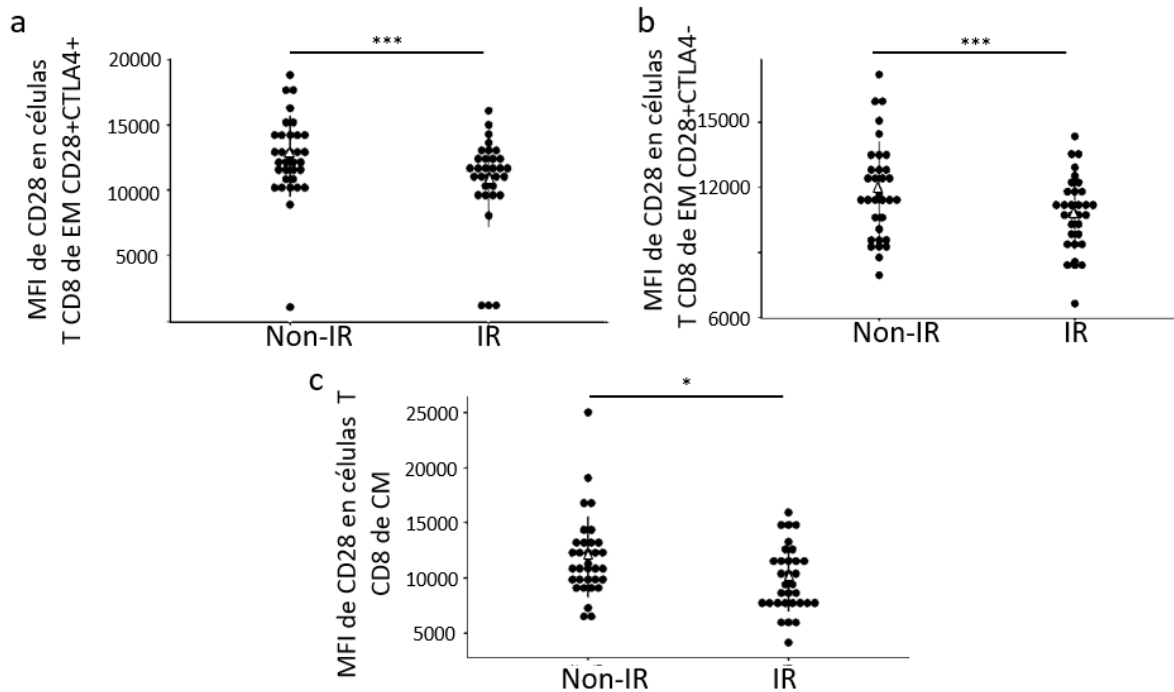


**Fig. 6.** Frecuencia de las células T CD8 PD1 + TIM3- . Porcentaje de PD1 + TIM3- en células T CD8 de CM (a), T CD8 de EM (b) y T CD8 TEMRA (c) de pacientes con cáncer de mama (BrCA) y mujeres sin neoplasias (Neo-); (d-f) porcentaje de PD1 + TIM3 negativo en células T CD8 de CM (d), T CD8 de EM (e) y T CD8 TEMRA (f) de mujeres resistentes a la insulina (IR) y no resistentes a la insulina (Non-IR). El triángulo blanco representa el porcentaje medio de PD1+ TIM3- en los subconjuntos de células T CD8. Las líneas verticales dentro de los grupos representan el rango de desviación estándar (SD). La significación estadística se indica cómo \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001

También se observó que las pacientes con BrCA presentaron una mayor expresión de CD28 en las subpoblaciones CD28+CTLA4+, CD28+CTLA4- de las células T CD8 Naïve ( $p < 0.001$ ), de CM ( $p = 0.004$ ,  $p < 0.001$ , respectivamente) y de EM ( $p < 0.001$ ) que las mujeres sin neoplasias (Fig. 7). En contraste, las mujeres con IR tienen una menor expresión de CD28 en las subpoblaciones mencionadas de los linfocitos T CD8 de EM ( $p < 0.001$ ) y una menor expresión de CD28 en los linfocitos de CM ( $p = 0.01$ ) (Fig. 8).

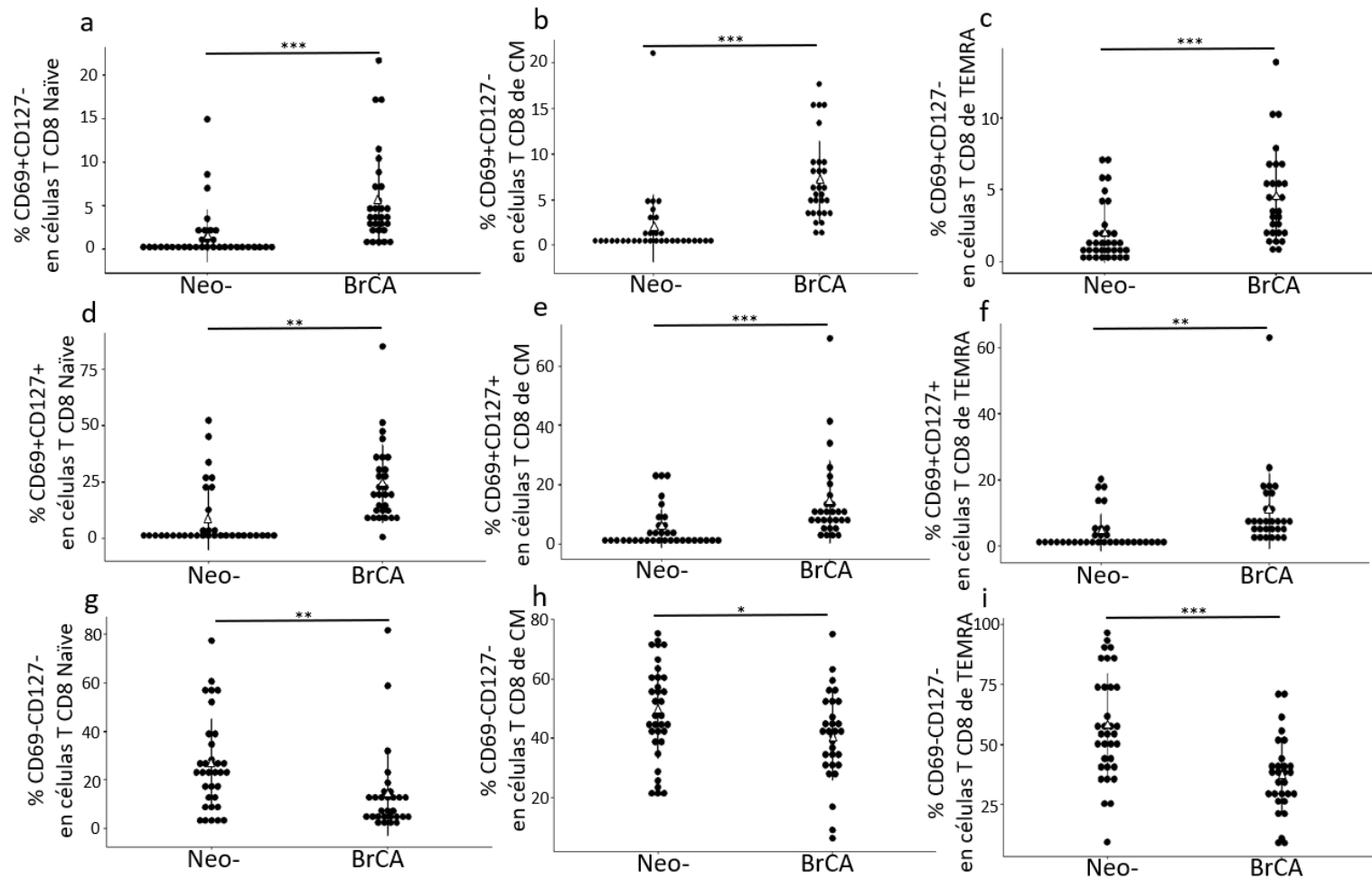


**Fig. 7.** Intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD28 en células T CD8 en mujeres sin neoplasia (Neo-) y pacientes con cáncer de mama (BrCA). MFI de CD28 en las subpoblaciones CD28+CTLA4+ y CD28+CTLA4- de las células T CD8 Naïve (a, b), T CD8 de CM (c, d) y T CD8 de EM (e, f) en mujeres sin neoplasia (Neo-) y pacientes con cáncer de mama (BrCA). El triángulo blanco representa el promedio de la MFI de CD28 en las células T CD8. Las líneas verticales dentro de los grupos representan el rango de desviación estándar (SD). La significación estadística se indica como \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

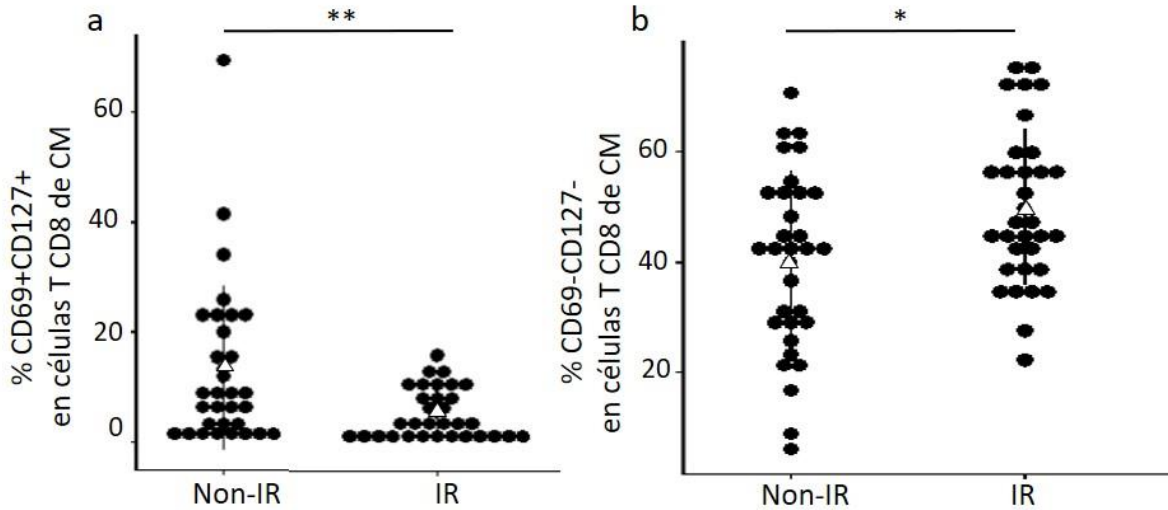


**Fig. 8.** Intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD28 en células T CD8 de mujeres sin resistencia a la insulina (Non-IR) y con resistencia a la insulina (IR). MFI de CD28 en las subpoblaciones CD28+CTLA4+ y CD28+CTLA4- de las células T CD8 de EM (a, b); MFI de CD28 en células T CD8 de CM (c) en mujeres sin resistencia a la insulina (Non-IR) y con resistencia a la insulina (IR). El triángulo blanco representa el promedio de la MFI de CD28 en las células T CD8. Las líneas verticales dentro de los grupos representan el rango de desviación estándar (SD). La significación estadística se indica cómo \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Además, se encontró que las pacientes con BrCA tienen una frecuencia de células T CD8 CD69+CD127-, CD69+CD127+ significativamente mayor en los subconjuntos Naïve ( $p=0.00$ ,  $p=0.005$  respectivamente), de CM ( $p=0.000$  para ambas) y de TEMRA ( $p=0.000$ ,  $p=0.005$  respectivamente) y tienen una frecuencia de células T CD8 CD69-CD127- significativamente menor en los subconjuntos Naïve ( $p=0.007$ ), de CM ( $p=0.03$ ) y de TEMRA ( $p=0.000$ ) en comparación con aquellas sin neoplasias (Fig. 9). Por otro lado, las mujeres con IR presentaron una frecuencia de células T CD8 CD69+CD127+ significativamente menor en el subconjunto de CM ( $p=0.007$ ) (Fig. 10a) y una frecuencia de células T CD8 CD69-CD127- mayor el subconjunto de CM ( $p=0.012$ ) (Fig. 10b) en comparación a las mujeres sin IR.

