



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD

HOSPITAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA No. 3

“DR. VÍCTOR MANUEL ESPINOSA DE LOS REYES SÁNCHEZ”

**“ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LA INMUNOGLOBULINA E EN LA
MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA TIPO Th2 EN CÁNCER DE
MAMA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES BLANCOS
TERAPÉUTICOS”**

Número de registro: R-2019-785-043

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA

PRESENTA:

DR. ELIO ALEJANDRO GONZÁLEZ BERMÚDEZ

INVESTIGADOR RESPONSABLE:

DRA. PATRICIA ALANIS LÓPEZ

INVESTIGADOR ASOCIADO:

DR. ALEXANDER PEDROZA GONZÁLEZ



CIUDAD DE MÉXICO, JULIO 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.

Investigador Responsable:

Dra. Patricia Alanis López

Médico del servicio de Oncología Quirúrgica.

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3

Centro Médico Nacional la Raza

Instituto Mexicano del Seguro Social

Seris y Antonio Valeriano SN Col La Raza, Ciudad de México CP 02990

Tel. 57245900 extensión 23726

Correo electrónico: drapatriciaalanis@yahoo.com.mx

Investigadores Asociados:

Dr. Alexander Pedroza González

Laboratorio de Investigación en Inmunología

Unidad de Morfología y Función

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

Av. De los barrios S/N, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.

Tel. 56231220

Correo electrónico: alexander_pg@hotmail.com

Dra. Gina Stella García Romo

Laboratorio de Investigación en Inmunología

Unidad de Morfología y Función

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

Av. De los barrios S/N, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.

Tel. 56231220

Correo electrónico: garciaromogina@gmail.com

Dra. Verónica Gutiérrez Osorio.

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3

Centro Médico Nacional la Raza

Instituto Mexicano del Seguro Social

Seris y Antonio Valeriano SN Col La Raza Ciudad de México CP 02990

Tel. 57245900 extensión 23636

Correo electrónico: Veronica4023@gmail.com

Dr. Elio Alejandro González Bermúdez.

Médico residente de la especialidad de rama ginecología oncológica.

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3

Centro Médico Nacional la Raza

Instituto Mexicano del Seguro Social

Seris y Antonio Valeriano SN Col La Raza Ciudad de México CP 02990

Tel. 57245900 extensión 23726

Correo electrónico: elio_alejandro@outlook.com

LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN:

Servicio de Oncología quirúrgica de la Unidad Médica de Alta Especialidad.
1|Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3 del Centro Médico Nacional “La Raza”. Instituto Mexicano del Seguro Social.

Calzada Vallejo 266 y 270 Colonia “La Raza” Delegación Azcapotzalco Ciudad de México. CP 02990. Teléfono 57245900 Ext. 23726.

Laboratorio de Investigación en Inmunología

Unidad de Morfología y Función

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

Av. De los barrios S/N, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.



Dictamen de Aprobación

Martes, 28 de mayo de 2019

Ref. 09-B5-61-2800/201900/1 2 0 0

Dra. Patricia Alanís López
DIVISION DE GINECO-OBSTETRICIA, HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA NUM. 3,
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
D.F. Norte

Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Análisis de la participación de la inmunoglobulina E en la modulación de la respuesta inmunitaria tipo Th2 en cáncer de mama para la identificación de posibles blancos terapéuticos.** , fue sometido a la consideración de este Comité Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales del Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS, se ha emitido el dictamen de **APROBADO**, con número de registro: R-2019-785-043.

De acuerdo a la normatividad vigente, deberá informar a esta Comité en los meses de enero y julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo. Este dictamen sólo tiene vigencia de un año. Por lo que en caso de ser necesario requerirá solicitar una reaprobación al Comité de Ética en Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica, al término de la vigencia del mismo.

Atentamente,


Dra. María Susana Navarrete Navarro
Secretaría Ejecutiva
Comité Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

Se anexa dictamen
SNN/ iah. F-CNIC-2019-24

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Edificio "B" de la Unidad de Congressos Av. Cuauhtémoc 333 Col. Doctores México DF 06700 56254900 ext 21210 cnaire@cia.gob.mx

DR. JUAN CARLOS HINOJOSA CRUZ

Director de Educación e Investigación en Salud

DRA. VERÓNICA QUINTANA ROMERO

Jefa de la División de Educación en Salud

DR. JUAN ANTONIO GARCÍA BELLO

Jefe de la División de Investigación en Salud

DRA. PATRICIA ALANIS LÓPEZ

Tutor de Tesis

DR. FABIAN TOBON OSORNIO

Titular del Curso de Ginecología Oncológica.

AGRADECIMIENTOS

Ha sido largo el camino recorrido, mucho el esfuerzo e incontables los sacrificios hechos para llegar hasta este punto, solo las personas que me conocen saben cuántos obstáculos hemos superado para poder tener la satisfacción de llegar a la meta deseada, y Dios sabe que sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

Le agradezco a Dios por darme sabiduría y fuerza en todo momento, y por nunca haberme abandonado.

A mi madre, por ser esa persona incansable, buena, cariñosa, por su apoyo incondicional, y por enseñarme a nunca darme por vencido.

A mi padre, por darme la fuerza para siempre levantarme, por heredarme ese carácter fuerte para superar los momentos difíciles, y siempre seguir adelante.

A mis hermanos, Cesar, Cristhian y Laura, por haberme enseñado tantos valores, ser mi ejemplo de esfuerzo y sacrificio, y por siempre haberme cuidado.

A mis amigos, Mottu, Jessica, Liz, Ale, Romi, Jesús, Iván, Jared y Roberto, porque siempre me apoyaron en los momentos difíciles, porque sin ellos, este camino no hubiera sido el mismo, ellos saben lo difícil que ha sido, porque ellos lo han vivido.

A mis asesores Dra. Patricia Alanis y Dr. Alexander Pedroza, gracias por brindarme la oportunidad y la confianza de haber trabajado con ustedes, por todo su apoyo y paciencia.

A las pacientes mexicanas derechohabientes del IMSS que decidieron participar en el estudio.

Este trabajo ha sido apoyado y financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyecto **IA208717**, de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.

ÍNDICE

Resumen.....	9
Marco teórico	16
Justificación	24
Planteamiento del problema	25
Objetivos.....	28
Hipótesis.....	30
Material y métodos.....	31
Aspectos de bioseguridad.....	36
Recursos, financiamiento y factibilidad.....	38
Aspectos éticos.....	46
Resultados.....	47
Discusión.....	57
Conclusiones.....	60
Referencias.....	61
Anexos.....	65

ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LA INMUNOGLOBULINA E EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA TIPO Th2 EN CÁNCER DE MAMA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES BLANCOS TERAPÉUTICOS.

RESUMEN

Antecedentes: El cáncer de mama es una enfermedad compleja que afecta a un gran número de personas a nivel mundial. En México es el de mayor incidencia y mortalidad en mujeres desde el año 2006. Los tratamientos actuales son agresivos para el paciente y su eficacia depende del estadio de la enfermedad, siendo curativos solamente en estadios tempranos. En consecuencia, existe una necesidad de tratamientos más efectivos sobre todo en etapas avanzadas. En los últimos años se ha demostrado que un componente importante en la patogenia y respuesta a los tratamientos es la respuesta inmunitaria presente en el microambiente tumoral. Se ha observado que la presencia de linfocitos Th1, CD8 citotóxicos y células NK tiene un efecto protector, contrario a la presencia de linfocitos Th2 y células T reguladoras (Tregs) que favorecen el desarrollo tumoral. La presencia de linfocitos Th2 se ha asociado con un desarrollo acelerado de los tumores mamarios al favorecer el crecimiento de las células cancerosas, aunque se conoce poco de los mecanismos involucrados se ha observado que dependen de la presencia de las interleucinas 4 y 13 (IL-4 y IL-13). Uno de los principales mecanismos efectores de la respuesta de linfocitos Th2 es la producción de anticuerpos IgE; en ensayos preliminares hemos detectado la presencia de dichos anticuerpos en muestras de tejido tumoral de cáncer de mama. Sin embargo, a pesar de que la respuesta Th2 es característica en cáncer de mama no hay evidencia experimental de la presencia de IgE y su participación en la patogenia de la enfermedad. No obstante, existe evidencia experimental en modelos animales que muestran que la IgE puede ser reconocida por células dendríticas (DC) a través del receptor de alta afinidad FcεR1 y dependiendo de la naturaleza del estímulo antigénico y del entorno inducir una respuesta Th2. Este mecanismo puede ser importante para exacerbar la respuesta Th2 en los tumores mamarios, especialmente porque el receptor FcεR1 se expresa

en la mayoría de las células dendríticas, las cuales forman parte del infiltrado leucocitario en los tumores de mama y son las principales inductoras de la respuesta Th2 en dichos tumores. Por tal motivo en el presente proyecto proponemos caracterizar la presencia de IgE en muestras de suero y tejido tumoral y su capacidad para reconocer antígenos tumorales. Así como la posible interacción con células presentadoras de antígeno a través del receptor de alta afinidad para IgE y cómo afecta la funcionalidad de dichas células durante la activación linfocitaria. A través de dicho conocimiento se tendrá un mejor panorama de la regulación de la respuesta inmunitaria en el microambiente tumoral. Lo anterior es de suma importancia porque entre las nuevas estrategias terapéuticas que se están desarrollando para el tratamiento del cáncer sobresale la inmunoterapia por los resultados prometedores que se han observado en modelos animales y en algunos ensayos clínicos. La caracterización de los mecanismos inmuno-reguladores en cáncer es una importante herramienta para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para modular la respuesta inmune local e inhibir los mecanismos inmunosupresores que interfieren con el desarrollo de una respuesta anti-tumoral.