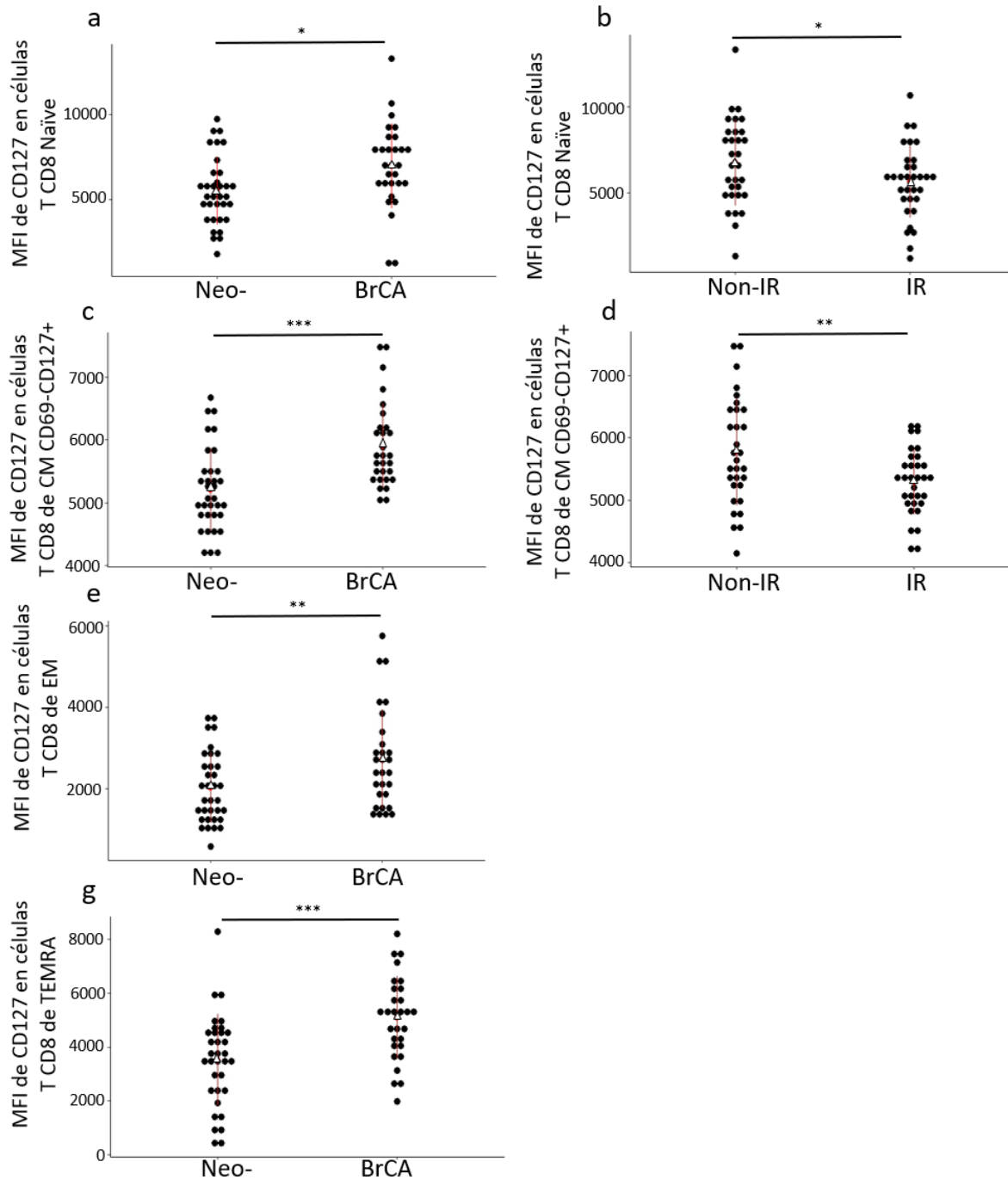


**Fig.9.** Frecuencia de las células T CD8 CD69+CD127-, CD69+CD127+, CD69-CD127- (a-i) en mujeres sin neoplasias (Neo-) y pacientes con cáncer de mama (BrCA). Porcentaje de CD69+CD127-, CD69+CD127+, CD69-CD127- en células T CD8 Naïve (a, d, g), T CD8 de CM (b, e, h) y T CD8 de TEMRA (c) en pacientes con cáncer de mama (BrCA) y en mujeres sin neoplasias (Neo-). El triángulo blanco representa el porcentaje medio de CD69+CD127-, CD69+CD127+, CD69-CD127- en los subconjuntos de células T CD8. Las líneas verticales dentro de los grupos representan el rango de desviación estándar (SD). La significación estadística se indica cómo \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$



**Fig.10.** Frecuencia de las células T CD8 CD69+CD127+, CD69-CD127- de CM en mujeres sin resistencia a la insulina (Non-IR) y con resistencia a la insulina (IR). Porcentaje de CD69+CD127+ (a) y CD69-CD127- (b) en células T CD8 de CM en mujeres sin resistencia a la insulina (Non-IR) y con resistencia a la insulina (IR). El triángulo blanco representa el porcentaje medio de células T CD8 CD69+CD127+ y T CD8 CD69-CD127- de CM. Las líneas verticales dentro de los grupos representan el rango de desviación estándar (SD). La significación estadística se indica cómo \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Igualmente se observó que las pacientes con BrCA presentaron una mayor expresión de CD127 en las células T CD8 Naïve, de EM, de TEMRA y en las células T CD8 CD69-CD127+ de CM ( $p=0.01$ ,  $p=0.008$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$  respectivamente) en comparación con las mujeres sin neoplasias (Fig. 11a, c, e, g). En contraste, las mujeres con IR tienen una menor expresión de CD127 en las células TCD8 Naïve y en las células T CD8 CD69-CD127+ de CM ( $p=0.048$ ,  $p=0.003$  respectivamente) en comparación con aquellas sin IR (Fig. 11b, d).



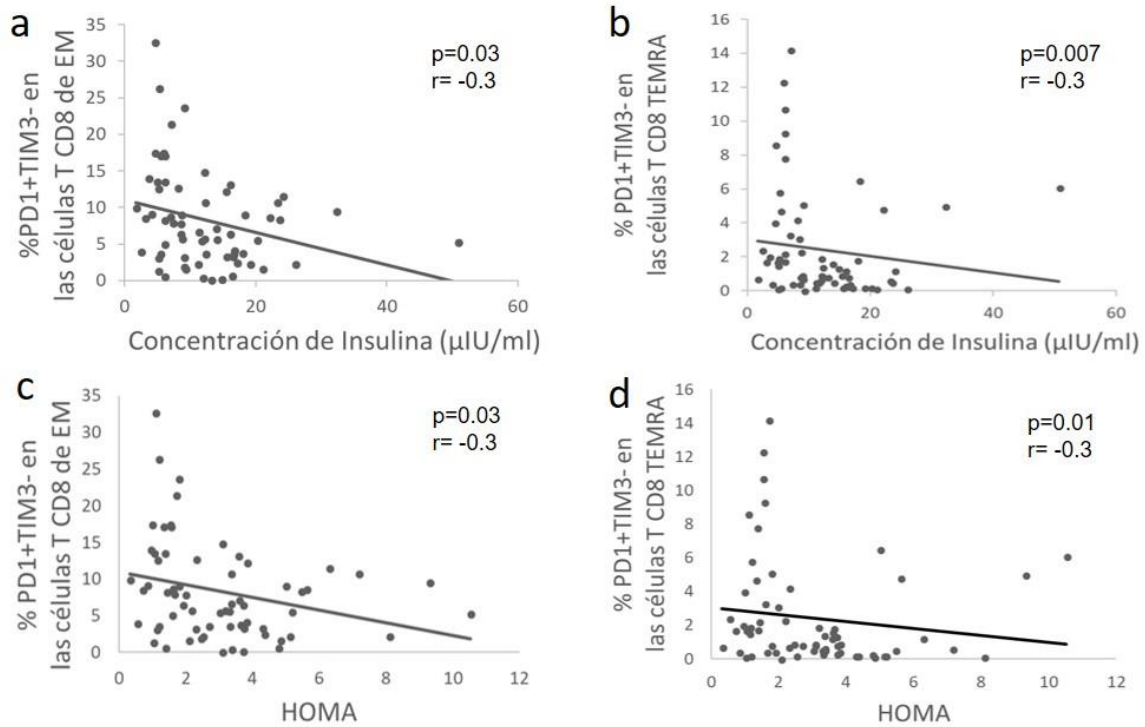
**Fig. 11.** Intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD127 en células T CD8. MFI de CD127 en los subconjuntos Naïve, subpoblaciones CD69-CD127+ de CM y subconjuntos de EM de las células T CD8 en mujeres sin neoplasias (Neo-), pacientes con cáncer de mama (BrCA), mujeres con resistencia a la insulina (IR) y sin resistencia a la insulina (Non-IR). El triángulo blanco representa el promedio de la MFI de CD127 en las células T CD8. Las líneas verticales dentro de los grupos representan el rango de desviación estándar (SD). La significación estadística se indica cómo \* p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\* p < 0.001



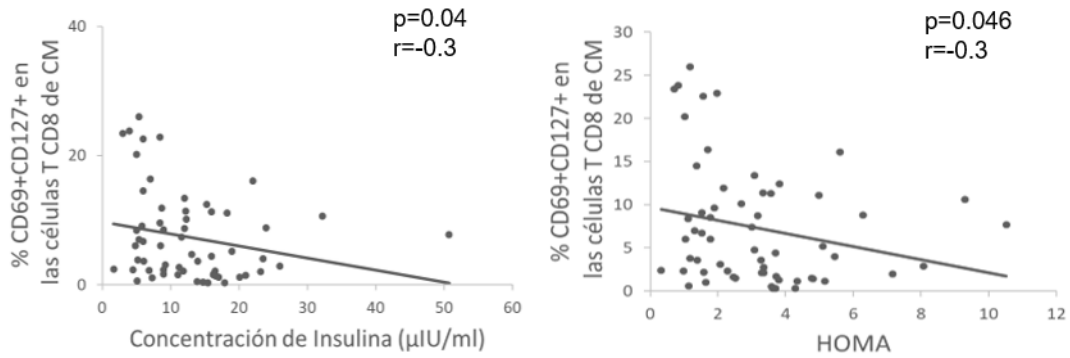
#### **7.4. Asociaciones entre la concentración de insulina y HOMA con el perfil fenotípico de células T CD8**

Se sabe que la hiperinsulinemia a menudo es tanto un resultado como un desencadenante de la IR y como observamos que el porcentaje de células T CD8 que expresan PD1, la expresión de CD28 en células T CD8 de CM y de EM, la frecuencia de células T CD8 CD69+CD127+ de CM y la expresión de CD127 en células T CD8 Naïve y de CM en mujeres con IR es menor que las que no tienen IR, hipotetizamos que la concentración de insulina y HOMA podrían estar relacionadas con estas variables.

El estudio de correlación de Pearson y Spearman reveló una correlación negativa entre los niveles de insulina, HOMA y la frecuencia PD1+ TIM3- en las células de EM ( $r = -0.3$   $p = 0.03$  para ambos) (Fig. 12a, c) y en las células de TEMRA ( $r = -0.3$   $p = 0.007$ ,  $r = -0.03$   $p = 0.01$  respectivamente) (Fig. 12b, d). Sin embargo, no se encontró correlación con las células de CM ( $p = 0.174$ ,  $p = 0.196$ , respectivamente); indicando que cuando hay una mayor concentración de insulina o HOMA hay un menor porcentaje de células T CD8 PD1+ TIM3- dentro de las poblaciones de EM y de TEMRA. No se encontró correlación entre la concentración de glucosa sérica en ayunas y el porcentaje de células T CD8 PD1+ TIM3- de CM, de EM y de TEMRA ( $p = 0.766$ ,  $p = 0.375$ ,  $p = 0.752$ , respectivamente). Asimismo, se encontró una correlación negativa entre los niveles de insulina, HOMA y el porcentaje de las células TCD8 CD69+CD127+ de CM ( $r = -0.3$   $p = 0.04$ ;  $r = -0.3$ ,  $p = 0.046$  respectivamente) (Fig. 13). No se encontró correlación entre la concentración de glucosa y la frecuencia de las células TCD8 CD69+CD127+ de CM.



**Fig. 12.** Correlaciones entre Insulina, HOMA y los subconjuntos EM y TEMRA de células T CD8 PD1 + TIM3-. (a-b) Correlación entre insulina y porcentaje de PD1 + TIM3- en las células T CD8 de EM (a) y T CD8 TEMRA (b); (c-d) correlación entre HOMA y PD1 + TIM3- en las células T CD8 de EM (c) y T CD8 TEMRA (d)



**Fig. 13.** Correlación entre Insulina, HOMA y las células T CD8 CD69+CD127+ de CM. (a) Correlación entre insulina y porcentaje de CD69+CD127+ en las células T CD8 de CM. (b) Correlación entre HOMA y porcentaje de CD69+CD127+ en las células TCD8 de CM.

### 7.5. Asociaciones entre las adipocitocinas y ghrelina con el perfil fenotípico de células T CD8

Como se mencionó anteriormente, se sabe que la adiponectina, ghrelina y leptina influyen en el progreso del tumor y tienen efectos en los linfocitos T. Por lo tanto, se analizó la relación de estas citocinas con las variables del perfil fenotípico de células T CD8 que resultaron significativamente diferentes en el ANOVA de dos factores. Encontramos correlaciones positivas y negativas entre la adiponectina, ghrelina, leptina y el perfil fenotípico de células T CD8, las cuales se describen en la Tabla 4.

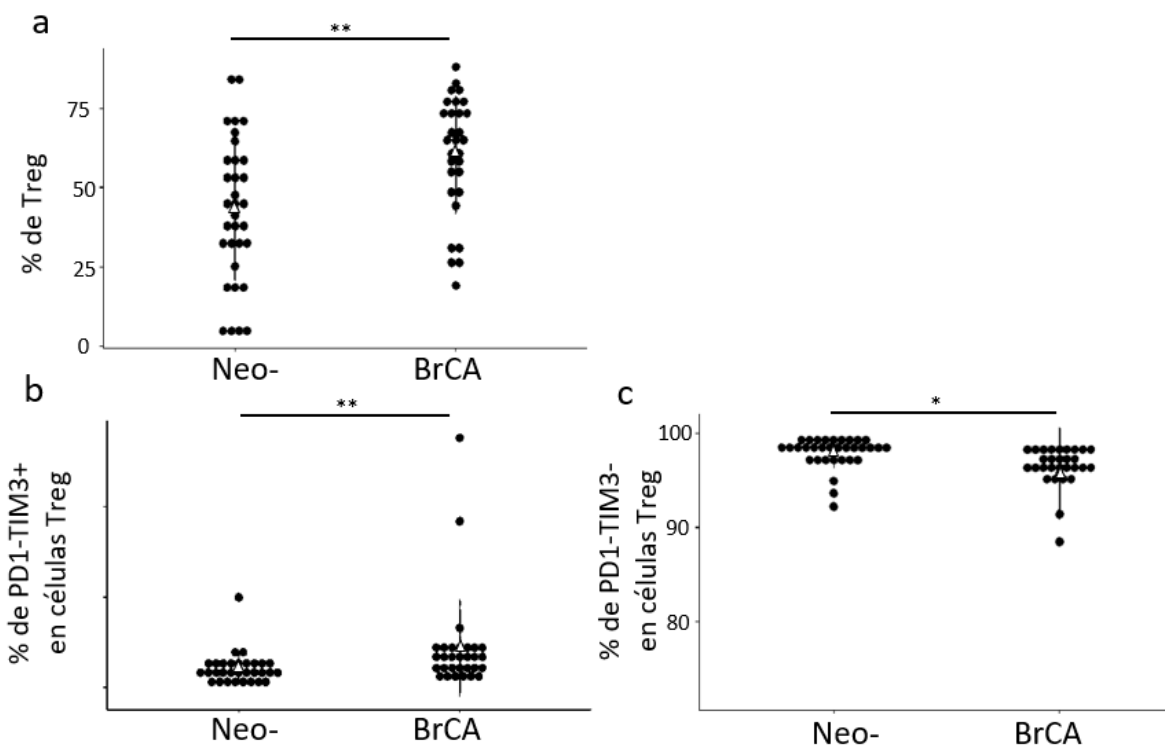
**Tabla 4.** Correlaciones entre adiponectina, ghrelina, leptina y el perfil fenotípico de células T CD8

<b>Correlaciones con Adiponectina:</b>	<b>r</b>	<b>P</b>
% PD1+ TIM3- en células T CD8 de CM	0.3	0.007
% PD1+ TIM3- en células T CD8 de EM	0.3	0.008
% PD1+ TIM3- en células T CD8 de TEMRA	0.2	0.048
% PD1- TIM3- en células T CD8 de CM	-0.3	0.02
% PD1- TIM3- en células T CD8 de EM	-0.3	0.008
MFI CD28 en células T CD8 de CM	0.3	0.02
MFI CD28 en células T CD8 de EM CD28+CTLA4-	0.3	0.009
MFI CD28 en células T CD8 de EM CD28+CTLA4+	0.3	0.02
% CD69+CD127+ en células T CD8 Naïve	0.3	0.03
% CD69+CD127+ en células T CD8 de CM	0.3	0.03
% CD69+CD127+ en células T CD8 de EM	0.3	0.02
<b>Correlaciones con Ghrelina</b>		
% PD1-TIM3+ en células T CD8 Naïve	0.4	0.002
% PD1-TIM3+ en células T CD8 de CM	0.5	0.000
% PD1+TIM3+ en células T CD8 de CM	0.3	0.013
% PD1-TIM3- en células T CD8 Naïve	-0.5	0.00
<b>Correlaciones con Leptina</b>		
% CD69+CD127- en células T CD8 Naïve	0.3	0.02
% CD69+CD127- en células T CD8 de CM	0.3	0.02

### 7.6. Porcentaje y perfil fenotípico de las células Treg en pacientes con cáncer de mama y resistencia a la insulina

Al analizar las frecuencias de las células Treg por ANOVA de dos vías, no se pudo detectar interacción entre BrCA e IR. Sin embargo, como se había reportado anteriormente (Abo-Elenein *et al.*, 2008), los pacientes con BrCA tienen un porcentaje significativamente mayor de Treg en comparación a las mujeres sin neoplasias ( $p=0.001$ ) (Fig. 14a). No obstante, no hubo diferencia significativa entre las Treg de las mujeres con IR y sin IR ( $p=0.5$ ). En cuanto a las Treg altamente supresoras, observamos que las mujeres con cáncer de mama tienen un

mayor porcentaje de Treg PD1-TIM3+ ( $p=0.006$ ) y un menor porcentaje de Treg PD1-TIM3- ( $p=0.02$ ) (Fig. 14 b, c) en comparación a las mujeres sin neoplasias. En este caso, tampoco se encontraron diferencias entre las mujeres con IR y sin IR.



**Fig.14.** Frecuencia de las células Treg, PD1-TIM3+ y PD1-TIM3- en células Treg. Porcentaje de Treg (a), PD1-TIM3+ (b) y PD1-TIM3- en células Treg en mujeres sin neoplasias (Neo-) y con cáncer de mama (BrCA). El triángulo blanco representa el porcentaje medio de las Treg. Las líneas verticales dentro de los grupos representan el rango de desviación estándar (SD). La significación estadística se indica cómo \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

### 7.7. Asociaciones entre las Treg y Treg PD1-TIM3+ con el perfil fenotípico de células T CD8.

Las células T reguladoras también participan en la regulación del agotamiento de las células T, sin embargo, no está claro cómo pueden afectar el desarrollo de células T CD8 exhaustas (Wherry *et al.* 2015). Por lo que se analizó la relación de las Treg con las variables del perfil fenotípico de células T CD8 que resultaron significativamente diferentes en el ANOVA de dos factores. Encontramos correlaciones positivas y negativas entre las Treg, las Treg altamente supresoras y el perfil fenotípico de células T CD8, las cuales se describen en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Correlaciones entre Treg y el perfil fenotípico de células T CD8.

<b>Treg</b>	<b>r</b>	<b>P</b>
% PD1-TIM3+ en células T CD8 de CM	-0.4	0.002
% PD1+TIM3- en células T CD8 de TEMRA	0.3	0.04
MFI TIM3 en células TCD8 Naïve	-0.3	0.03
MFI TIM3 en células T CD8 de CM PD1-TIM3+	-0.4	0.001
% CD69+C127- en células T CD8 Naïve	0.5	0.00
% CD69+C127- en células T CD8 de CM	0.4	0.001
% CD69+C127- en células T CD8 de TEMRA	0.3	0.007
% CD69+C127+ en células T CD8 Naïve	0.4	0.001
% CD69+C127+ en células T CD8 de TEMRA	0.3	0.04
MFI CD127 en células T CD8 Naïve	0.4	0.005
MFI CD127 en células T CD8 de CM CD69-CD127+	0.5	0.000
<b>Treg PD1-TIM3+</b>		
% PD1+TIM3- en células T CD8 de CM	0.3	0.04
% PD1+TIM3- en células T CD8 de EM	0.3	0.02
% CD69+C127- en células T CD8 de CM	0.4	0.000
% CD69+C127+ en células T CD8 Naïve	0.3	0.02
% CD69+C127+ en células T CD8 de TEMRA	0.3	0.02
MFI CD127 en células T CD8 de CM CD69-CD127+	0.3	0.049

## 8. DISCUSIÓN

En este estudio, encontramos que tanto el BrCA como la IR, ya sea juntos o por separado, tienen un efecto sobre los diferentes subconjuntos de células T CD8. Se encontró que los pacientes con BrCA tienen un mayor porcentaje de células TEMRA y EM y un porcentaje menor de células Naïve en sangre periférica. Todo esto está de acuerdo con los resultados de estudios previos realizados en las primeras etapas de BrCA (Poschke *et al.*, 2012), así como en el cáncer de cabeza y cuello (Kuss *et al.*, 2005). Curiosamente, Poschke y col. (2012) informaron que la composición de los subconjuntos observado en la sangre periférica de pacientes con cáncer reflejaba parcialmente la situación en el tumor y que la pronunciada diferenciación de células T inducida por tumor puede deberse a la expansión de los subconjuntos de memoria impulsada por citocinas en vista de las bajas frecuencias de células T específicas de antígenos tumorales observadas en pacientes con BrCA (Poschke *et al.* 2012). Además, los estudios en pacientes con cáncer de cabeza y cuello sugieren que la menor producción tímica combinada con el rápido cambio de células T CD8 Naïve alteran la homeostasis linfocítica (Kuss *et al.* 2005). Por otro lado, en mujeres con IR no se encontraron diferencias en la frecuencia de los subconjuntos de las células T CD8 circulantes, según lo informado por Fischer y col. (2017), probablemente porque son en su mayoría Naïve y no expresan el receptor de insulina, pero comienzan a expresarlo inmediatamente después de su estimulación (Fisher *et al.*, 2017).

Hasta donde sabemos, la interacción entre cáncer y IR en las células T CD8 circulantes no se ha explorado completamente. Sorprendentemente, encontramos que la expresión de TIM3 en células T CD8 Naïve circulantes es menor en mujeres resistentes a la insulina sin neoplasias y en pacientes con BrCA con o sin IR comparado con las mujeres no resistentes a la insulina sin neoplasias y que el efecto de BrCA sobre la expresión de TIM3 en células T CD8 PD1-TIM3+ de CM puede ser inverso, dependiendo de la presencia o ausencia de IR. Aunque TIM3 es una de las moléculas más importantes que median el agotamiento de células T (Anderson, 2012) y su expresión en células T CD8 circulantes se ha asociado con el estadio tumoral avanzado, metástasis y grado tumoral alto (Zhan *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2013), su función en las células T CD8 circulantes aún es controversial. Actualmente, se ha informado que, en un modelo murino, TIM3 puede potenciar la activación de células T específicas de antígeno tanto durante la estimulación aguda como también dentro del compartimento de memoria (Avery *et al.*, 2018). Varios estudios han demostrado que la función de TIM3 varía dependiendo de la circunstancia (Gorman *et al.*, 2014), y que TIM3 también puede promover respuestas de células T (Qiu *et al.*, 2012; Gorman *et al.*, 2014; Meggyes *et al.*, 2014). Existe evidencia de que las células T CD8 TIM3+ impulsan funciones efectoras más fuertes en pacientes con Tuberculosis activa (Qiu *et al.*, 2012), que TIM-3 es necesario para la expansión óptima y adquisición de la función efectora de las células T CD8 contra *Listeria monocytogenes* (Gorman *et al.*, 2014) y en la interfaz materno-fetal, las células T CD8 que expresan TIM3 no muestran las características de agotamiento, en cambio, son altamente proliferativas y producen grandes cantidades de citocinas antiinflamatorias (Meggyes *et al.*, 2014). Además, la interacción cruzada observada en este

estudio entre BrCA y IR asociado a la expresión de TIM3 en las células T CD8 de CM, refuerza la teoría de que el rol de TIM3 varía de acuerdo con el contexto. Tomando en conjunto lo anterior, sugerimos que esta disminución en la expresión de TIM3 está relacionada con un incremento del riesgo de desarrollar BrCA en mujeres resistentes a la insulina probablemente por dos mecanismos potenciales: i) las células T CD8 no podrían responder adecuadamente a la activación o reactivación debido a la disminución de TIM3 ii) o la reducción de TIM3 en estos subconjuntos podría estar asociada con el desarrollo de inflamación crónica. De acuerdo con el segundo mecanismo, se sabe que las células T CD8 juegan un papel crucial en el inicio de las cascadas inflamatorias en el tejido adiposo obeso (Nishimura *et al.*, 2009). Además, la inflamación crónica se ha asociado con el riesgo y el desarrollo del cáncer (DeNardo *et al.*, 2007; Pierce *et al.*, 2009). Por otro lado, reportes recientes muestran que la inflamación podría participar en la generación de células exhaustas (Sabzevary-Ghahfarokhi *et al.*, 2018).

Asimismo, se encontró una interacción cruzada entre BrCA y IR con respecto al porcentaje de linfocitos T CD8 de EM CD28+CTLA4+, sugiriendo que el efecto de BrCA sobre la frecuencia de estas células es inverso, dependiendo de la presencia o ausencia de IR. Normalmente CD28 se expresa constitutivamente en las células T CD8 de EM. Sin embargo, CTLA-4 no se expresa de forma constitutiva en los linfocitos T, pero se induce después de la activación de las células T, alcanzándose niveles máximos de expresión después de 48-72 h. (Bonney-Berard *et al.*, 1992). Además, CTLA-4 es uno de los principales factores reguladores intrínsecos del agotamiento de las células T (Jiang *et al.*, 2015). Tanto la señalización de CD28, como la de IL-2, pueden inducir la expresión de CTLA-4 independientemente. Por lo tanto, las señales más potentes para la activación de células T parecen ser los inductores más potentes de la expresión de CTLA-4. La inducción de la expresión de CTLA-4 requiere la entrada al ciclo celular, ya que los agentes capaces de detener las células T en la fase G1 / S también inhiben la expresión de CTLA-4 (Bonney-Berard *et al.*, 1992). Por lo que se sugiere que el aumento o disminución de esta subpoblación de las células T CD8 de EM, dependiendo de la presencia o ausencia de IR, se está refiriendo a células T CD8 activadas que proliferaron y que expresan el receptor inhibitorio CTLA-4, mismo que podría estar interfiriendo con la función de las T CD8 de EM.

Igualmente, se detectó una interacción entre BrCA y IR con respecto a la frecuencia de las células T CD8 de EM CD69+CD127+, mostrando que en las pacientes con cáncer de mama, la presencia o ausencia de IR, influye en el porcentaje de células T CD8 de EM CD69+CD127+, siendo este menor en las pacientes con cáncer de mama con IR en comparación en aquellas sin IR. Varios informes recientes indican que CD69 es un elemento importante de la maquinaria inmunoreguladora, cuyo objetivo es limitar el fenómeno inflamatorio y el daño tisular (Sancho *et al.*, 2005; González-Amaro *et al.*, 2013), mientras que CD127 está relacionado con la expansión de las células T y generalmente está disminuida en las células que están proliferando (Surh *et al.*, 2008). Por lo que un decremento en esta población sugiere que hay menos células T reguladas que no están proliferando, lo cual

simula a las células exhaustas, indicando que podría haber una menor regulación de la activación de células T CD8 y por lo tanto inflamación crónica en las pacientes con cáncer de mama y IR, lo cual podría contribuir con el progreso del cáncer de mama.

Inesperadamente, nuestro estudio en células T CD8 circulantes reveló una disminución en la expresión de TIM3 en subpoblaciones Naïve, y una reducción en la frecuencia de poblaciones PD1-TIM3 + dentro de subconjuntos Naïve y CM en pacientes con BrCA en comparación con mujeres sin neoplasias. Por lo general, los linfocitos T CD8 de pacientes con cáncer expresan más TIM3 que los controles (Zhang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2013), tal vez la disminución de la expresión TIM3 podría atribuirse a la mayor frecuencia de células T Naïve en los controles, ya que su expresión se correlaciona positivamente con este porcentaje. Además, es importante considerar que a diferencia de nuestro estudio, en los estudios donde encontraron un porcentaje incrementado de células T CD8 TIM3+ en pacientes con cáncer, evaluaron TIM3 en linfocitos T CD8 circulantes en pacientes con cáncer tratados quirúrgicamente o con una frecuencia de consumo de alcohol más alta que los controles (Zhang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2013), lo cual podría influir en la inflamación, ya que los pacientes tratados quirúrgicamente pueden tener un proceso inflamatorio postquirúrgico y se sabe que los alcohólicos cursan con un proceso inflamatorio (Wang *et al.*, 2010). Así mismo, como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que la inflamación podría participar en la generación de células exhaustas (Sabzevary-Ghahfarokhi *et al.*, 2018). Por otro lado, recientemente se encontró que, aunque la presencia de TIL TIM3+ en tumores tempranos de cáncer de mama se relaciona con factores pronóstico pobres, también se asocia con una mayor supervivencia específica (Burugu *et al.*, 2018), podría ser entonces que esta disminución de linfocitos circulantes T CD8 TIM3+ esté relacionado con una menor supervivencia específica debido a la disminución de la activación o reactivación de los linfocitos T CD8 (Avery *et al.*, 2018).