Objetivo: Analizar la capacidad de anticuerpos IgE de pacientes con cáncer de mama para reconocer antígenos tumorales e interactuar con células dendríticas para la inducción de linfocitos Th2.

Material y métodos: Se realizaron ensayos con células aisladas de tumores de pacientes con cáncer de mama para el análisis fenotípico de linfocitos B positivos para IgE por citometría de flujo. Adicionalmente, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica y ELISA para la detección de inmunoglobulina IgE en el tejido tumoral, así como ensayos de western blot para identificar anticuerpos IgE específicos para antígenos tumorales. Se realizaron cultivos celulares in vitro para los análisis funcionales. Los datos fueron analizados comparativamente entre los diferentes tejidos (sangre, tejido normal de mama y tejido tumoral) para la búsqueda de diferencias significativas en la frecuencia y funcionalidad. Estos análisis se realizaron con el programa GraphPad y SPSS (Statistical Package for Social

Sciences) utilizando la prueba t-student con datos pareados. Para la integración de los datos clínicos con los datos inmunológicos se realizaron análisis de correlación (Pearson).

Recursos e infraestructura: La obtención de datos y muestras clínicas se llevó a cabo en la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3, Centro Médico Nacional la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social. La unidad está especializada en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de pacientes con cáncer de mama y tumores ginecológicos por lo que cuenta con el equipo necesario para la toma de biopsias y la realización de cirugías para la extirpación de tumores de los cuales se obtuvieron las muestras clínicas. El procesamiento de las muestras y su análisis por citometría de flujo y ELISA se realizaron en el laboratorio de inmunología de la Unidad de Morfología y Función de la FES Iztacala UNAM, que cuentan con el equipo necesario para citometría de flujo y cultivo celular.

Resultados Preliminares: Los niveles séricos de inmunoglobulina E observados en los pacientes con cáncer de mama fueron muy similares a los del grupo control de individuos sanos, dichos niveles estuvieron dentro de los rangos normales reportados en la literatura. Los niveles séricos de IgE no tuvieron asociación significativa con los parámetros clínico-patológicos. Interesantemente encontramos la presencia de anticuerpos IgE en el tejido tumoral en el 50 % de las pacientes analizadas. En cuanto a las células dendríticas ambas subpoblaciones las mDC y pDC se encontraron presentes en el tejido tumoral. La expresión del receptor FcεR1 se observó principalmente en las mDC, pero solamente en el 20% de los pacientes fueron positivas para la IgE y el receptor. Estos hallazgos indican que la IgE se encuentra presente en el microambiente tumoral, y en un porcentaje de los pacientes pudieran interactuar con las mDCs, sin embargo, parece ser que las células dendríticas no serían las principales en interactuar con dicha inmunoglobulina a pesar de expresar el receptor FcεR1.

Conclusión: A nivel sistémico no hay una evidente asociación entre los niveles de IgE y el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, a nivel local la presencia de anticuerpos IgE y de células que expresan su receptor de alta afinidad dentro del infiltrado leucocitario tumoral sugiere una activa participación de esta inmunoglobulina en la respuesta inmune en el sitio de lesión. Además, el bajo porcentaje de DC que unen a la IgE sugiere la presencia de otras poblaciones celulares que podrían estar interaccionando con la IgE en el tejido tumoral.

Palabras clave: Cáncer de mama, Células dendríticas, Inmunoglobulina E, Receptor FcεR1.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is a complex disease that affects a large number of people worldwide. Current treatments are aggressive for the patient, and their effectiveness depends on the stage of the disease, being curative only in early stages. In recent years it has been shown that an important component in the pathogenesis and in response to treatments is the immune response present in the tumor microenvironment. Th2 lymphocytes producing interleukins 4 and 13 (IL-4 and IL-13) have been associated with the accelerated development of mammary tumors by promoting the growth of cancer cells. However, even though the production of immunoglobulin E (IgE) is one of the main effector mechanisms of the Th2 lymphocyte response, there is no experimental evidence of the presence of IgE and its possible involvement in the pathogenesis of the disease. There is experimental evidence in animal models of allergy that show that IgE can be recognized by dendritic cells through the high-affinity receptor FcεR1 to induce Th2 responses. This mechanism could be present in mammary tumors to exacerbate the Th2 response. Especially because the FcεR1 receptor is expressed in most dendritic cells, which are part of the leukocyte infiltrate in breast tumors and are the main inducers of the Th2 response in breast cancer. For this reason, in this project we propose to characterize the presence of IgE in serum and tumor tissue samples and their ability to recognize tumor antigens. As well as the possible interaction with antigen presenting cells through the high affinity receptor for IgE and how it affects the functionality of these cells during lymphocyte activation. Through this knowledge, we will have a better overview of the regulation of the immune response in the tumor microenvironment and the bases for future studies aimed at identifying the mechanisms associated with IgE. This knowledge is very important because, among the new therapeutic strategies that are being developed for the treatment of cancer, immunotherapy stands out because of the promising results that have been observed in animal models and some clinical trials.

Objective: Analyze the ability of IgE antibodies of patients with breast cancer to recognize tumor antigens and interact with dendritic cells for the induction of Th2 lymphocytes..

Material and methods: Assays were performed with isolated tumor cells from breast cancer patients for phenotypic analysis of IgE-positive B lymphocytes by flow cytometry. Additionally, ELISA assays were performed for the detection of IgE immunoglobulin in tumor tissue and peripheral blood. Finally, a western blot assay was performed to identify specific IgE antibodies to tumor antigens. Flow cytometry data were analyzed with Flowjo and GraphPad. For each group of data, a distribution test was carried out and, according to the result, parametric or nonparametric tests were applied in the analysis.

Resources and infrastructure: Obtaining data and clinical samples were carried out in the High Specialty Medical Unit of the Gynecology and Obstetrics Hospital No. 3, National Medical Center la Raza of the Mexican Institute of Social Security. The unit is specialized in the diagnosis, treatment, and monitoring of patients with breast cancer and gynecological tumors, so it has the necessary equipment for taking biopsies and carrying out surgeries for the removal of tumors from which the samples were obtained. The processing of the samples and their analysis by flow cytometry and ELISA were performed in the immunology laboratory of the Morphology and Function Unit of the FES Iztacala UNAM, which has the necessary equipment for flow cytometry and cell culture.

Results: Serum immunoglobulin E levels observed in patients with breast cancer were very similar to those of the control group of healthy individuals; these levels were within the normal ranges reported in the literature. The serum levels of IgE had no significant association with the pathological stage, the grade, the tumor size, the molecular subtype of the tumors, or the involvement of the lymph nodes.

Interestingly, we found the presence of IgE antibodies in the tumor tissue of 50 % of the patients analyzed. As for dendritic cells, both subpopulations mDC and pDC were present in tumor tissue. Fc ϵ R1 receptor expression was mainly observed in the mDC, but only in 20% of the patients were positive for IgE and the receptor. These findings indicate that IgE is present in the tumor microenvironment, and in a percentage of patients could interact with mDCs, however it seems that dendritic cells would not be the main ones in interacting with said immunoglobulin despite expressing the receptor Fc ϵ R1.