También observamos que en los subconjuntos de células T CD8 de CM, de EM y de TEMRA las poblaciones de células T CD8 PD1+TIM3- eran más altas en mujeres con BrCA comparada con mujeres sin neoplasias, lo cual es similar a lo reportado por Poschke y col. (2012), sugiriendo la activación previa de los linfocitos T CD8 o un estado de regulación/agotamiento. En contraste, los subconjuntos de células T CD8 de CM, de EM y de TEMRA las poblaciones de células T CD8 PD1+ TIM3- son más bajas en mujeres con IR en comparación con aquellas sin IR y se pudo observar una correlación negativa entre el HOMA, la concentración de insulina y la frecuencia de las células T CD8 PD1+TIM3- de EM y de TEMRA. Estos resultados sugieren que los altos niveles de insulina pueden estar relacionados con un estado de inflamación. De acuerdo con los resultados de un estudio realizado en un modelo murino de obesidad inducida por dieta con hiperinsulinemia y IR, sus células Tregs tuvieron una reducción significativa en la cantidad de ARNm de IL-10, una disminución de la producción de IL-10 y un aumento en la expresión de IFN $\gamma$  en comparación con ratones normales (Han *et al.*, 2014). Además, en un modelo murino, el silenciamiento del receptor de insulina provocó una disminución de la citotoxicidad de las células T CD8 y



una proliferación reducida, sugiriendo que el receptor de insulina es necesario para la actividad completa de las células T en una situación fisiológica (Fischer *et al.*, 2017). Esta función alterada podría estar relacionada con una mayor expresión de PD1, ya que, en nuestro estudio, cuando los niveles de insulina se reducen, las poblaciones de PD1+ se elevan, mientras que en los niños con diabetes tipo uno, no se puede regular al alza la expresión de PD1 después de la estimulación del receptor de las células T CD8 circulantes y de 4 a 6 meses después de la terapia con insulina el PD1 se normaliza (Granados *et al.*, 2017). De manera interesante, se sabe que PD1 altera la reprogramación metabólica de las células T mediante la inhibición de la glucólisis y la activación de un metabolismo aerobio basado principalmente en lipólisis y oxidación de ácidos grasos (Patsoukis *et al.*, 2015). Por el contrario, la insulina promueve la glucólisis e inhibe el metabolismo aerobio. Según esta premisa, la correlación negativa que encontramos entre la concentración de insulina y las células T CD8 PD1+ TIM3- podría deberse a los efectos contrarios entre PD1 e insulina. Todo lo anterior sugiere que la disminución de PD1 dentro de las poblaciones de linfocitos T CD8 podría estar asociada con el progreso del BrCA, tal vez asociado a la inflamación que, como mencionamos anteriormente, está relacionada con el riesgo y el desarrollo del cáncer y con la generación de células exhaustas.

La expresión de CD28 se encuentra incrementada en las pacientes con BrCA en comparación con las mujeres sin neoplasias y disminuida en las mujeres con IR en comparación a las aquellas sin IR. Este fenotipo podría estar asociado a una proliferación antígeno-específica de los subconjuntos de T CD8 en pacientes con BrCA y a una proliferación homeostática en pacientes con IR ocasionada por citocinas inflamatorias. Se piensa que la historia proliferativa de las poblaciones de células T está indicada por la expresión de CD28. Los datos de Larbi *et al* (2014) sugieren que la regulación de la expresión de CD28 difiere notablemente entre las células T que se activan después del encuentro con su antígeno y las células T que no han sido presentadas con su antígeno pero que proliferan en respuesta a estímulos homeostáticos. Es probable que la activación de las células T mediada por TCR / CD28 y otras moléculas co-estimuladoras induzcan la señalización que impulsa y mantiene los aumentos en la expresión de CD28, mientras que la señalización homeostática pasa por alto la vía TCR / CD28 y eventos de señalización que regulan positivamente la expresión de CD28 (Larbi *et al.*, 2014). Citocinas, como IL-7, IL-15, están involucradas en la mediación de tales eventos (Larbi *et al.*, 2014, Surh *et al.*, 2008). Además, se sabe que cuando las células T de memoria se cultivan con IL-7 e IL-15 proliferan extensivamente a diferencia de las células Naïve que no proliferan. En contraste, cuando las células T Naïve y las células T de memoria se exponen a una combinación de IL-7, IL-15, TNF, IL-6 e IL10, todas las células T se dividen, sugiriendo que la mezcla de TNF, IL-6 e IL-10 provee a las células T Naïve con la capacidad de responder a IL-15 e IL-7 y mejora la capacidad de respuesta de las células T de memoria (Geginat *et al.*, 2001).

Este estudio también reveló un aumento en la frecuencia de células T CD8 CD69+ (TCD8 CD69+CD127+ y T CD8 CD69+CD127-) circulantes en pacientes con cáncer de mama en

comparación con mujeres sin neoplasias, lo cual es similar a lo reportado por Poschke y col (2012) quienes observaron un incremento de células T CD8 CD69+ en pacientes con cáncer de mama comparado con pacientes con tumores benignos, indicando cierto grado de activación dependiente del tumor (Poschke *et al.*, 2012). Cómo se señaló anteriormente, el incremento de las células T CD8 CD69+CD127+ podría estar relacionado con un estado de agotamiento en pacientes con cáncer de mama, al igual que el incremento de las células T CD8 CD69+CD127-, ya que se ha reportado que las células exhaustas presentan niveles altos de CD69 y niveles bajos de CD127, que llegan a ser indetectables (Fuller *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2010). Sin embargo, el fenotipo T CD8 CD69+CD127- podría también estar relacionado con un estado de activación, ya que CD69 es considerado un marcador de activación temprana (Fernández-Riejos *et al.*, 2010) y la ausencia de CD127 podría indicar que están proliferando (Surh *et al.*, 2008). Por otro lado, se encontró que las mujeres con IR presentaron una frecuencia de células T CD8 CD69+CD127+ significativamente menor en comparación a las mujeres sin IR, lo cual podría estar relacionado con el desarrollo de inflamación en las mujeres con RI como se sugirió anteriormente. En cuanto a la expresión diferencial de CD127 en pacientes con cáncer de mama y en mujeres con IR con respecto a mujeres sin neoplasias y mujeres sin IR, respectivamente, se sabe que la expresión de CD127 es regulada por diversas citocinas, ya sea induciendo su expresión como el TNF o inhibiéndola como la IL-7, IL-2, IL-4 e IL-6 (Mazzucchelli *et al.*, 2007). Algunas de estas citocinas se encuentran elevadas tanto en pacientes con cáncer de mama como en sujetos con obesidad como son TNF e IL-6 (Hussein *et al.*, 2004; Berberoglu *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2015; Khaodhiar *et al.*, 2004), mientras que en sujetos con obesidad las citocinas como IL-7 e IL-4 también están incrementadas (Mauri *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2015). Por lo que se sugiere que el conjunto de citocinas elevadas en obesidad, la mayoría inhibitoras del receptor CD127, podrían estar asociadas al decremento de este receptor en mujeres con IR. Además, en un modelo murino se confirmó que la IL-7 produce IR e incrementa la producción de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF por monocitos. (Lucas *et al.*, 2012). Mientras que en pacientes con cáncer de mama el balance entre la citocina inductora TNF y la inhibidora IL-6 podría estar asociada con el incremento de la expresión de CD127. Por otro lado, también se sabe que una señalización fuerte del TCR por su antígeno ocasiona la expansión de las células T y por ende la disminución del CD127 mediada por la IL-2 (Surh *et al.*, 2008), por lo que, también podría sugerirse que las células T CD8 Naïve y CM de pacientes con cáncer no están proliferando debido a que no están encontrando su antígeno o existen defectos en la señalización de IL-7, como lo reportado por Vudattu y col (2007) en pacientes con cáncer de mama, donde la mayoría de estas células presenta una disminución de la producción de IL-2 y de IFN $\gamma$  (Vudattu *et al.*, 2007). Mientras que la expresión elevada de CD127 en los linfocitos de TEMRA y de EM de pacientes con cáncer podría deberse a un incremento de la frecuencia de esta subpoblación en las pacientes en comparación con las mujeres sin neoplasias. Considerando lo anterior una expresión de CD127 reducida en mujeres con IR podría estar indicando la proliferación continua de las células T CD8, lo cual podría ocasionar inflamación crónica. También se observó una correlación negativa entre la insulina y el

porcentaje de células T CD8 CD69+CD127+ de CM, lo cual refuerza la teoría de que la insulina está relacionada con un estado inflamatorio.

En este estudio encontramos una correlación negativa entre los niveles de insulina, HOMA y la concentración de adiponectina y ghrelina. Así mismo, se encontró una correlación positiva entre los niveles de insulina, HOMA y la concentración de leptina. Estos resultados están de acuerdo con los resultados de estudios previos realizados en ratones con IR inducida por dieta (Maeda *et al.*, 2002) en el caso de adiponectina, con los resultados de los estudios realizados en la población de Oulu, Finlandia, en la población de Terranova y en los sujetos obesos reclutados en la universidad de Stanford en el caso de ghrelina (Pöykkö *et al.*, 2003; McLaughlin *et al.*, 2004; Amini *et al.*, 2012) y de acuerdo con los resultados de estudios previos realizados tanto en la población saludable del norte de la India (Yadav *et al.*, 2011) como en los realizados en obesidad mórbida de mujeres Nigerianas (Osegbe *et al.*, 2016) en el caso de la leptina. Así mismo, se ha reportado que la insulina altera la concentración de algunas adipocitocinas y ghrelina: disminuye los niveles de adiponectina (Yadav *et al.*, 2013) y ghrelina circulante (Chabot *et al.*, 2014) y estimula la síntesis y secreción de leptina (Paz-Filho *et al.*, 2012). Se sabe que estas adipocitocinas y la ghrelina influyen en el progreso del tumor y tienen efectos en los linfocitos T (Paz-Filho *et al.*, 2011; Carbone *et al.*, 2012, Grönberg M *et al.*, 2012, Baatar *et al.*, 2011) Por lo que se sugiere que la insulina podría estar asociada con la modulación de la concentración de las adipocitocinas y ghrelina afectando indirectamente el perfil fenotípico. También encontramos que las mujeres con IR tienen una menor concentración de adiponectina, y ghrelina y una mayor concentración de leptina, lo cual concuerda con estudios realizados por Abassi y col. (2004), McLaughlin y col. (2004) y Zuo y col. (2013) respectivamente. Además, observamos correlaciones positivas y negativas entre la adiponectina, ghrelina, leptina y el perfil fenotípico de células T CD8. Por lo tanto, cuando hay una menor concentración de adiponectina hay un menor porcentaje de linfocitos T CD8 de CM y de EM PD1+ TIM3-, de expresión de CD28 en las células T CD8 de CM y EM y de porcentaje de células T CD8 Naïve, de CM y de EM CD69+CD127+, mientras que hay una mayor frecuencia de linfocitos T CD8 de CM y EM PD1-TIM3-. Así mismo cuando hay un decremento en la concentración de ghrelina hay un decremento en el porcentaje de linfocitos T CD8 Naïve y de CM PD1-TIM3+ y T CD8 de CM PD1+TIM3+, mientras que hay un incremento de células T CD8 Naïve PD1-TIM3-. En cuanto a la leptina, cuando hay una mayor concentración de ésta hay un mayor porcentaje de células T CD8 de CM y de EM CD69+CD127-, lo cual era de esperarse, ya que se ha reportado que la leptina aumenta la expresión de marcadores de activación temprana como CD69 en presencia de concentraciones subóptimas de activadores (Fernández-Riejos *et al.*, 2010). Todo lo anterior sugiere que estos cambios en mujeres con IR están asociados a un perfil inflamatorio que puede llevar al desarrollo de cáncer o al desarrollo de células T CD8 exhaustas, para tratar de mantener la homeostasis. Pues como se mencionó anteriormente: PD1 es un receptor co-inhibidor y la baja expresión de CD28 podría estar relacionada con una proliferación homeostática inducida por citocinas inflamatorias. Por otro lado, la función de TIM3 es controversial, puede funcionar como receptor co-inhibidor o receptor co-activador o estar

asociado con la producción de grandes cantidades de citocinas anti-inflamatorias, dependiendo de la circunstancia en que se encuentre (Gorman *et al.*, 2014; Meggyes *et al.*, 2014). En contraste, las células T CD8 CD69+CD127+ está relacionado con un fenotipo exhausto y T CD8 CD69+CD127- podría está asociado con un fenotipo de activación o con un fenotipo exhausto. Así mismo, otros estudios han reportado que un estado inflamatorio puede llevar a la generación de células exhaustas, lo cual puede beneficiar o perjudicar la salud del paciente, dependiendo la circunstancia. Por ejemplo, se ha visto que las células exhaustas evitan que los ratones con linfocitosis hemofagocítica mueran por una inflamación excesiva (Kögl *et al.*, 2013), sin embargo, en pacientes con sepsis, la generación de células exhaustas los hizo más susceptibles a una segunda infección (Inoue *et al.*, 2014).

Observamos que las pacientes con cáncer de mama tienen una mayor frecuencia de células Treg circulantes en comparación al grupo de mujeres sin neoplasias, lo cual concuerda con estudios realizados por Lianage y col (2002), Abo-Elenein y col (2008) y Watanabe *et al.*, 2010. También se observa un incremento de la población de Treg altamente supresoras (TIM3+) circulantes en pacientes con cáncer de mama en comparación con mujeres sin neoplasias. Estas células se han identificado en tumores sólidos murinos de cáncer de mama, colon y melanoma (Sakuishi *et al.*, 2013), de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, donde su presencia se asocia con etapas avanzadas de cáncer (Gao *et al.*, 2012) y en tumores sólidos y sangre periférica de pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), donde observaron que los Treg TIM3+ infiltrados en tumor tienen una mayor capacidad para inhibir la proliferación de las células T Naïve que las Treg TIM3- (Liu *et al.*, 2018). En los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, se observó que el porcentaje de Treg TIM3+ en sangre periférica de individuos sanos aumenta después de la estimulación de su TCR. Por lo que las pacientes con cáncer de mama podrían tener una mayor frecuencia de Treg TIM3+ debido a su constante estimulación por antígenos asociados al tumor. En contraste, no hubo diferencias en la frecuencia de Treg y Treg altamente supresoras entre mujeres con IR y sin IR. Tampoco se encontró una correlación entre insulina, HOMA y las Treg o Treg TIM3+, lo cual es similar a lo encontrado por Wagner y col (2013) en una población de individuos obesos y no obesos. Probablemente el porcentaje de Treg y Treg altamente supresores en mujeres con IR no se ve afectado en sangre periférica, sin embargo, podría ser diferente en otros tejidos, ya que en un estudio murino se reportó que las Tregs del tejido adiposo visceral de ratones obesos con IR presentaron una reducción significativa en comparación con ratones sin IR (Han *et al.*, 2014).

Encontramos correlaciones positivas y negativas entre las Treg, Treg PD1-TIM3+ y algunas variables del perfil fenotípico de las células T CD8, indicando que cuando disminuyen las Treg y Treg altamente supresoras, disminuyen la expresión de CD127 en células T CD8 de CM CD69-CD127+, el porcentaje de células T CD8 de CM CD8 CD69+CD127-, de células T CD8 Naïve y de TEMRA CD69+CD127+. Mientras que cuando disminuyen las células Treg hay un incremento del porcentaje de células TCD8 de CM PD1-TIM3+, de la expresión de TIM3 en células TCD8 Naïve y T CD8 de CM PD1-TIM3+ y una disminución de células

T CD8 de TEMRA PD1+TIM3<sup>-</sup>, T CD8 Naïve y TEMRA CD69+CD127<sup>-</sup> y de la expresión de CD127 en células TCD8 Naïve. Por otro lado, cuando disminuyen las Treg altamente supresoras hay un decremento de las células T CD8 de CM y EM PD1+TIM3<sup>-</sup>. La diferencia entre las correlaciones que hay entre Treg y Treg altamente supresoras, podría deberse a que la frecuencia de las Treg altamente supresoras es muy baja en la sangre periférica de las mujeres, lo cual coincide con lo reportado por Gao y col. (2012). Las correlaciones encontradas entre Treg, Treg PD1-TIM3<sup>+</sup> y las células T CD8 PD1-TIM3<sup>+</sup> y PD1+TIM3<sup>-</sup>, es similar a otro estudio realizado, donde observaron que después de 5 días de depletar las Treg (de las cuales el 75% eran Tregs TIM3<sup>+</sup>) *in vivo* en ratones con melanoma disminuía la frecuencia de T CD8 PD1+TIM3<sup>-</sup> y aumentaba la frecuencia de los linfocitos T CD8 PD1+TIM3<sup>+</sup> y PD1-TIM3<sup>+</sup> en el tumor, sin embargo al comparar la función de éstas se dieron cuenta que producían cantidades significativamente mayores de TNF e IFN $\gamma$  que las células TCD8 PD1+TIM3<sup>+</sup> y PD1-TIM3<sup>+</sup> de los ratones a los cuales no se les había depletado las Treg. Sugiriendo que la inhibición temprana de TIM3 durante el desarrollo del tumor podría bloquear a las Treg TIM3<sup>+</sup> interfiriendo con el desarrollo de las T CD8 exhaustas (Sakuishi *et al.*, 2013). Sin embargo, es diferente a lo encontrado en un estudio *in vitro*, en el cual observaron que 12 h después de agregar células T CD8 antígeno específicas a un cultivo de células dendríticas previamente activadas con antígeno y co-cultivadas con células Treg antígeno específicas, la frecuencia de células T CD8 PD1+TIM3<sup>+</sup> aumentaba y los linfocitos T CD8 PD1+TIM3<sup>-</sup> disminuía, en comparación a las células T CD8 que fueron agregadas a un cultivo de células dendríticas activadas con antígeno que no fueron co-cultivadas con células Treg (Bauer *et al.*, 2014). Se ha sugerido que las Treg pueden inducir la co-expresión de PD1 y TIM3 en las células T CD8 indirectamente a través de la regulación de las células dendríticas (Bauer *et al.*, 2014). Es probable que las diferencias entre estudios se deban al modelo utilizado, ya que uno es *in vivo* y el otro es *in vitro*. Además, en un modelo murino de carcinoma mamario se demostró que al depletar las Tregs, incrementa el número de subconjuntos de células dendríticas residentes en los ganglios linfáticos cercanos al tumor (Goudin *et al.*, 2016), y se sabe que las células dendríticas funcionales pueden inducir la co-expresión de PD1 y TIM3 en las células T CD8 (Bauer *et al.*, 2014). Hasta donde sabemos, no se han realizado estudios, donde se evalúen las correlaciones entre las Treg, Treg altamente supresoras y las células T CD8 CD69+CD127<sup>-</sup>, CD69+CD127<sup>+</sup> y la expresión de CD127. Las correlaciones observadas en este estudio sugieren que, en pacientes con cáncer de mama, las Treg podrían estar asociadas con la generación de células exhaustas como lo propuesto por Wherry y col (2015), pues como se mencionó anteriormente las células T CD8 CD69+CD127<sup>+</sup> y T CD8 CD69+CD127<sup>-</sup> pueden estar relacionadas con un fenotipo exhausto y presentan una correlación positiva con las Treg y Treg altamente supresoras. La disminución de la expresión de CD127 podría estar asociada a una mayor proliferación y ésta correlaciona positivamente con las Treg. Mientras que las células T CD8 PD1-TIM3<sup>+</sup> podrían ser funcionales (Sakuishi *et al.*, 2013) y están relacionadas negativamente con las células Treg.

## 9. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que tanto el cáncer de mama como la resistencia a la insulina, ya sea juntos o por separado, tienen un efecto sobre el perfil fenotípico de las células T CD8.

Se encontraron interacciones entre el cáncer de mama y la IR con respecto a la expresión de TIM3 en linfocitos T CD8 Naïve y en T CD8 de CM PD1-TIM3+, el porcentaje de linfocitos T CD8 de EM CD69+CD127+ y T CD8 de EM CD28+CTLA4+. La disminución de la expresión de TIM3 tanto en mujeres sin neoplasias con IR y en mujeres con BrCA en comparación con mujeres sin neoplasias sin IR podría estar relacionada con un incremento en el riesgo y desarrollo de BrCA por dos mecanismos: por la disminución de la activación o reactivación de las células T o por el desarrollo de inflamación crónica, dependiendo del contexto en el que se encuentre. Las pacientes con cáncer de mama y IR presentan menos linfocitos T CD8 de EM CD69+CD127+, fenotipo que podría considerarse exhausto, en comparación con las pacientes con cáncer de mama no resistentes a la insulina. Mientras que el porcentaje de linfocitos T CD8 EM CD28+CTLA4+ y la expresión de TIM3 en T CD8 CM PD1-TIM3+ en pacientes con cáncer de mama es inverso dependiendo de la presencia o ausencia de la IR.

La disminución del porcentaje de células T CD8 TIM3+, el aumento del porcentaje de células T CD8 PD1+, T CD8 CD69+ (T CD8 CD69+CD127+ y T CD8 CD69+CD127-), Treg y Treg TIM3+, de la expresión de CD28 y CD127, sugiere un perfil de células exhaustas, lo cual está asociado con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Así mismo, las correlaciones observadas entre las Treg y los linfocitos T CD8 sugieren que, en pacientes con cáncer de mama, las Treg podrían estar asociadas con la generación de células exhaustas.

Por otro lado, la disminución del porcentaje de células T CD8 PD1+, T CD8 CD69+CD127+, de la expresión de CD28 y CD127 en mujeres con resistencia a la insulina se asocia con un perfil de inflamación, lo cual está asociado con el desarrollo de cáncer y podría participar en la generación de células exhaustas para tratar de mantener la homeostasis. Además, nuestros estudios sugieren que la insulina podría estar regulando indirectamente el perfil fenotípico de las células T CD8, al parecer hacia un perfil de inflamación, a través de la modulación de la concentración de leptina, adiponectina y ghrelina.

## **10. PERSPECTIVAS**

Analizar la co-expresión de todas las moléculas evaluadas en este estudio (PD1, TIM3, CTLA4, CD69, CD127) al mismo tiempo en cada uno de los subconjuntos de los linfocitos T CD8 de pacientes con cáncer de mama y IR para poder obtener una mejor caracterización de estas células.

Evaluar la función de las células T CD8 que tuvieron un perfil fenotípico diferente en pacientes con cáncer de mama en comparación con aquellas sin neoplasias y en pacientes con IR en comparación con aquellas sin IR, así como en las interacciones entre cáncer de mama y IR; para poder confirmar su agotamiento o participación en el proceso de inflamación.

Complementar la información con la evaluación de citocinas en el suero de las pacientes relacionadas con la inflamación como TNF, IFN $\gamma$ , IL-6, E IL-1 $\beta$  y con la evaluación de otros leucocitos.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2010). Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
- Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, Hayden J, Reaven GM, Reaven PD. Discrimination Between Obesity and Insulin Resistance in the Relationship with Adiponectin. *Diabetes*. 2004;53(3):585-90.
- Abo-Elenein A, Elgohary SE, Hashish A, El-Halaby E. Significance of immunoregulatory T cells in different stages of breast cancer patients. *Egypt J Immunol*. 2008;15(2):145-52
- Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6). pii: E1321.
- Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL. Expression of the Sphingosine 1-Phosphate Receptor, S1P<sub>1</sub>, on T-cells Controls Thymic Emigration. *J Biol Chem*. 2004;279(15):15396-401
- Amini P, Wadden D, Cahill F, Randell E, Vasdev S, *et al*. Serum Acylated Ghrelin Is Negatively Correlated with the Insulin Resistance in the CODING study. *PLoS One*. 2012;7(9): e45657.
- Anderson AC (2012) Tim-3, a negative regulator of anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 24:213-216.
- Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*. 2016;44(5):989-1004
- Arce-Salinas C, Aguilar-Ponce JL, Villarreal-Garza C, Lara-Medina FU, Olvera-Caraza D, Alvarado Miranda A, Flores-Díaz D, Mohar A. Overweight and obesity as poor prognostic factors in locally advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 146:183–188
- Avery L, Filderman J, Szymczak-Worman AL, Kane LP (2018) Tim-3 co-stimulation promotes short-term effector T cells, restricts memory precursors and is dispensable for T cell exhaustion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(10):2455-2460
- Baatar D, Patel K, Taub DD. The effects of ghrelin on inflammation and the immune system. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011; 340: 44– 58
- Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 1;24(34):5373-80.
- Bauer CA, Kim EY, Marangoni F, Carrizosa E, Claudio NM, Mempel TR. Dynamic Treg interactions with intratumoral APCs promote local CTL dysfunction. *J Clin Invest*. 2014 Jun;124(6):2425-40
- Bays EH, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther*. 2008; 6(3): 343-368.



- Berberoglu U, Yildirim E, Celen O. Serum levels of tumor necrosis factor alpha correlate with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Biol Markers*. 2004;19(2):130-4
- Berclaz G, Li S, Price KN, Coates AS, Castiglione-Gertsch M, Rudenstam CM, Holmberg SB, Lindtner J, Erien D, Collins J, Snyder R, Thürlimann B, Fey MF, Mendiola C, Werner ID, Simoncini E, Crivellari D, Gelber RD, Goldhirsch A. Body mass index as a prognostic feature in operable breast cancer: The International Breast Cancer Study Group experience. *Ann Oncol*. 2004;15(6):875-84.
- Bland KI, Copeland EM, Klimberg VS, Gradishar WJ. (2018). *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases* (1280). Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
- Bonnefoy-Berard N, Besnard V, Morel P, Hmama Z, Verrier B, Mandrand B, Vincent C, Revillard JP. Second Signals for Lymphocyte Activation. *Dev Biol Stand*. 1992;77:41-8.
- Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016 Feb;39(1):98-106
- Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. TIM-3 expression in breast cancer. *Oncoimmunology*. 2018; 7(11): e1502128.
- Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. LAG-3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: clinical correlates and association with PD-1/PD-L1+ tumors. *Ann Oncol*. 2017 Dec 1;28(12):2977-2984.
- Caramalho I, Nunes-Cabaco H, Foxall RB, Sousa AE. Regulatory T-Cell Development in the human Thymus. *Front Immunol*. 2015;6:395
- Carbone F, Rocca C, Matarese G. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* 2012; 94: 2082-2088
- Castro AVB, Kolka CM, Kim SP, Bergman RN. Obesity, insulin resistance and comorbidities – Mechanisms of association. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014; 58(6): 600–609.
- Catakovic K, Klieser E, Neureiter, Geisberger R. T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. *Cell Commun Signal*. 2017; 15: 1.
- Chabot F, Caron A, Laplante M, St-Pierre DH. Interrelationships between ghrelin, insulin and glucose homeostasis: Physiological relevance. *World J Diabetes*. 2014;5(3):328-41
- Chen J, Li J, Lim FC, Wu Q, Douek DC, Scott DK, Ravussin E, Hsu HC, Jazwinski SM, Mountz JD. Maintenance of naïve CD8 T cells in nonagenarians by leptin, IGFBP3 and T3. *Mech Ageing Dev*. 2010;131(1):29-37.
- Chen L, Chen R, Wang H, Liang F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:508409
- Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(5):336-47.
- Cheng X, Folco EJ, Shimizu K, Libby P. Adiponectin Induces Pro-Inflammatory Programs in Human Macrophages and CD4<sup>+</sup>T Cells. *J Biol Chem*. 2012; 287(44): 36896–36904.