Conclusion: At the systemic level, there is no evident association between IgE levels and the development of the disease. However, at the local level, the presence of IgE antibodies and cells expressing the Fc ϵ R1 receptor within the tumor-infiltrating leukocytes suggests an active role of this immunoglobulin in the immune response at the site of injury. In addition, the low percentage of DC that bind IgE suggests the presence of other cell populations that might be interacting with IgE in tumor tissue.

Key words: Breast cancer, Dendritic cells, Immunoglobulin E, Fc ϵ R1 receptor.

MARCO TEORICO

El cáncer de mama es la principal neoplasia que afecta a mujeres a nivel mundial. En nuestro país, desde el año 2006 se convirtió en el cáncer de mayor frecuencia en mujeres sobrepasando al cáncer de cérvix (1). El cáncer de mama es una enfermedad compleja constituida por múltiples subtipos con diferentes características clínicas, patológicas y moleculares (2). La heterogeneidad molecular entre las células neoplásicas de un mismo tumor genera un microambiente complejo de clonas con diferentes susceptibilidades a las drogas utilizadas en el tratamiento, resultandos ineficaces para eliminar a todas las células tumorales (3). El microambiente tumoral está compuesto por células cancerosas, células de la respuesta inmunitaria y células estromales (4-7). Las interacciones dinámicas entre las células que forman parte de dicho microambiente dictaminan las condiciones en las que se produce el desarrollo tumoral. El infiltrado leucocitario en el tejido tumoral es un componente importante en la patogenia y respuesta a los tratamientos. Diversos estudios indican que la presencia de linfocitos CD4+ productores de interferón gamma (IFN γ), de células T CD8 citotóxicas, células “natural killer” (NK), macrófagos M1 y las células dendríticas están asociadas con protección (8, 9). Contrariamente, el infiltrado de células CD4+ productoras de interleucinas 4 y 13, macrófagos M2, células T reguladoras (Treg), células dendríticas plasmacitoides (pDC), y las células mieloides supresoras favorecen el desarrollo tumoral (6, 10-14). Adicionalmente, evidencia experimental confirma la importancia de la respuesta inmune en el tratamiento de cáncer de mama, ya que en gran medida el éxito terapéutico de muchos compuestos usados en quimioterapia es gracias a su capacidad de estimular una respuesta inmune anti-tumoral al inducir una muerte inmunogénica de las células tumorales(15, 16).

Heterogeneidad tumoral y el infiltrado leucocitario.

El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea con múltiples subtipos con diferentes características histológicas y moleculares. Existen diferentes clasificaciones desde las histológicas hasta las basadas en estudios genéticos. Cada subtipo además de las diferencias moleculares tiene un comportamiento biológico distinto que afecta la tasa de supervivencia de los pacientes. Aunque es de suponer que la respuesta inmune y el tipo de infiltrado leucocitario podrían depender del subtipo de cáncer, no existen datos suficientes para determinar el tipo de respuesta inmunitaria generada en cada caso. Recientemente se han reportado por estudios moleculares basados en la expresión de genes que el perfil inmunológico es diferente para cada subtipo de cáncer de mama (17). Las diferencias se encontraron en las proporciones de linfocitos B, linfocitos T CD8 citotóxicos y linfocitos Th1. La mayor infiltración de dichas poblaciones celulares se observó en el subtipo basal, mientras que los subtipos luminales A y B tuvieron la menor infiltración. Estas diferencias parecen estar muy relacionadas con la expresión del receptor de estrógenos (ER). Interesantemente, las proporciones de linfocitos Th2 fueron similares entre todos los subtipos. Otro estudio de expresión génica demuestra que los linfocitos T reguladores son de mal pronóstico indistintamente del subtipo de cáncer (18). Estos dos estudios confirman lo observado en mucha menor escala por estudios de inmunohistoquímica y citometría de flujo que han demostrado que los linfocitos T reg y Th2 se encuentran presentes en la mayoría de los tumores mamarios y están relacionados con un mayor desarrollo tumoral. Sin embargo, estos estudios no distinguen entre los diferentes estadios de los tumores, un factor que pudiera afectar el tipo de infiltrado inmunitario. Existen diferentes estadios de acuerdo al sistema TNM que considera las características del tumor (T), la afectación los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis (M). A continuación, una breve descripción de cada estadio:

Estadio 0: el estadio cero (0) describe una enfermedad que se limita a los conductos y lobulillos del tejido mamario y que no se ha diseminado al tejido circundante de la mama. También se denomina cáncer no invasivo (Tis, N0, M0).

Estadio IA: el tumor es pequeño, invasivo y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos (T1, N0, M0).

Estadio IB: el cáncer se ha diseminado solo a los ganglios linfáticos y mide más de 0.2 mm, pero menos de 2 mm. No hay evidencia de tumor en la mama o el tumor en la mama mide 20 mm o menos (T0 o T1, N1mic, M0).

Estadio IIA: cualquiera de estas condiciones:

- No hay evidencia de un tumor en la mama, pero el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares, aunque no a zonas distantes del cuerpo (T0, N1, M0).
- El tumor mide 20 mm o menos y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares (T1, N1, M0).
- El tumor mide más de 20 mm pero menos de 50 mm y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares (T2, N0, M0).

Estadio IIB: cualquiera de estas condiciones:

- El tumor mide más de 20 mm pero menos de 50 mm y se ha diseminado a un número de 1 a 3 ganglios linfáticos axilares (T2, N1, M0).
- El tumor mide más de 50 mm pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares (T3, N0, M0).

Estadio IIIA: un cáncer de cualquier tamaño que se haya diseminado a un número de 4 a 9 ganglios linfáticos axilares, pero no a otras partes del cuerpo (T0, T1, T2 o T3, N2, M0). El estadio IIIA también puede ser un tumor mayor que 50 mm que se ha diseminado a un número de 1 a 3 ganglios linfáticos (T3, N1, M0).

Estadio IIIB: el tumor se ha diseminado a la pared torácica o ha causado hinchazón o ulceración de la mama. Puede o no haberse diseminado a los ganglios linfáticos debajo del brazo, pero no se ha diseminado a otras partes del cuerpo (T4; N0, N1 o N2; M0).

Estadio IIIC: tumor de cualquier tamaño que no se ha diseminado a partes distantes del cuerpo, pero se ha diseminado a 10 o más ganglios linfáticos axilares o a los ganglios linfáticos del grupo N3 (cualquier T, N3, M0).

Estadio IV (metastásico): el tumor puede tener cualquier tamaño y se ha diseminado a otros órganos, como huesos, pulmones, cerebro, hígado, ganglios linfáticos distantes o pared torácica (cualquier T, cualquier N, M1). Se observa diseminación del cáncer metastásico al momento del primer diagnóstico de cáncer en alrededor del 5 % al 6 % de los casos. Esto se llama cáncer de mama metastásico *de novo*.

Los estadios I y II son considerados tempranos, mientras el estadio III se considera localmente avanzado y el estadio IV cuando el tumor se ha diseminado a sitios distantes se considera como el estadio terminal.

A pesar de que hay muy poca evidencia experimental en el análisis de los diferentes estadios y el tipo de infiltrado inmunitario asociado, la presencia de linfocitos Treg se ha descrito desde estadios muy tempranos como lo es el carcinoma *in situ* hasta los estadios más avanzados. Asimismo, se ha observado que las células dendríticas plasmacitoides (pDC) están asociadas a mal pronóstico y se encuentran infiltrando principalmente tumores en etapas avanzadas (19). Otras poblaciones no han sido analizadas de forma sistemática en diferentes estadios y se requiere de nuevos estudios para evaluar si hay fluctuaciones importantes en cada etapa del desarrollo tumoral.

Respuesta inmunitaria anti-tumoral

La respuesta inmune anti-tumoral en condiciones ideales es mediada principalmente por componentes celulares de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Las principales células de la respuesta inmunitaria innata encargadas de la eliminación de las células tumorales son las células NK, las cuales reconocen la presencia de proteínas alteradas presentadas a través de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase 1 (MHC-I). Así mismo, las células NK pueden reconocer células tumorales que han sido opsonizadas por anticuerpos contra antígenos tumorales y eliminarlas por medio de su efecto citotóxico. Otros mecanismos de la respuesta innata que participan en la respuesta anti-tumoral son la activación del complemento y la acción de células fagocíticas. Dentro de la respuesta inmunitaria adaptativa las principales células encargadas de la respuesta anti-tumoral son los linfocitos T CD8 citotóxicos. El tipo de respuesta inmunitaria adaptativa depende de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ que se activen. Los linfocitos T CD4+ en estado de reposo se conocen como Th0 y dependiendo del tipo de citocinas que producen cuando son activados se pueden clasificar en: Th1 productores de IFN γ e IL-2; Th2 productores de interleucinas 4, 5, 10 y 13; Th3 productores de factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), entre otros. Los linfocitos que favorecen la respuesta anti-tumoral innata y adaptativa son los Th1 por la producción de IFN γ que aumenta la funcionalidad y eficacia de ambas repuestas (20).

Una de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 que juega un papel importante en la patogenia del cáncer de mama son los linfocitos Th2. Las respuestas Th1 y Th2 son antagónicas puesto que las citocinas producidas por cada subpoblación tienen efectos inhibidores en la otra. La presencia de linfocitos Th2 en el microambiente tumoral afecta la eficacia de la respuesta anti-tumoral al disminuir la cantidad de linfocitos Th1 productores de IFN γ . Además, tienen efectos indirectos al inducir la polarización de macrófagos a un fenotipo anti-inflamatorio llamado M2, los cuales

producen citocinas como IL-10 y factores de crecimiento celular. Estos últimos son utilizados por las células neoplásicas para aumentar su capacidad de proliferación.

Los linfocitos Th2 normalmente contribuyen con la respuesta contra parásitos extracelulares como los helmintos. A través de la producción de citocinas como IL-4 e IL-13 inducen la síntesis de anticuerpos IgE en contra de dichos organismos. La inducción de linfocitos Th2 es mediada por DC productoras de IL-4 y que expresan la molécula de co-estimulación OX40L (21). En cáncer de mama se ha descrito la presencia de linfocitos Th2 que secretan IL-4 e IL-13 y se han asociado con un acelerado crecimiento tumoral (10, 14). En los tumores de mama la generación de linfocitos Th2 es inducida por DC presentes en el microambiente tumoral, donde son condicionadas por una citocina de origen tímico expresada por las células tumorales llamada TSLP por sus siglas en inglés (thymic stromal lymphopoietin) (12). TSLP induce la maduración y expresión de OX40L en las DC (12). Al interactuar con los linfocitos T CD4+ las DC tumorales inducen la polarización de las células T para producir IL-4, IL-13 y TNF α (Tumor necrosis factor alfa) pero no IL-10 (12), dicha variante de células Th2 es conocida como células Th2 pro-inflamatorias. Este mecanismo originalmente descrito en modelos animales, también ha sido observado en tumores humanos (12).

No solamente las DC convencionales son capaces de inducir linfocitos Th2 en el microambiente tumoral. Se ha observado que una subpoblación de células dendríticas denominada dendríticas plasmacitoides (pDCs) que infiltran los tumores de mama al estar expuestas a elevados niveles de GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), producido por las células tumorales, adquieren la capacidad de inducir la polarización de los linfocitos T hacia un fenotipo Th2 (14). Los linfocitos Th2 secretan IL-4 e IL-13, las cuales promueven el desarrollo tumoral al inducir la polarización de macrófagos M2 y la producción de factores de crecimiento que aceleran la proliferación de las células cancerosas (10, 22-24). Además, se ha observado que estas dos citocinas están involucradas en la supresión local de la respuesta inmune anti-tumoral, en la promoción de metástasis

y resistencia a apoptosis de las células tumorales (25). La presencia de IL-13 se puede observar tanto en el tejido tumoral como en el tejido adyacente al tumor, sin embargo hay una mayor expresión dentro del tejido tumoral que correlaciona positivamente con el tamaño de los tumores (26). La función promotora del desarrollo tumoral de la IL-13 en cáncer de mama se ha confirmado en modelos animales en donde se bloquea su actividad biológica (10).

Los linfocitos Th2, ampliamente estudiados en las infecciones parasitarias por helmintos y en procesos alérgicos, utilizan como uno de sus mecanismos efectores más importantes la producción de anticuerpos IgE. A pesar de que la respuesta Th2 es característica en cáncer de mama no existen reportes acerca de la presencia de IgE y su participación en la patogenia de la enfermedad. En relación a lo anterior en ensayos preliminares hemos detectado la presencia de anticuerpos IgE en muestras de tejido tumoral de cáncer de mama, así como linfocitos B con IgE de membrana. Aunque no existen reportes acerca de la IgE en cáncer, estudios recientes demuestran que los anticuerpos IgE sintéticamente desarrollados contra algunos antígenos tumorales como HER2 son mejores inductores de la respuesta celular citotóxica dependiente de anticuerpos que los de tipo IgG (27), así mismo en un modelo con ratones transgénicos inducen la presentación cruzada en células dendríticas a través del receptor FcεR1 favoreciendo la activación de células T CD8 citotóxicas (27, 28). Lo anterior puede sugerir que la presencia de anticuerpos IgE en tumores mamarios quizás es representativa de una respuesta anti-tumoral. Sin embargo, en procesos alérgicos no se observa la expansión de células T CD8 citotóxicas, lo cual puede explicarse por la presencia de elevados niveles de IL-4 que inhibe la presentación cruzada antes mencionada (28). Una situación similar puede ocurrir en el microambiente tumoral donde existe una importante producción de IL-4 y 13. Adicionalmente, otro estudio describe que los anticuerpos IgE unidos a células dendríticas por el receptor FcεR1 exacerban la respuesta Th2 al interactuar con alérgenos (29). Este mecanismo puede ser importante para exacerbar la respuesta Th2 en los tumores mamarios, especialmente porque el receptor FcεR1 se expresa en la mayoría de las células dendríticas (34), las cuales

forman parte del infiltrado tumoral. Los estudios anteriores sugieren que la presencia de anticuerpos IgE puede ser un mecanismo que potencie la polarización de los linfocitos intra-tumorales hacia un fenotipo Th2 lo cual favorecería el desarrollo tumoral, sin embargo, no existen datos experimentales acerca de esta hipótesis. La caracterización de los mecanismos de inmuno-regulación e inmunosupresión es de gran importancia para la identificación de blancos terapéuticos que permitan el desarrollo de nuevas terapias inmunológicas en cáncer (7, 23, 30-32). Por tal motivo en la presente propuesta tenemos como objetivo analizar las propiedades funcionales de la inmunoglobulina E presente en muestras clínicas de suero y tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances en el diagnóstico y en los tratamientos el cáncer de mama continúa siendo el de mayor incidencia y mortalidad en mujeres mexicanas. Los tratamientos actuales pueden ser curativos en etapas tempranas de la enfermedad, sin embargo, la tasa de recurrencia es elevada y su eficacia disminuye dramáticamente en estadios avanzados o recurrentes. El desarrollo de nuevos tratamientos para el cáncer de mama que sean capaces de impactar la sobrevida de los pacientes y disminuir la recurrencia de la enfermedad son primordiales para disminuir su mortalidad. La caracterización de los mecanismos inmuno-reguladores mediados por la IgE en el microambiente tumoral permitirá la identificación de moléculas y células responsables de la inmunosupresión observada en dichos pacientes. A través de dicho conocimiento se podrán diseñar estrategias terapéuticas para modular la respuesta inmune local que eviten o inhiban los mecanismos inmunosupresores que interfieren con el desarrollo de una respuesta anti-tumoral.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el presente proyecto se propuso analizar la posible contribución de la inmunoglobulina E (IgE) en la patogenia del cáncer de mama. La IgE ha sido ampliamente estudiada en la respuesta a parásitos y en los procesos alérgicos. En ambos casos se ha descrito la participación de la IgE en conjunto con células como los mastocitos y basófilos. Recientemente, se ha observado que además de estas dos poblaciones celulares las células presentadoras de antígenos como los monocitos y células dendríticas expresan el receptor de alta afinidad (FcεR1) para la IgE, aunque su papel en estas células no se conoce por completo, la evidencia experimental sugiere que puede tener una función reguladora que facilita la presentación de antígenos para la inducción de la respuesta de linfocitos Th2. Al mismo tiempo hay datos que también sugieren que la presentación de antígenos a través del receptor FcεR1 permite la presentación cruzada para la activación de linfocitos T CD8 citotóxicos. En cáncer se desconoce totalmente la participación de la IgE en el desarrollo tumoral, sin embargo, se ha descrito por nuestro grupo y otros la importancia de la respuesta Th2 en los tumores de mama y de páncreas. En ambos casos constituye un mecanismo por el cual los tumores manipulan la respuesta inmune para favorecer su desarrollo. Las respuestas Th2 se caracterizan por la producción de elevados niveles de IgE que es una de las moléculas claves en la respuesta efectora. Interesantemente, hemos observado la presencia de anticuerpos IgE en lisados de tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama y por esa razón se propuso investigar su posible participación en la regulación de la respuesta, especialmente a través del posible reconocimiento de antígenos tumorales y de su interacción con las células dendríticas, que como se ha descrito son las principales responsables de la inducción de linfocitos Th2 en el microambiente tumoral. Alternativamente a la inducción de respuestas Th2, la IgE puede tener un efecto anti-tumoral al reconocer antígenos tumorales e inducir la activación de mecanismos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos y de linfocitos CD8 citotóxicos. También es posible que ambos mecanismos se presenten de forma simultánea y que el curso de la respuesta y el desarrollo tumoral dependan de un balance entre los dos mecanismos. El análisis de estos mecanismos sirve