- Chopin LK, Seim I, Walpole CM, Herington AC. The Ghrelin Axis—Does It Have an Appetite for Cancer Progression. *Endocr Rev.* 2012 Dec;33(6):849-91
- Cibrian D, Saiz ML, de la Fuente H, Sánchez-Díaz R, Moreno-Gonzalo O, *et al.* CD69 controls the uptake of L-tryptophan through LAT1-CD98 and AhR-dependent secretion of IL-22 in psoriasis. *Nat Immunol.* 2016 Aug;17(8):985-96.
- Cibrian D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol.* 2017;47(6):946-953
- Cinkajzlová A, Mráz M, Haluzík M. Lymphocytes and macrophages in adipose tissue in obesity: markers or makers of subclinical inflammation? *Protoplasma* 2017; 254:1219-1232
- Cui H, López M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2017 Jun;13(6):338-351
- Daling JR, Malone KE, Doody DR, Johnson LG, Gralow JR, Porter PL. Relation of body mass index to tumor markers and survival among young women with invasive ductal breast carcinoma. *Cancer.* 2001 Aug 15;92(4):720-9.
- Das M, Zhu C, Kuchroo VK. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol Rev.* 2017;276(1):97-111
- DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2007; 9:212.
- Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, Lillard JW Jr, Taub DD. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest.* 2004 Jul;114(1):57-66.
- Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* 2001; 8: 793-800
- Engin A. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 960:571-606.
- Ewertz M, Maj-Britt J, Gunnarsdóttir KA, Hojris I, Jakobsen EH, Nielsen D, Stenbygaard LE, Tange UB, Cold S. Effect of obesity on prognosis after early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2011; 29(1): 25-31.
- Facey A, Dilworth L, Irving R. A Review of the Leptin Hormone and the Association with Obesity and Diabetes Mellitus. *J J Diabetes Metab* 2017; 8:727
- Fernández-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, Martín-Romero C, Pérez-Pérez A, González-Yanes C, Sánchez-Margalet V. Role of Leptin in the Activation of Immune Cells. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:568343
- Fischer HJ, Sie C, Schumann E, Witte AK, Dressel R, *et al.* The Insulin Receptor Plays a Critical Role in T Cell Function and Adaptive Immunity. *J Immunol.* 2017; 198(5):1910-1920
- Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2010 Jul; 236:219-42

- Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, Sharpe AH. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009;206(13):3015-29.
- Freeman GJ, Casasnova JM, Umetsu DT, DeKruiff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2010;235(1):172-89
- Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* 2002; 99:3892-3904
- Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9(1):25-53.
- Fuertes-Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, Speiser DE. Inhibitory receptors beyond T cell exhaustion. *Front Immunol* 2015; 6:310.
- Fuller MJ, Hilderman DA, Sabbaj S, Gaddis DE, Tebo AE, Shang L, Goepfert PA, Zajac AJ. Emergence of CD127<sup>high</sup>Functionally Competent Memory T Cells Is Compromised by High Viral Loads and Inadequate T Cell Help. *J Immunol* May 15, 2005, 174 (10) 5926-5930
- Gandhi R, Farez MF, Wang Y, Kozoriz D, Quintana FJ, Weiner HL. Cutting edge: human latency-associated peptide + T cells: a novel regulatory T cell subset. *J Immunol*. 2010;184(9):4620-4
- Gao X, Zhu Y, Li G, Huang H, Zhang G, Wang F, Sun J, Yang Q, Zhang X, Lu B. TIM-3 Expression Characterizes Regulatory T Cells in Tumor Tissues and Is Associated with Lung Cancer Progression. *PLoS One*. 2012;7(2): e30676.
- Garmendia ML, Periera A, Alvarado ME, Atalah E. Relation between insulin resistance and breast cancer among Chilean women. *Ann Epidemiol*. 2007 Jun;17(6):403-9.
- Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven Proliferation and Differentiation of Human Naive, Central Memory, and Effector Memory CD4 T Cells. *J Exp Med*. 2001;194(12):1711-9.
- Gerriets VA, Danzaki K, Kishton RJ, Eisner W, Nichols AG, Saucillo DC, Shinohara ML, MacIver NJ. Leptin Directly Promotes T Cell Glycolytic Metabolism to Drive Effector T cell Differentiation in Autoimmunity. *Eur J Immunol*. 2016;46(8):1970-83.
- Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, Elkum N, Alshabanah M, Bin Amer S, Tulbah A, Ajarim D, Al-Tweigeri T, Dermime S. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia*. 2006;8(3):190-8.
- Giovanni P y Silvestris F. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *Jornal of Obesiti* 2013; 2013: 1-11
- González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F, Martín P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med*. 2013;19(10):625-32
- Gorman JV, Cogan JD. Regulation of T cell responses by the receptor molecule Tim-3. *Immunol Res*. 2014;59(1-3):56-65
- Goudin N, Chappert P, Mégret J, Gross DA, Rocha B, Azogui O .Depletion of Regulatory T Cells Induces High Numbers of Dendritic Cells and Unmasks a Subset

- of Anti-Tumour CD8<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> PD-1<sup>lo</sup> Effector T Cells. *PLoS One*. 2016 Jun 24;11(6):e0157822.
- Granados HM, Draghi A, Tsurutani N, Wright K, Fernandez ML, Sylvester FA, Vella A. Programmed cell death-1, PD-1, is dysregulated in T cells from children with new onset type 1 diabetes. *PLoS One*. 2017;12(9): e0183887
  - Grönberg M, Ahlin C, Naeser Y, Janson ET, Holmberg L, Fjällskog ML. Ghrelin is a prognostic marker and a potential therapeutic target in breast cancer. *PLoS One*. 2017;12(4): e0176059.
  - Grönberg M, Fjällskog ML, Jirström K, Janson ET. Expression of ghrelin is correlated to a favorable outcome in invasive breast cancer. *Acta Oncol*. 2012;51(3):386-93
  - Gunter MJ, Xie X, Xue X, Kabat G, Rohan TE, *et al*. Breast cancer risk in metabolically healthy but overweight postmenopausal women. *Cancer Res*. 2015 Jan 15;75(2):270-4
  - Hammarstedt A, Graham TE, Kahn BB. Adipose tissue dysregulation and reduced insulin sensitivity in non-obese individuals with enlarged abdominal adipose cells. *Diabetol Metab Syndr*. 2012;4(1):42.
  - Han JM, Patterson SJ, Speck M, Ehnes JA, Levings MK. Insulin inhibits IL-10-mediated regulatory T cell function: implications for obesity. *J Immunol*. 2014 Jan 15;192(2):623-9.
  - Henninger AM, Eliasson B, Jenndahl LE, Hammarstedt A. Adipocyte Hypertrophy, Inflammation and Fibrosis Characterize Subcutaneous Adipose Tissue of Healthy, Non-Obese Subjects Predisposed to Type 2 Diabetes. *PLoS One*. 2014 Aug 22;9(8):e105262.
  - Hernández M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016: Resultados ponderados. [Presentación] Instituto Nacional de Salud Pública. 14 de diciembre 2016.
  - Homae F, Ghaffarzadehgan K, Aziminia A, Ghodrati H, Izanloo A, Ziaolhagh R, Khales SA. Comparison of Adiponectin Level in Women with Breast Cancer with Healthy Women. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology* 2017;2(4):93-96
  - Hussein MZ, Al Fikky A, Abdel Bar I, Attia O. Serum IL-6 and IL-12 levels in breast cancer patients. *Egypt J Immunol*. 2004;11(2):165-70.
  - INEGI (2015). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre). Junio 2018, de INEGI Sitio web: <https://docplayer.es/6065869-Estadisticas-a-proposito-del-dia-mundial-de-la-lucha-contra-el-cancer-de-mama-19-de-octubre-datos-nacionales.html>
  - Inoue S, Suzuki K, Komori Y, Morishita Y, Suzuki-Utsunomiya K, Hozumi K, Inokuchi S, Sato T. Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. *Crit Care*. 2014 ;18(3):R130.
  - Irwin ML, Duggan C, Wang CY, Smith AW, McTiernan A. Fasting C-peptide levels and death resulting from all causes and breast cancer: the health, eating, activity, and lifestyle study. *J Clin Oncol*. 2011;29(1):47-53.
  - Iwakura H, Kangawa K, Kakao K. The regulation of circulating ghrelin – with recent updates from cell-based assays. *Endocr J*. 2015;62(2):107-22

- Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*. 2007;148(1):241-51
- Jiang Y, Li Y y Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death & Disease*.2015;6:e1792
- Jin HT, Jeong YH, Park HJ, Ha SJ. Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment.*BMP Rep*.2011;44(4):217-31
- Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531-64
- Juan Pablo del Rincón Jarero. Ghrelin, un péptido modulador del metabolismo energético. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 2007; 5(3):138-148
- Jung MY, Kim HS, Hong HJ, Youn BS, Kim TS. Adiponectin Induces Dendritic Cell Activation via PLC $\gamma$ /JNK/NF- $\kappa$ B Pathways, Leading to Th1 and Th17 Polarization. *J Immunol*. 2012;188(6):2592-601.
- Karlsson EA, Sheridan PA, Beck MA. Diet-induced obesity impairs the T cell memory response to influenza virus infection. *J Immunol* 2010; 184:3127-33
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704
- Keir ME, Latchman YE, Freeman GJ, Sharpe AH. Programmed Death-1(PD-1):PD-Ligand interactions inhibit TCR-Mediated positive selection of thymocytes. *J Immunol*. 2005;175(11):7372-7379
- Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications. *Ann Intern Med*. 2010 Jan 19;152(2):93-100
- Khaodhlar L, Ling PR, Blackburn GL, Bistrian BR. Serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein correlate with body mass index across the broad range of obesity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2004;28(6):410-5
- Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; 121: 1-14
- Kirby I. Bland, Edward M. Copeland, V. Suzanne Klimberg, William J Gradishar. *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*, 5th Edition.. Elsevier Health Sciences, Jun 29, 2017 - 1280 pages. Philadelphia PA, 2018
- Kögl T, Müller J, Jessen B, Schmitt-Graeff A, Janka G, Ehl S, zur Stadt U, Aichele P Hemophagocytic lymphohistiocytosis in syntaxin-11-deficient mice: T-cell exhaustion limits fatal disease. *Blood*. 2013;121(4):604-13
- Kojima M y Kangawa K. Ghrelin: Structure and function. *Physiol Rev* 2005; 85:495-522
- Kuss I, Schaefer C, Godfrey TE *et al* (2005). Recent thymic emigrants and subsets of naïve and memory T cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Clin Immunol* 116:27-36
- La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(5):371-9.

- Larbi A, Fulop T. From “Truly Naïve” to “Exhausted Senescent” T Cells: When Markers Predict Functionality. *Cytometry Part A*. 2014; 85A: 25- Cytometry Part A \_ 85A: 25\_35, 201435
- Lee J. Ghrelin stimulates cell proliferation in T cells. *The Journal of Immunology* 2011; 186:109-22
- Lin CR, Wei TY, Tsai HY, Wu YT, Wu PY, Chen ST. Glycosylation-dependent interaction between CD69 and S100A8/S100A9 complex is required for regulatory T-cell differentiation. *FASEB J*. 2015;29(12):5006-17
- Lin TC, Hsiao M. Ghrelin and cancer progression. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017;1868(1):51-57
- Liu H, Zhi L, Duan N, Su P (2016) Abnormal expression of Tim-3 antigen on peripheral blood T cells is associated with progressive disease in osteosarcoma patients. *FEBS Open Bio* 6: 807–815
- Liu Z, McMichael EL, Shayan G, Li J, Chen K, Srivastava R, Kane LP, Lu B, Ferris RL. Novel effector phenotype of Tim-3+ regulatory T cells leads to enhanced suppressive function in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2018 Sep 15;24(18):4529-4538
- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, *et al*. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002;169(5):2756-61.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Bloom SR, Lechler RI. Leptin inhibits the anti-cd3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol*. 2002 ;72(2):330-8
- Lorincz AM y Sukumar S. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocrine-related cancer* 2006; 13:279-292.
- Lucas S, Taront S, Magnan C, Fauconnier L, Delacre M, Macia L *et al*. Interleukin-7 Regulates Adipose Tissue Mass and Insulin Sensitivity in High-Fat Diet-Fed Mice through Lymphocyte-Dependent and Independent Mechanisms. *PLoS One*. 2012;7(6): e40351
- Maeda N, Shimomura I, Kishida K *et al*. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002;8(7):731-7.
- Mao H, Zhang L, Yang Y, Zuo W, Bi Y, Gao W, Deng B, Sun J, Shao Q, Qu X . New Insights of CTLA-4 into Its Biological Function in Breast Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10(7):728-36.
- Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A, Boutati E, Lambadiari V, *et al*. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *Eur J Clin Invest*. 2007 Apr;37(4):282-90.
- Martín-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human Leptin Enhances Activation and Proliferation of Human Circulating T Lymphocytes. *Cell Immunol*. 2000;199(1):15-24.
- Masharani UB, Maddux BA, Li X, Sakkas GK, Mulligan K, Schambelan M, Goldfine ID, Youngren JF. Insulin Resistance in Non-Obese Subjects Is

Associated with Activation of the JNK Pathway and Impaired Insulin Signaling in Skeletal Muscle. *PLoS One*. 2011;6(5): e19878.

- Matini AH, Abdirad A, Omranipour R, Shansiah R. Comparison of Serum Leptin Levels among Patients with Benign or Malignant Breast Lesions. *Arch Breast Cancer* 2015;2(3):96-99.
- Maury E, Ehala-Aleksejev K, Guiot Y, Detry R, Vandenhooft A, Brichard SM. Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(3): E656-65
- Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):144-54.
- McLaughlin T<sup>1</sup>, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE. Plasma Ghrelin Concentrations Are Decreased in Insulin-Resistant Obese Adults Relative to Equally Obese Insulin-Sensitive Controls. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Apr;89(4):1630-5.
- Meggyes M, Miko E, Polgar B *et al* (2014) Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8+ T cells throughout pregnancy: TIM3/galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy. *PloS One* 9: e92371
- Mittal D, Gubin MM, Schreibr RD, Smyth MJ. New insights in to cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014; 27:16-25
- Morales-González JA. (2010). *Obesidad un enfoque multidisciplinario* (400) México, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Muenst S, Soysal SD, Gao F, Obermann EC, Oertli D, Gillanders WE. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(3):667-76.
- Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrew ZB, Anker SD, Argente J, *et al*. Ghrelin. *Mol Metab*. 2015 Jun; 4(6): 437–460
- Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Contribution of regulatory T cells to cancer: A review. *Tregs: where we Are and what Comes Next?* *J Cell Physiol*. 2018;1–11.
- Nam S, Park S, Prk HS, Kim S, Kim JY, Kim SI. Association between insulin resistance and luminal B subtype breast cancer in postmenopausal women. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Mar;95(9):e2825.
- Nieman DC. Influence of obesity on immune fuction. *J Am Diet Assoc*. 1999; 99(3):294-9
- Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, Palmieri A, Mazzearella G, *et al*. New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. *BioMed Research International*; 2014:14
- Nirscl CJ, Drake CG. Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2013;19(18):4917-24
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M *et al*. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009; 15:914-9G20

- Niu J, Jiang L, Guo W, Shao L, Liu Y, Wang L. The Association between Leptin Level and Breast Cancer: A Meta-Analysis. PLoS One. 2013;8(6):e67349.
- Norde WJ, Hobo W, van der Voort R, Dolstra H. Coinhibitory molecules in hematologic malignancies: targets for therapeutic intervention. Blood. 2012 Jul 26;120(4):728-36.
- Olguín M. (2017). En México, más mujeres con cáncer de mama. Junio 2018, de UNAM Sitio web: <http://www.gaceta.unam.mx/20171019/en-mexico-mas-mujeres-con-cancer-de-mama>
- Orlova EG, Shirshv SV, Loginova OA. Leptin and Ghrelin Regulate Dendritic Cell Maturation and Dendritic Cell Induction of Regulatory T Cells. Dokl Biol Sci. 2015;462:171-4.
- Osegbe I, Okpara H, Azinge E. Relationship between serum leptin and insulin resistance among obese Nigerian women. Ann Afr Med 2016;15(1):14-9.
- Paich HA. Overweight and obese adult humans have a defective cellular immune response to pandemic H1N1 influenza A virus. Obesity 2013; 21(11):2377-2386
- Palmer C, Hampartzoumian T, Lloyd A, Zekry A. A novel role for adiponectin in regulating the immune responses in chronic hepatitis C virus infection. Hepatology. 2008;48(2):374-84.
- Pan H, Deng LL, Cui JQ, Shi L, Yang YC, Luo JH, Qin D, Wang L. Association between serum leptin levels and breast cancer risk: An updated systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2018;97(27): e11345
- Papathanassoglou E , El-Haschimi K, Li XC, Matarese G, Strom T, Mantzoros C. Leptin Receptor Expression and Signaling in Lymphocytes: Kinetics During Lymphocyte Activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice.. J Immunol. 2006 Jun 15;176(12):7745-52.
- Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. Nat Commun 2015; 6:6692
- Pauken, K. E., Jenkins, M. K., Azuma, M. & Fife, B. T. PD-1, but not PD-L1, expressed by islet-reactive CD4+ T cells suppresses infiltration of the pancreas during type 1 diabetes. Diabetes 2013; 62:2859–2869
- Paz-Filho G, Lyn Lim Ee, Ma-Li W. Associations between adipokines and obesity-related cancer. Frontiers in Bioscience. 2011; 16: 1634-1650.
- Paz-Filho G, Mastronardi C, Wong ML, Licinio J. Leptin therapy, insulin sensitivity, and glucose homeostasis. Indian J Endocrinol Metab. 2012;16(Suppl 3): S549-55
- Pereira JADS, da Silva FC, de Moraes-Vieira PMM. The Impact of Ghrelin in Metabolic Diseases: An Immune Perspective. J Diabetes Res. 2017;2017:4527980di
- Pierce BL, Ballard-Barbash R, Bernstein L *et al* (2009) Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. J Clin Oncol 27:3437-44
- Poschke I, De Boniface J, Mao Y, Kiessling R. Tumor-induced changes in the phenotype of blood-derived and tumor-associated T cells of early stage breast cancer patients. Int J Cancer. 2012;131(7):1611-2



- Pöykkö SM, Kellokoski E, Hörkkö S, Kauma H, Kesäniemi YA, Ukkola O. Low Plasma Ghrelin Is Associated with Insulin Resistance, Hypertension, and the Prevalence of Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2003;52(10):2546-53.
- Procaccini C, De Rosa V, Galgani M, Carbone F, La Rocca C, Formisano L y Matarese G. Role of adipokines signaling in the modulation of T cells function. *Frontiers in Immunology*. 2013;4(332): 1-12
- Protani M, Coory M, Martin JH. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res*. 2010; 123:627-435
- Qiu Y, Chen J, Liao H *et al* (2012) Tim-3-Expressing CD4(+) and CD8(+) T Cells in Human Tuberculosis (TB) Exhibit Polarized Effector Memory Phenotypes and Stronger Anti-TB Effector Functions. *PLoS Pathog* 8: e1002984.
- Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and Insulin Resistance. *Mol Med*. 2008; 14(11-12): 741–751.
- Radulovic K, Niess JH. CD69 Is the Crucial Regulator of Intestinal Inflammation: A New Target Molecule for IBD Treatment? *J Immunol Res*. 2015;2015:497056
- Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic Cell Survival and Maturation Are Regulated by Different Signaling Pathways. *J Exp Med*. 1998;188(11):2175-80.
- Sabzevary-Ghahfarokhi M, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M, Ghatreh-Samani M, Shohan M. The Role of Inflammatory Cytokines in Creating T Cell Exhaustion in Cancer. *Cancer Biother Radiopharm*. 2018 Sep;33(7):267-273.
- Sakuishi K, Ngiew SF, Sullivan JM, Teng MW, Kuchroo VK, Smyth MJ, Anderson AC TIM3+FOXP3+ regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology*. 2013 Apr 1;2(4):e23849.
- Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol*. 2005 Mar;26(3):136-40.
- Saucillo DC, Gerriets VA, Sheng J, Rathmell JC, Maciver NJ. Leptin Metabolically Licenses T Cells for Activation to Link Nutrition and Immunity. *J Immunol*. 2014;192(1):136-44.
- Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, Minkwitz J, Thormann J *et al*. Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121971
- Schreiber R, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 2011; 331:1565-1570
- Sever S, White DL, Garcia JM. Is there an effect of ghrelin/ghrelin analogs on cancer? A systematic review. *Endocr Relat Cancer*. 2016 Sep;23(9):R393-409
- Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(3):153-167.
- Sheridan PA. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *International Journal of Obesity* 2012; 36:1072-1077
- Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte Size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):1023-33

- Sowers JR. Endocrine functions of adipose tissue: focus on adiponectin. *Clin Cornerstone*. 2008;9(1):32-8;
- Sparano JA, Wang M, Zhao F, Stearns V, Martino S, Ligibel J, Perez EA, Saphner T, Wolff AC, Sledge GW, Wood WC, Fetting J, Davidson NE. Obesity at diagnosis is associated with inferior outcomes in hormone receptor-positive operable breast cancer. *Cancer*. 2012; 118:5937-46
- Sun W, Lu J, Wu S, Bi Y, Mu Y, *et al.* Association of insulin resistance with breast, ovarian, endometrial and cervical cancers in nondiabetic women. *Am J Cancer Res*. 2016;6(10):2334-2344.
- Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity*. 2008;29(6):848-62.
- Svensson H, Wetterling L, Bosaeus M, Odén B, Odén A, *et al.* Body fat mass and the proportion of very large adipocytes in pregnant women are associated with gestational insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(4):646-53.
- Tan PH, Tyrrell HEJ, Gao L, Xu D, Quan J, *et al.* Adiponectin Receptor Signaling on Dendritic Cells Blunts Antitumor Immunity. *Cancer Res*. 2014; 74(20): 5711–5722.
- Taub DD. Novel Connections Between the Neuroendocrine and Immune Systems: The Ghrelin Immunoregulatory Network. *Vitam Horm*. 2008;77:325-46.
- Terawaki S, Chikuma S, Shibayama S, Hayashi T, Yoshida T, Okazaki T, Honjo T. IFN- $\alpha$  Directly Promotes Programmed Cell Death-1 Transcription and Limits the Duration of T Cell-Mediated Immunity. *J Immunol* 2011;186(59):2772-9.
- Thaventhiran T, Sethu S, Yeang HXA, Al-Huseini L, Hamdam J y Sathish JG. T cell co-inhibitory receptors: functions and signaling mechanism. *J Clin Cell Immunol* 2012, S12:004
- Tian Z. TIGIT blockade prevents CTL and NK cell exhaustion and leads to tumor rejection in mice. *J Immunol*, 2018, 200 (1 Supplement) 57.50
- Tinoco R, Alcalde V, Yang Y, Sauer K and Zuniga E. TGF- $\beta$  Signaling in T cells is Essential for CD8 T Cell Suppression and Viral Persistence In Vivo. *Immunity*. 2009; 31(1): 145–157
- Töpfer K, Kempe S, Müller N, Schmitz M, Bachmann M, *et al.* Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: 918471
- Tsai S, Clemente-Casares X, Zhou AC, Lei H, Ahn JJ *et al.* Insulin Receptor-Mediated Stimulation Boosts T Cell Immunity during Inflammation and Infection. *Cell Metab*. 2018;28(6):922-934.e4
- Tsang JY, Li D, Ho D, Peng J, Xu A, Lamb J, Chen Y, Tam PK. Novel immunomodulatory effects of adiponectin on dendritic cell functions. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(5):604-9.
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523-32
- Vona-Davis L y Rose DP. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocrine-Related Cancer* 2007; 14:189–206
- Vudattu NK, Magalhaes I, Schmidt M, Seyfert-Margolis V, Maeurer MJ. Reduced numbers of IL-7 receptor (CD127) expressing immune cells and IL-7-signaling

defects in peripheral blood from patients with breast cancer. *Int J Cancer*. 2007 Oct 1;121(7):1512-9.

- Wagner NM, Brandhorst G, Czepluch F, Lankeit M, Eberie C, Gerzberg S, Faustin V, Riggert J, Oellerich M, Hasenfuss G, Donstantinides S, Schafer K. Circulating regulatory T cells are reduced in obesity and may identify subjects at increased metabolic and cardiovascular risk. *Obesity*(Silver Spring) 2013; 21(2):461-8
- Walker LSK, Sansom DM. Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol*. 2015; 36(2): 63–70.
- Wang HJ, Zakhari S, Jung MK. Alcohol, inflammation, and gut-liver-brain interactions in tissue damage and disease development. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(11): 1304–1313.
- Wang P, Guo SZ. Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases. *Int J Clin Exp Pathol*.2013;6(12):2668-2674.
- Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol*. 2016;8(2):93-100.
- Watanabe MA, Oda JM, Amarante MK, Cesar Voltarelli J. Regulatory T cells and breast cancer: implications for immunopathogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(4):569-79.
- Wherry EJ y Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015 Aug;15(8):486-99
- Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature Immunology*. 2011;12(6)492-499
- Whiteside T. Immune responses to malignancies. *J. Allergy Clin Immunol*.2010; 125(2):S272-S282.
- Whiteside TL. What are t cells (treg) regulating in cancer and why? *Semin Cancer Biol*. 2012;22(4):327-34.
- Wilk S, Scheibenbogen C, Bauer S, Jenke A, Rother M, Guerreiro M, Kudernatsch R, Goerner N, Poller W, Elligsen-Merkel D, Utku N, Magrane J, Volk HD, Skurk C. Adiponectin is a negative regulator of antigen-activated T cells. *Eur J Immunol*. 2011; 41(8):2323-32.
- World Health Organization (2018). Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. Junio 2018, de WHO Sitio web: [https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood\\_what/en/](https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood_what/en/)
- World Health Organization (2019). Breast Cancer. Enero 2019, de World Health Organization Sitio web: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>
- Wu J, Liu C, Qin S, Hou H (2013) The expression of Tim3 in peripheral blood of ovarian cancer. *DNA Cell Biol* 32:648-53
- Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta*. 2013;417:80-4
- Yadav A, Jyoti P, Jain SK, Bhattacharjee J. Correlation of adiponectin and leptin with insulin resistance: a pilot study in healthy north Indian population. *Indian J Clin Biochem* 2011;26(2):193-6
- Yang H, Yun-Hee Y, Vandanmagsar B, Rood J, Kumar KG, Butler AA y Dixit V. Obesity accelerates thymic aging. *Blood* 2009; 114:3803-3812



- Yi JS, Cox MA Y Zajac AJ. T cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 2010; 129(4): 474–481
- Yu C, Chen Y, Clin GW, Zang D, Zong H, *et al*. Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. *J Biol Chem*. 2002 27;277(52):50230-6
- Zhang Y, Cai P, Li L *et al* (2017) Co-expression of TIM-3 and CEACAM1 promotes T cell exhaustion in colorectal cancer patients. *Int Immunopharmacol* 43:210-218
- Zhao H, Liao X, Kang Y. Tregs: where we Are and what Comes Next?. *Front Immunol*. 2017 Nov 24;8:1578.
- Zuo H, Shi Z, Yuan B, Dai Y, Wu G, Hussain A. Association between Serum Leptin Concentrations and Insulin Resistance: A Population-Based Study from China. *PLoS One*. 2013;8(1): e54615

# ANEXOS

## ANEXO 1

		<p>HOSPITAL GENERAL de MÉXICO DR. EDUARDO LICEAGA</p>
Of. No. DI/03/268/15		
México, D. F., a 27 de agosto de 2015		
<b>DR. JOSELIN HERNANDEZ RUIZ</b> Servicio de UME Presente.		
Estimado Dr. Hernández:		
Hago de su conocimiento que la última versión del protocolo titulado " <b>LINFOCITOS T CD8 EXHAUSOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y OBESIDAD</b> " con clave de registro DI/15/UME/ 03/47 fue presentados a los Comités de Ética e Investigación y al Comité de Investigación quienes dictaminaron, su APROBACION. Por lo tanto, puede dar inicio a su investigación. Le informo que el apoyo de los recursos para su proyecto, dependerán de la disponibilidad del presupuesto asignado a la Dirección de Investigación.		
A la Vanguardia en el Cuidado de la Vida" Atentamente Director de Investigación		
<b>DR. JUAN CARLOS LOPEZ ALVARENGA</b>		
JCL/atr	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b> <a href="http://www.hgm.salud.gob.mx">www.hgm.salud.gob.mx</a>	Dr. Balmis 148 Colonia Doctores Delegación Cuauhtémoc México, DF 06726
	T +52 (55) 5004 3842 Con +52 (55) 2789 2000 Ext 1164	

## ANEXO 2. Consentimiento informado para mujeres sin cáncer de mama

   
UNIDAD DE MEDICINA EXPERIMENTAL  
SERVICIO DE TUMORES MAMARIOS DE LA UNIDAD DE ONCOLOGÍA  
DR. EDUARDO LICEAGA

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
**TITULO DEL ESTUDIO: LINFOCITOS T CD8 EXHAUSTOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y OBESIDAD**

MÉXICO D.F. A \_\_\_\_\_ DE \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_.