para tener un conocimiento más claro de la inmuno-regulación en cáncer de mama mediado por la IgE. La importancia de caracterizar estos mecanismos es encontrar posibles blancos terapéuticos que permitan diseñar estrategias de manipulación de la inmunidad para favorecer la inducción o restablecimiento de la respuesta anti-tumoral y con ello favorecer el rechazo de las células neoplásicas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe la presencia de inmunoglobulina E en tumores primarios de pacientes con cáncer de mama y sus niveles séricos se asocian con el desarrollo de la enfermedad?

OBJETIVOS

Objetivo General:

Analizar la capacidad de anticuerpos IgE de pacientes con cáncer de mama para reconocer antígenos tumorales e interactuar con células dendríticas para la inducción de linfocitos Th2 y/o CD8 citotóxicos.

Objetivos específicos:

1. Medir los niveles de IgE totales en el suero de pacientes con cáncer de mama y compararlos con un grupo de donadores sanos para evaluar si hay un aumento significativo en los pacientes. *
2. Identificar en lisados de tejido tumoral la presencia y cantidad de anticuerpos IgE mediante una técnica de ELISA y compararlos con tejido mamario no afectado por el cáncer (tejido normal distal al tumor y tejido mamario sin afección distal a lesiones benignas). *
3. Analizar por citometría de flujo la frecuencia de linfocitos B, Monocitos/macrófagos (Mo/Ma) y células dendríticas (DCs) con IgE de membrana, así como la expresión del receptor de alta afinidad para IgE (FcER1) en Mo/Ma y DCs y su fenotipo en sangre y tejido tumoral.
4. Evaluar si los anticuerpos IgE presentes en el suero de pacientes con cáncer de mama reconocen antígenos tumorales mediante ensayos de western blot.*
5. Determinar si hay alguna correlación de las frecuencias o el fenotipo de las poblaciones celulares analizadas, o de los niveles de IgE con los datos clínicos patológicos de los pacientes (estadio, expresión de marcadores moleculares, histología y afección de ganglios regionales).

6. Desarrollar ensayos funcionales de activación de células dendríticas (mieloides y plasmacitoides) con IgE y antígenos tumorales para evaluar la producción de IL-12, INF α e IL-10 y la expresión de ICOSL y OX40L.
7. Mediante ensayos de activación linfocitaria alogénica evaluar el perfil de citocinas inducido en linfocitos T CD4 y CD8 por células dendríticas activadas por complejos IgE-antígeno tumoral vía el receptor Fc ϵ R1.

* Para estos objetivos además de las muestras prospectivas se utilizaron muestras de un banco de sueros y de tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama obtenidos previamente y para los cuales se obtuvo el permiso informado de los pacientes donantes.

HIPÓTESIS

Postulamos que los anticuerpos IgE presentes en pacientes con cáncer de mama son capaces de reconocer antígenos de las células tumorales y activar a las células dendríticas a través del receptor de alta afinidad FcεR1, modulando su funcionalidad para favorecer el desarrollo de células Th2.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se revisaron muestras de tumor y sangre periférica de pacientes con cáncer de mama diagnosticadas de marzo del año 2016 a junio de 2019. Se incluyeron en el estudio solo aquellas enfermas que reunieron los criterios de selección.

Se recabaron los reportes definitivos de patología de las pacientes y se realizó la información.

Se compararon los resultados con reportes previos de la literatura nacional e internacional.

Tipo de estudio: Transversal y descriptivo.

Diseño del estudio: Serie de casos.

Lugar del estudio: El estudio se realizó en la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3, Centro Médico Nacional la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el laboratorio de Investigación en Inmunología, Unidad de Morfología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión de pacientes:

- Mujeres con cáncer de mama confirmado por estudio histopatológico sin restricción de edad.
- Las pacientes incluidas fueron de recién diagnóstico sin tratamiento previo para cáncer de mama.
- Los estadios de los tumores fueron primordialmente tempranos I y II que son los estadios que prevalecen en pacientes que no han recibido tratamiento de quimioterapia o radioterapia y que son candidatas a tratamiento quirúrgico.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con enfermedades concomitantes que afecten la respuesta inmune.
- Pacientes bajo tratamiento con quimioterapia o radioterapia.
- Pacientes que no quieran participar en el estudio.

POBLACIÓN, MUESTRA Y MÉTODO DE MUESTREO

Muestras clínicas: De cada paciente se obtuvo el consentimiento informado por escrito antes de la donación de tejidos. El número de muestras se determinó considerando que es un estudio de ciencia básica enfocado a identificar la presencia de la inmunoglobulina E en el microambiente tumoral y sangre periférica y su posible asociación con el desarrollo de la enfermedad. También se consideró los recursos presupuestales y la capacidad de procesamiento de las muestras del personal de laboratorio de investigación.

Sangre periférica. Por punción venosa en el brazo se obtuvieron 20 ml de sangre en tubos con heparina. Una vez recolectada la sangre en el tubo se mezcló suavemente para homogenizar con la heparina y evitar la formación de trombos. Posteriormente se mantuvieron a 4 °C para ser transportada al laboratorio.

Tejido. Las muestras de tejido mamario se obtuvieron por medio de biopsias o de tejido extraído durante mastectomía terapéutica o cirugía conservadora de la mama. Se colectó una muestra de tejido tumoral y el tamaño de la muestra para tejido postoperatorio dependió de las dimensiones del tumor extraído, pero en condiciones ideales se colectó tejido de 1-3 cm³. El tejido se colocó en un recipiente estéril con medio de cultivo DMEM suplementado con penicilina y estreptomina y se mantuvo a 4 °C para su transportación al laboratorio.

Población: Pacientes atendidas en la UMAE HGO No. 3 del CMN “La Raza” IMSS en el servicio de Oncología Quirúrgica con diagnóstico de cáncer de mama en el estudio transoperatorio.

Método de muestreo: No probabilístico. Se trató de una serie de casos.

Procesamiento: La sangre fue fraccionada por gradiente de centrifugación (Lymphoprep). Las células mononucleares se colocaron en un tubo nuevo de 15 mL y se lavaron con buffer de fosfatos salino pH 7.4 (PBS). Finalmente, las células se resuspendieron en PBS y se determinó su número y viabilidad utilizando azul tripan. Las células obtenidas se utilizaron para citometría de flujo.

El tejido mamario se cortó en fragmentos pequeños que fueron digeridos con una mezcla de 0.5 mg/mL de colagenasa y 0.2 mg/mL de DNasa 1 en medio DMEM a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se disgregó el tejido y se removieron los fragmentos de tejido conectivo por filtración en mallas metálicas (50 micras). La suspensión celular se lavó 2 veces con PBS. Posteriormente las células muertas y eritrocitos fueron removidos por gradiente de centrifugación. Finalmente se determinó el número y viabilidad celular con azul de tripan. Las células obtenidas se utilizaron para citometría de flujo.

Citometría de flujo. Las suspensiones celulares obtenidas de las muestras clínicas fueron analizadas por citometría de flujo. La identificación de células dendríticas se realizó por el fenotipo CD3-/CD19-/CD20-/CD56-/CD14-/CD16-/HLA-DR+/CD11c. Se analizó la expresión de IgE y la expresión del receptor FcεR1. Las células fueron tenidas con anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos durante 10 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Posteriormente se lavaron para remover el exceso de anticuerpos y se analizaron en un citómetro de

flujo BD y los datos se analizaron con el software Flowjo. El panel de anticuerpos se ilustra en la tabla 1.