NOMBRE DEL VOLUNTARIO: \_\_\_\_\_ IFE: \_\_\_\_\_

He sido invitada a participar en este estudio de Investigación en Inmunología y Cáncer que tiene como propósito investigar la presencia de ciertas células del sistema de defensa del cuerpo y de algunas proteínas producidas principalmente por el tejido graso que intervienen en la respuesta hacia el tumor maligno en pacientes con cáncer de mama; para ayudar a tener una mayor comprensión de los mecanismos que regulan las vías metabólica y del sistema de defensa durante la obesidad que puedan estar favoreciendo el desarrollo del cáncer. Además se obtendrá información importante del estado del sistema de defensa del cuerpo en personas obesas que contribuirá a encontrar alternativas para mejorar esta respuesta.

El estudio se realizará en pacientes mexicanas que acuden al Servicio de Tumores Mamaros de la Unidad de Oncología 111, con sospecha probable de tumor mamario y/o con obesidad y que no hayan sido tratadas previamente. El grupo de personas sin cáncer de mama se reclutará del personal de trabajadores del Hospital General de México y de las mujeres que acompañen a las pacientes al Servicio de Tumores Mamaros de la Unidad de Oncología.

Al participar como voluntaria en este estudio me han informado y explicado que:

1. El estudio se realizará en el Servicio de Tumores Mamaros de la Unidad de Oncología, pabellón 111 del Hospital General de México.
2. Mi participación consiste en mi valoración clínica, donación de una sola muestra de sangre de 20 ml el día que acuda al Servicio de Tumores Mamaros y una sola toma de estudios de laboratorio (química sanguínea, hemoglobina glicosilada, perfil hepático e insulina) que serán realizados gratuitamente en el Hospital General de México al siguiente día de acudir al Servicio de Tumores Mamaros o el día más próximo que pueda en horario matutino y en ayunas. Estos procedimientos serán realizados por personal calificado y con equipo estéril.
3. El riesgo al que me expongo al participar en este estudio de investigación en Inmunología y Cáncer es mínimo que consiste en dolor leve y la probable aparición de un moretón que debe desaparecer en 2 semanas.
4. No recibiré ningún beneficio económico o médico directo por mi participación en el estudio, que mi tratamiento no cambiará, ya sea que participe o no. Sin embargo, la realización de los estudios de laboratorio pueden ayudar a conocer mi estado de salud y estaré colaborando con el Hospital General de México para ayudar a comprender mejor los factores que influyen en el desarrollo de cáncer de mama, que probablemente beneficiará a generaciones futuras.
5. Tengo la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgo, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación.
6. Tengo la libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se creen perjuicios sobre mi persona.

 1/2





UNIDAD DE MEDICINA EXPERIMENTAL  
SERVICIO DE TUMORES MAMARIOS DE LA UNIDAD DE ONCOLOGÍA

**TITULO DEL ESTUDIO: LINFOCITOS T CD8 EXHAUSTOS EN PACIENTES CON  
CÁNCER DE MAMA Y OBESIDAD**

7. Los resultados de las muestras de sangre que se me tomen durante el estudio se utilizarán en análisis especializados, cuyos resultados conocerá el médico responsable y el laboratorio de la Unidad de Medicina Experimental. Se garantiza que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con mi privacidad.
8. Se me proporcionará información actualizada obtenida durante el estudio.
9. Que los estudios de sangre adicionales correspondientes a este estudio, son sin costo para mí, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación
10. Se me entregará copia de este documento al ser incluida en este estudio.
11. Que todos los procedimientos y acuerdos aquí descritos se apegan a los principios éticos enmarcados en la Declaración de Helsinki así como las disposiciones del reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación.
12. Que el estudio ha sido autorizado por las comisiones de ética e Investigación del hospital General de México.

He sido debidamente informada sobre mi participación en este estudio y todas mis dudas han sido aclaradas a satisfacción por el responsable del mismo. Por tanto, de manera libre y voluntaria, doy mi consentimiento para participar en este Estudio de Investigación en Inmunología y Cáncer, el cual deberá apegarse fielmente a este Consentimiento Informado y al protocolo de Investigación aprobado por las Comisiones de ética e Investigación con el Número de Registro: DI 1151144E163147

**PACIENTE**

NOMBRE Y FIRMA \_\_\_\_\_

La firma puede ser sustituida por huella digital en los casos en que así lo ameriten

**TESTIGOS**

NOMBRE Y FIRMA: \_\_\_\_\_

DIRECCION: \_\_\_\_\_

TELEFONO: \_\_\_\_\_

RELACIÓN CON EL PARTICIPANTE: \_\_\_\_\_

NOMBRE Y FIRMA: \_\_\_\_\_

DIRECCION: \_\_\_\_\_

TELEFONO: \_\_\_\_\_



RELACIÓN CON EL PARTICIPANTE: \_\_\_\_\_

**INVESTIGADOR RESPONSABLE**

Dr. Carlos Alberto Lara Gutiérrez

Para preguntas o comentarios las 24 h comunicarse con el Dr. Carlos Alberto Lara Gutiérrez Investigador responsable al celular 044 55 91988713 o al teléfono 27892000 ext 1866, con el Dr. Josélin Hernández Ruiz Investigador al teléfono 56232673 y con la Dra. Estéla García Elvira Presidente de la Comisión de Ética con quien puede consultar sus derechos como paciente al teléfono 27892000 Ext 1380.

### ANEXO 3. Carta de consentimiento informado para pacientes con cáncer de mama

  **HOSPITAL GENERAL de MÉXICO**  
DR. EDUARDO LICEAGA

UNIDAD DE MEDICINA EXPERIMENTAL  
SERVICIO DE TUMORES MAMARIOS DE LA UNIDAD DE ONCOLOGÍA

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
**TITULO DEL ESTUDIO: LINFOCITOS T CD8 EXHAUSTOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y OBESIDAD**

MÉXICO D.F. A \_\_\_\_\_ DE \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_.


NOMBRE DEL VOLUNTARIO: \_\_\_\_\_ IFE: \_\_\_\_\_

He sido invitada a participar en este estudio de Investigación en Inmunología y Cáncer que tiene como propósito investigar la presencia de ciertas células del sistema de defensa del cuerpo y de algunas proteínas producidas principalmente por el tejido graso que intervienen en la respuesta hacia el tumor maligno en pacientes con cáncer de mama; para ayudar a tener una mayor comprensión de los mecanismos que regulan las vías metabólica y del sistema de defensa durante la obesidad que puedan estar favoreciendo el desarrollo del cáncer. Además se obtendrá información importante del estado del sistema de defensa del cuerpo en personas obesas que contribuirá a encontrar alternativas para mejorar esta respuesta.

El estudio se realizará en pacientes mexicanas que acuden al Servicio de Tumores Mamarios de la Unidad de Oncología 111, con sospecha probable de tumor mamario y/o con obesidad y que no hayan sido tratadas previamente. El grupo de personas sin cáncer de mama se reclutará del personal de trabajadores del Hospital General de México y de las mujeres que acompañen a las pacientes al Servicio de Tumores Mamarios de la Unidad de Oncología.

Al participar como voluntaria en este estudio me han informado y explicado que:

1. El estudio se realizará en el Servicio de Tumores Mamarios de la Unidad de Oncología, pabellón 111 del Hospital General de México.
2. Mi participación consiste en mi valoración clínica, donación de una sola muestra de sangre de 20 ml el día que acuda al Servicio de Tumores Mamarios y una sola toma de estudios de laboratorio (química sanguínea, hemoglobina glicosilada, perfil hepático e insulina) que serán realizados gratuitamente en el Hospital General de México al siguiente día de acudir al Servicio de Tumores Mamarios o el día más próximo que pueda en horario matutino y en ayunas. Estos procedimientos serán realizados por personal calificado y con equipo estéril.
3. De acuerdo a mi valoración clínica seré integrada en uno de los grupos de estudio y seré informada en cual grupo fui incluida.
4. Después de un año de haber recibido tratamiento me llamarán por teléfono para valorar mi evolución.
5. El riesgo al que me expongo al participar en este estudio de investigación en Inmunología y Cáncer es mínimo, que consiste en dolor leve y la probable aparición de un moretón que debe desaparecer en 2 semanas.
6. No recibiré ningún beneficio económico o médico directo por mi participación en el estudio, que mi tratamiento no cambiará, ya sea que participe o no. Sin embargo, la realización de los estudios de laboratorio pueden ayudar a conocer mi estado de salud y estaré colaborando con el Hospital General de México para ayudar a comprender mejor los factores que influyen en el desarrollo de cáncer de mama, que probablemente beneficiará a generaciones futuras.
7. Tengo la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgo, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del voluntario.

 1/2





8. Tengo la libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se creen perjuicios sobre mi persona.
9. Los resultados de las muestras de sangre que se me tomen durante el estudio se utilizarán en análisis especializados, cuyos resultados conocerá el médico responsable y el laboratorio de la Unidad de Medicina Experimental. Se garantiza que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con mi privacidad.
10. Se me proporcionará información actualizada obtenida durante el estudio.
11. Que los estudios de sangre adicionales correspondientes a este estudio, son sin costo para mi, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación
12. Se me entregará copia de este documento al ser incluida en este estudio.
13. Que todos los procedimientos y acuerdos aquí descritos se apegan a los principios éticos enmarcados en la Declaración de Helsinki así como las disposiciones del reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación.
14. Que el estudio ha sido autorizado por las comisiones de ética e Investigación del Hospital General de México.

He sido debidamente informada sobre mi participación en este estudio y todas mis dudas han sido aclaradas a satisfacción por el responsable del mismo. Por tanto, de manera libre y voluntaria, doy mi consentimiento para participar en este Estudio de Investigación en Inmunología y Cáncer, el cual deberá apegarse fielmente a este Consentimiento Informado y al protocolo de Investigación aprobado por las Comisiones de ética e Investigación con el Número de Registro: DT/15/UMEX/03/47

**PACIENTE**

NOMBRE Y FIRMA: \_\_\_\_\_

La firma puede ser sustituida por huella digital en los casos en que así lo ameriten

**TESTIGOS**

NOMBRE Y FIRMA: \_\_\_\_\_

DIRECCION: \_\_\_\_\_

TELEFONO: \_\_\_\_\_

RELACIÓN CON EL PARTICIPANTE: \_\_\_\_\_

NOMBRE Y FIRMA: \_\_\_\_\_

DIRECCION: \_\_\_\_\_

TELEFONO: \_\_\_\_\_

RELACIÓN CON EL PARTICIPANTE: \_\_\_\_\_

**INVESTIGADOR RESPONSABLE**

Dr. Carlos Alberto Lara Gutiérrez

Para preguntas o comentarios las 24 h comunicarse con el Dr. Carlos Alberto Lara Gutiérrez Investigador responsable al celular 044 55 91988713 o al teléfono 27892000 ext 1866, con el Dr. Joselín Hernández Ruiz Investigador al teléfono 56232673 y con la Dra. Estela García Elvira Presidente de la Comisión de Ética con quien puede consultar sus derechos como paciente al teléfono 27892000 Ext 1380.



## ANEXO 4. Hoja de recopilación de datos

### HOJA DE RECOPIACIÓN DE DATOS

Fecha \_\_\_\_\_ FOLIO \_\_\_\_\_  
Nombre: \_\_\_\_\_ No. de expediente \_\_\_\_\_  
Sexo: ( M ) ( F ) Edad: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_  
Estado civil \_\_\_\_\_ Ocupación: \_\_\_\_\_  
Escolaridad: \_\_\_\_\_

Madre: Neoplasias: SI ( ) NO ( ) cuales \_\_\_\_\_  
Padre: Neoplasias SI ( ) NO ( ) cuales \_\_\_\_\_  
Abuelos Maternos: Neoplasias SI ( ) NO ( ) cuales \_\_\_\_\_  
Abuelos Paternos: Neoplasias SI ( ) NO ( ) cuales \_\_\_\_\_  
Hermanos: Neoplasias SI ( ) NO ( ) cuales \_\_\_\_\_  
Otros \_\_\_\_\_

Tabaquismo Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_ Alcoholismo Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
Otra toxicomanias: Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
DM: SI ( ) NO ( ) Tiempo Evol. \_\_\_\_\_ HTAS: Si ( ) No ( ) Tiempo Evol. \_\_\_\_\_  
Otros Padecimientos: Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
Cirugías Previas: \_\_\_\_\_

Menarca: \_\_\_\_\_ Ritmo: \_\_\_\_\_ Fecha de ultima Regla: \_\_\_\_\_ Menopausia: \_\_\_\_\_  
Gesta: \_\_\_\_\_ Para: \_\_\_\_\_ Aborto: \_\_\_\_\_ Cesárea: \_\_\_\_\_ EPP: \_\_\_\_\_ EUP: \_\_\_\_\_  
MPF: \_\_\_\_\_ Lactancia: \_\_\_\_\_ TRH: Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_

Historia de Patología Mamaria: Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_

Tiempo de evolución del padecimiento actual: \_\_\_\_\_

Mastografía BIRADs: \_\_\_\_\_ USG(Tamaño del tumor): \_\_\_\_\_ Tamaño Clínico \_\_\_\_\_  
Etapa clínica: \_\_\_\_\_ T \_\_\_\_\_ N \_\_\_\_\_ M \_\_\_\_\_ LADO: \_\_\_\_\_  
Peso \_\_\_\_\_ Talla: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_

#### REPORTE DE PATOLOGÍA:

Estirpe Histológica: \_\_\_\_\_  
Tamaño tumoral: \_\_\_\_\_ Ganglios Linfáticos: + ( ) -- ( ) \_\_\_\_\_  
Peso Tumoral: \_\_\_\_\_ Invasión vascular: + ( ) --( ) SBR: \_\_\_\_\_  
Invasión Nerviosa: +( ) --( ) Invasión linfática: +( ) --( ) \_\_\_\_\_  
Receptores de estrógeno: \_\_\_\_\_ Receptores de progesterona: \_\_\_\_\_  
Her 2 NEU: \_\_\_\_\_ Ki 67: \_\_\_\_\_ p53: \_\_\_\_\_