Tabla 1. Panel de anticuerpos para citometría de flujo

Fluoro-cromo/tubo	DCs 1	DCs 2	Monocitos/Macrófagos/ Linfocitos B
FITC	LIN	LIN	CD14
Pe	FcεR1	OX40L	FcεR1
PercP	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR
APC	IgE	ICOSL	IgE
APC-H7	CD11c	CD11c	
PeCy7	CD123	CD123	CD19
V-450	CD45	CD45	CD45

Lisados de tejido tumoral. El tejido tumoral congelado colocado en 500 ml de medio DMEM y fue sometido a 5 ciclos de congelación y descongelación a -70 °C, posteriormente se terminó de disgregar el tejido mediante acción mecánica. Los fragmentos de tejido no soluble fueron separados por centrifugación y la fracción soluble fue inactivada por calor a 60 °C por 30 minutos y finalmente filtrada con filtros de 0.2 micrómetros. Se cuantificó la concentración total de proteínas con el método de Bradford y se almacenaron a -70 °C hasta su utilización.

Cuantificación de IgE. Los niveles de IgE se analizaron por una prueba de ELISA comercial (ebiosciences cat. 88-50610) de acuerdo con las instrucciones del kit. Se analizaron las muestras de sueros obtenidas de pacientes y donadores sanos por duplicado. De igual forma se analizó la cantidad de IgE en los lisados de los tejidos tumorales. Para determinar los valores de IgE, los datos de densidad óptica de la ELISA se analizaron en el software disponible en la página web www.elisaanalysis.com. En el cual se realizó un análisis de regresión a partir de una curva patrón de concentración conocida de IgE. Posteriormente se interpolaron

datos y se multiplicaron por el factor de dilución, para conocer las concentraciones de IgE.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis de los resultados. Los datos de citometría de flujo se analizaron mediante el programa Flowjo. Posteriormente se analizó la frecuencia comparativamente entre los diferentes tejidos (sangre y tejido tumoral de mama) para la búsqueda de diferencias significativas de las diferentes poblaciones leucocitarias a determinar. Estos análisis se realizaron con el programa GraphPad. Para cada grupo de datos se realizó una prueba de distribución y de acuerdo con el resultado se aplicaron pruebas paramétricas o no paramétricas en el análisis.

ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD.

A pesar de que el cáncer de mama no está asociado con alguna enfermedad infecciosa, las muestras clínicas que se analizaron, que incluyen sangre y tejidos, son considerados residuos infectocontagiosos. Por lo cual fueron manejados de acuerdo con las recomendaciones y normas que aplican para dichos residuos, que se enlistan en la carta de bioseguridad y a continuación.

- a) NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
- b) Manual: Bioseguridad en laboratorios biomédicos y microbiológicos 2009, (5ª Edición), Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC), Institutos Nacionales de Salud, Departamento de Salud y Servicios Humanos, USA
- c) Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental–Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI)–Clasificación y especificaciones de manejo.
- d) Manual de procedimientos para el manejo y control de residuos Biológico-Infecciosos y Tóxico-Peligrosos en Unidades de Atención Médica del I.M.S.S. (1996)
- e) REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud
- f) NORMA Oficial Mexicana NOM-007-SCT2/2010, Mercado de envases y embalajes destinados al transporte de sustancias y residuos peligrosos.
- g) NORMA Oficial Mexicana NOM-005-SCT/2008, Información de emergencia para el transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.

Para el manejo de las muestras clínicas se utilizó el sistema de triple embalaje. Recipientes primarios: La sangre se recolecto en tubos de plástico tubos BD Vacutainer® con heparina de litio de 10 mL con tapa de goma hermética. Las

muestras de tejido tumoral se almacenaron en frascos estériles de plástico con tapa de rosca hermética de 50 mL. Recipiente secundario: Los tubos y frascos fueron envueltos en abundante papel absorbente, para absorber todo su contenido en caso de ruptura o fuga. Y se colocaron dentro de un recipiente plástico con tapa hermética. Recipiente exterior o terciario: El contenedor secundario fue transportado dentro de una hielera de plástico sólido con tapa hermética de la marca coleman con gel refrigerante para mantener la temperatura a 4 °C. El responsable del traslado y biocustodia de las muestras clínicas a la FES Iztacala fue el Dr. Alexander Pedroza González.

Las muestras clínicas fueron procesadas en una campana de bioseguridad nivel II. Todo material que entro en contacto con el material biológico fue desechado en bolsas de plástico que posteriormente fueron incineradas. Los líquidos derivados de las muestras clínicas fueron inactivados con hipoclorito de sodio antes de desecharse. Las células derivadas de la sangre y tejidos que se analizaron por citometría de flujo fueron fijadas con para-formaldehído al 10% antes de su análisis para inactivar cualquier agente biológico. Finalmente, las células que se utilizaron en los ensayos funcionales fueron inactivadas con hipoclorito de sodio al final de los ensayos. Los estudiantes responsables del manejo de las muestras clínicas recibieron capacitación para el manejo de las mismas y fueron supervisados por el Dr. Pedroza.

RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD.

Nombre: Patricia

Apellido Paterno: Alanis

Apellido Materno: López

Nivel Académico: Especialista en Ginecología y obstetricia. Especialidad en Ginecología Oncológica.

Especialidad: Ginecología y obstetricia/ Ginecología Oncológica.

Institución: INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Adscripción: Servicio de Oncología Quirúrgica de la UMAE HGO 3 CMN la RAZA IMSS

Pertenece al SI: NO

Producto que generará: Redacción de manuscritos y tesis de especialidad

Información Relevante: La Dra. Alanis trabaja en la Unidad Médica de Alta Especialidad en Ginecología y Obstetricia Núm. 3, Centro Médico Nacional La Raza y colabora en la División de Enseñanza de dicho Centro.

Actividades Específicas: Superviso el reclutamiento de los pacientes, la toma de muestras de sangre y tejido mamario.

Domicilio: Seris y Antonio Valeriano SN col La Raza Ciudad de México. 029900

Correo: drapatriciaalanis@yahoo.com.mx

Nombre: Alexander

Apellido Paterno: Pedroza

Apellido Materno: González

Nivel Académico: Doctor en Ciencias en la especialidad de Patología Experimental

Especialidad: Inmunología

Institución: Universidad Nacional Autónoma de México.

Adscripción: Carrera de Médico Cirujano, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Pertenece al SNI: Si, Nivel I

Producto que generará: Redacción de manuscritos para publicación y tutor de estudiantes de licenciatura y maestría para obtención de grado.

Información Relevante: El Dr. Pedroza-González ha trabajado en el área de inmunología del cáncer en humanos por más de 10 años, nueve de los cuales fueron en el extranjero (Texas, USA y Rotterdam, Holanda) y ha publicado 20 artículos en revistas internacionales.

Actividades Específicas: Superviso el procesamiento de las muestras y el análisis de resultados.

Domicilio: Av. De los barrios S/N, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.

Correo: alexander_pg@yahoo.com.mx

Nombre: Gina Stella

Apellido Paterno: García

Apellido Materno: Romo

Nivel Académico: Doctor en Ciencias en la especialidad de Patología Experimental

Especialidad: Inmunología

Institución: Universidad Nacional Autónoma de México.

Adscripción: Carrera de Médico Cirujano, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Pertenece al SNI: Si, Nivel I

Producto que generará: Redacción de manuscritos para publicación y tutor de estudiantes de licenciatura.

Información Relevante: La Dra. García ha trabajado en el área de inmunología.

Actividades Específicas: Superviso el procesamiento de las muestras y el análisis de resultados.

Domicilio: Av. De los barrios S/N, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.

Correo: garciaromogina@gmail.com

Nombre: Elio Alejandro

Apellido Paterno: González

Apellido Materno: Bermúdez

Nivel Académico: Especialista en Ginecología y obstetricia. Cursando el segundo año de la Especialidad de Ginecología Oncológica.

Especialidad: Ginecología y obstetricia

Institución: INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Adscripción: división de investigación de la UMAE HGO 3 CMN la RAZA IMSS

Pertenece al SI: NO

Producto que generará: Redacción de manuscritos y tesis de especialidad

Información Relevante: El Dr. Elio Alejandro González Bermudez realiza la especialidad de ginecología oncológica en la Unidad Médica de Alta Especialidad en Ginecología y Obstetricia Núm. 3, Centro Médico Nacional La Raza y en la División de Enseñanza de dicho Centro.

Actividades Específicas: Superviso el reclutamiento de los pacientes, la toma de muestras de sangre y tejido mamario.

Domicilio: Seris y Antonio Valeriano SN col La raza Ciudad de México. 029900

Correo: elio_alejandro@outlook.com

Nombre: Verónica

Apellido Paterno: Gutiérrez

Apellido Materno: Osorio

Nivel Académico: Especialista en Anatomía Patológica.

Especialidad: Anatomía Patológica.

Institución: INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Adscripción: División de investigación de la UMAE HGO 3 CMN la RAZA IMSS

Pertenece al SNI: NO

Producto que generará: Redacción de manuscritos y tesis de especialidad

Información Relevante: La Dra. Verónica Gutiérrez Osorio trabaja en la Unidad Médica de Alta Especialidad en Ginecología y Obstetricia Núm. 3, Centro Médico Nacional La Raza, tiene experiencia clínica y ha colaborado en asesoría de tesis.

Actividades Específicas: Superviso el reclutamiento de los pacientes, la toma de muestras de sangre y tejido mamario.

Domicilio: Seris y Antonio Valeriano SN col La raza Ciudad de México. 029900

Correo: Veronica4023@gmail.com

Nombre: Aldo Aram

Apellido Paterno: Hernández

Apellido Materno: Aparicio

Nivel Académico: Médico Cirujano.

Especialidad: Medicina.

Institución: Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

Adscripción: Unidad de morfología y función FES Iztacala UNAM

Pertenece al SNI: NO

Producto que generará: Redacción de manuscritos, capacitación en la toma de muestras de tejido tumoral y manejo de técnicas inmunológicas.

Información Relevante: El estudiante está capacitado en el manejo de muestras clínicas y su procesamiento en el laboratorio.

Actividades Específicas: Participo en la toma de muestras de sangre y tejido mamario, así como su transporte y procesamiento en el laboratorio.

Domicilio: Av. De los barrios S/N, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.

Correo: aramh2107@gmail.com

Nombre: Janik Adriana

Apellido Paterno: Tomas

Apellido Materno: Morales

Nivel Académico: Pasante de la licenciatura de Biología.

Especialidad: Medicina.

Institución: Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

Adscripción: Unidad de morfología y función FES Iztacala UNAM

Pertenece al SNI: NO

Producto que generará: Redacción de manuscritos

Información Relevante: El estudiante está capacitado en el manejo de muestras clínicas y su procesamiento en el laboratorio.

Actividades Específicas: Participo en la toma de muestras de sangre y tejido mamario, así como su transporte y procesamiento en el laboratorio.

Domicilio: Av. De los barrios S/N, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.

Correo: janik.tomas.97@hotmail.com

Nombre: Daniel

Apellido Paterno: Ríos

Apellido Materno: Quintero

Nivel Académico: Pasante de la licenciatura de Biología.

Especialidad: Medicina.

Institución: Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

Adscripción: Unidad de morfología y función FES Iztacala UNAM

Pertenece al SNI: NO

Producto que generará: Redacción de manuscritos

Información Relevante: El estudiante está capacitado en el manejo de muestras clínicas y su procesamiento en el laboratorio.

Actividades Específicas: Participo en la toma de muestras de sangre y tejido mamario, así como su transporte y procesamiento en el laboratorio.

Domicilio: Av. De los barrios S/N, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.

Correo: drrios1400@gmail.com

Recursos: La obtención de datos y muestras clínicas se llevó a cabo en la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3, Centro Médico Nacional la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social. La unidad está especializada en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de pacientes con cáncer de mama y tumores ginecológicos por lo que cuenta con el equipo necesario para la toma de biopsias y la realización de cirugías para la extirpación de tumores. Procedimientos a partir de los cuales se obtuvieron las muestras clínicas para el presente estudio. Además de contar con equipo de cómputo que será utilizado para la generación de las bases de datos clínicos. El procesamiento de las muestras y su análisis por citometría de flujo se realizaron en el laboratorio de inmunología de la Unidad de Morfología y Función de la FES Iztacala UNAM, que cuenta con el equipo necesario como centrifuga, micropipetas, microscopio óptico y de fluorescencia, cámaras de incubación, un micrótomo, un lector de ELISA y equipo para PCR. Así mismo, cuenta con un cuarto de cultivo equipado con una campana de bioseguridad tipo II, dos incubadoras de células con CO₂, un microscopio invertido y materiales accesorios de cultivo celular como son micropipetas, medios de cultivo y material de cultivo desechable. La FES Iztacala tiene una unidad de citometría donde se localiza un citómetro de flujo BD FACSAria-Fusion con capacidad para analizar 9 parámetros diferentes y de separación de poblaciones celulares (cell sorting) que fue utilizado para el análisis de las muestras.

Financiamiento: El presente proyecto conto con financiamiento de la UNAM (proyecto PAPIIT IA208717: “Análisis de la participación de la inmunoglobulina E en la respuesta inmunitaria en cáncer de seno”).

Factibilidad: El grupo de trabajo estuvo constituido por expertos en diferentes áreas que complementarán sus conocimientos permitiendo un adecuado desarrollo de la investigación que conlleva aspectos básicos y clínicos. La experiencia de los investigadores en el manejo y tratamiento de pacientes permitió una óptima recolección de muestras clínicas y elaboración de bases de datos clínicos que

fueron utilizados en el proyecto en el tiempo establecido. La investigación clínica estuvo a cargo de la ginecóloga oncóloga Dra. Patricia Alanís López y el Dr. Elio Alejandro González Bermúdez residente de la especialidad de ginecología oncológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3, Centro Médico Nacional la Raza del IMSS. En tanto la investigación básica e inmunológica estuvo a cargo del Dr. Alexander Pedroza González de la FES Iztacala, quien tiene una amplia experiencia en el desarrollo y análisis de protocolos de investigación en inmunología del cáncer lo que garantiza un adecuado desarrollo y análisis de los experimentos planeados.

ASPECTOS ÉTICOS

El estudio de las muestras clínicas es de tipo prospectivo y descriptivo ya que no se realizó ninguna intervención en las pacientes, y se condujo bajo el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y la declaración de Helsinki de 1975 y sus enmiendas, así como los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica. Las muestras de sangre fueron obtenidas al momento de puncionar para la toma de estudios convencionales o al canalizar la vena para ingreso a cirugía y solo se tomaron 20 mL de sangre. Las muestras de tejido mamario se obtuvieron durante los procesos de cirugía terapéutica indicada como parte del tratamiento y se tomó una pequeña porción del tejido extraído que normalmente es desechado. Es un estudio con riesgo menor al mínimo para la paciente ya que no se requirió de ningún procedimiento extra al cual son sometidas normalmente las pacientes. Los nombres de las pacientes fueron manejados confidencialmente y no serán utilizados en ningún reporte o análisis de datos. Solo el médico tratante conocerá dicho dato y se asignará un código de identificación que será utilizado en la investigación. Se solicitó consentimiento informado para participar en este estudio. De las muestras biológicas de tejido se guardó un pequeño fragmento de 0.3 cm³ por crio preservación para establecer un banco de tejido de referencia. El resguardo de las muestras se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM y el responsable del resguardo de las mismas es el Dr. Alexander Pedroza González.

RESULTADOS PRELIMINARES

Para los diferentes estudios se analizaron muestras obtenidas de nuevos pacientes reclutados prospectivamente y de un banco de sueros y tejido tumoral previamente colectado en un estudio previo (número de registro R-2016-785-015), donde se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes para el resguardo y utilización de las muestras en futuros análisis. El origen y número de las muestras será descrito en las secciones correspondientes de cada ensayo realizado.

Niveles de IgE sérica.

Se analizaron 84 muestras de suero de pacientes con cáncer de mama, de las cuales 71 provienen del banco de sueros y 13 fueron de nuevo ingreso. También se utilizó el suero de 32 individuos sanos de donadores voluntarios recolectados en la FES-Iztacala. Las muestras de suero de donadores y pacientes fueron analizadas por la técnica de ELISA para determinar la concentración de IgE total (figura 1). Se observaron niveles de IgE similares entre donadores sanos y los pacientes con cáncer de mama. Los datos no tuvieron una distribución normal de acuerdo a la prueba estadística de normalidad de Shapiro-Wilk por lo cual los grupos se analizaron por una prueba de Mann Whitney, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos ($P = 0.6$).

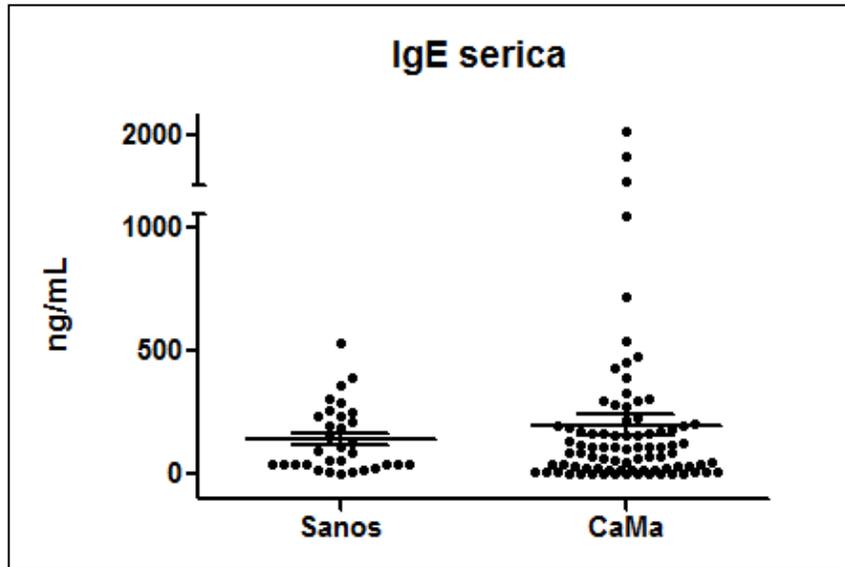


Figura 1. Niveles de IgE sérica en pacientes con cáncer de mama. Los niveles de inmunoglobulina E medidos por ELISA en pacientes con cáncer de mama (CaMa) comparados con un grupo control de individuos sanos. La diferencia entre las medias grupales se analizó por una prueba de Mann Whitney ($P = 0.6$).

Asociación de los niveles de IgE séricos con parámetros clínico patológicos.

Al estratificar las muestras por las diferentes características clínico patológicas como la edad de las pacientes o el subtipo histológico o molecular de los tumores (figura 2) no se encontraron diferencias significativas en los niveles de IgE. Similarmente cuando se analizó los niveles de IgE con base al desarrollo de la enfermedad con parámetros como el estadio, grado, tamaño tumoral o el estatus de los ganglios regionales no se observaron diferencias significativas en los niveles séricos (figura 3).

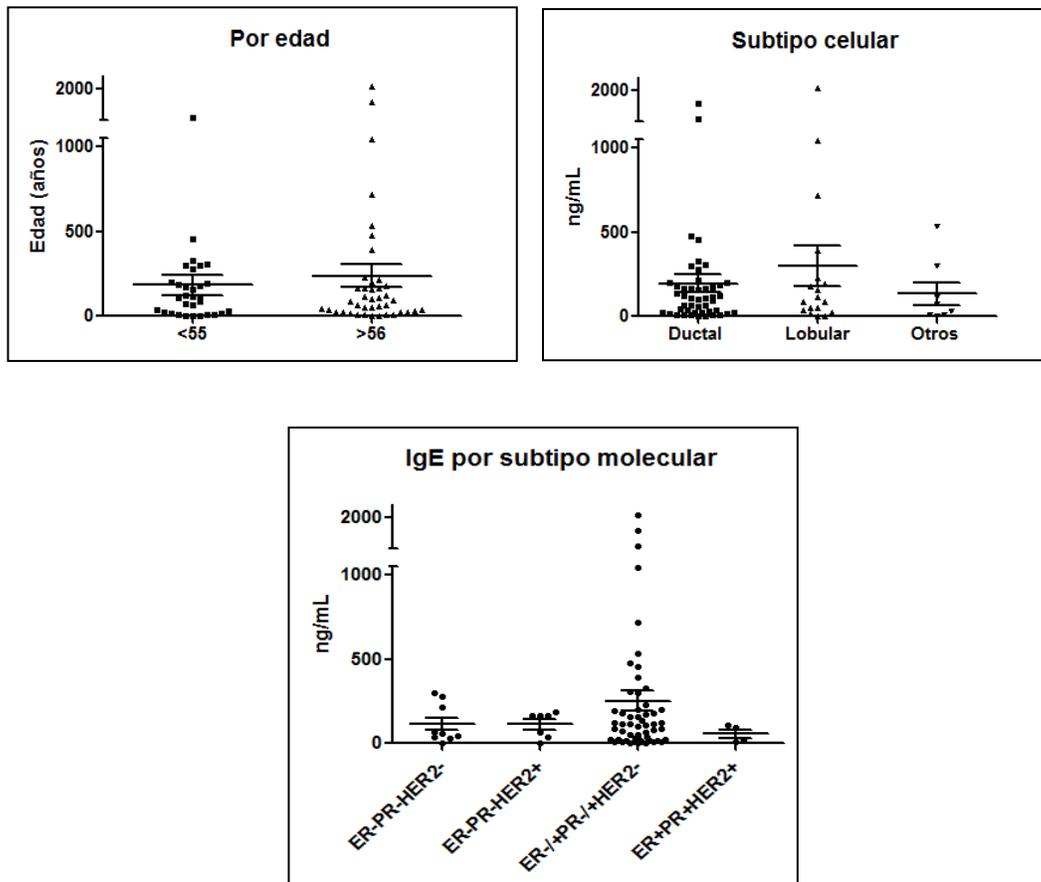


Figure 2. Niveles de IgE de acuerdo a la edad o subtipo de tumor. Los pacientes fueron agrupados de acuerdo con su edad, subtipo histológico o molecular del tumor para comparar los niveles de IgE sérica.

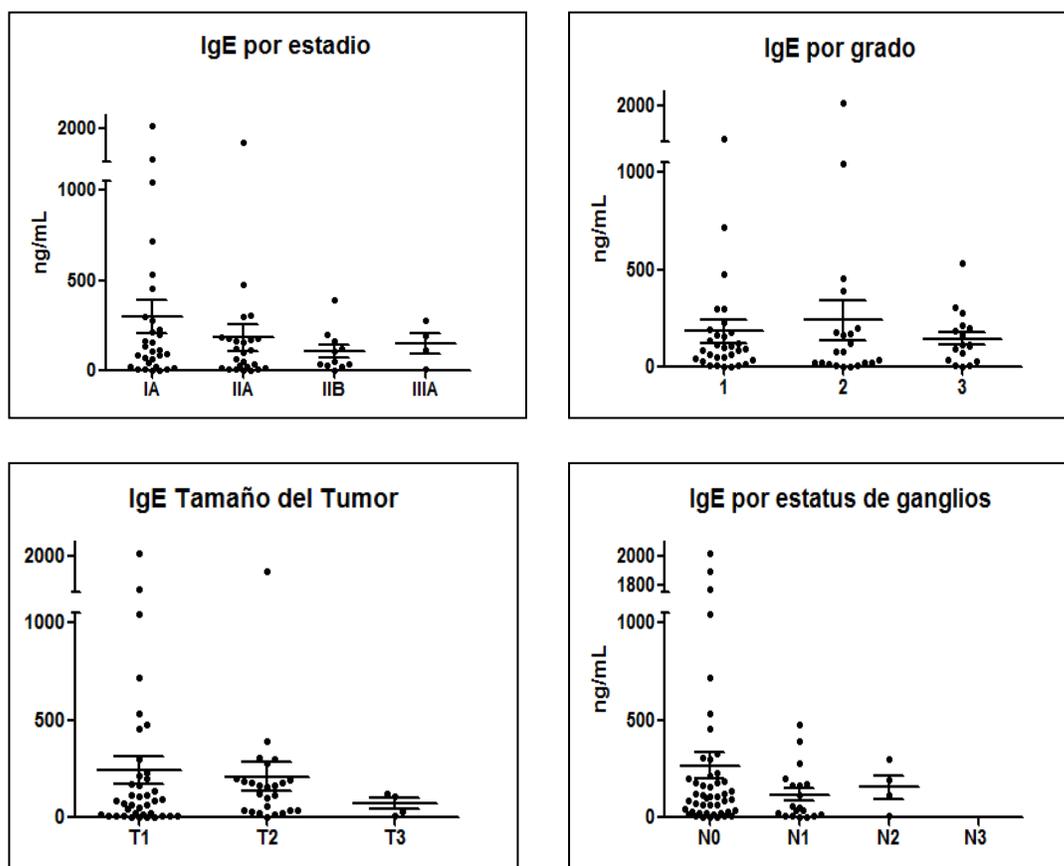


Figura 3. Niveles séricos de IgE de acuerdo al desarrollo tumoral. Los pacientes se agruparon de acuerdo con el estadio, grado, tamaño o estatus de los ganglios linfáticos. No se observaron diferencias significativas en los niveles de IgE sérica.

Presencia de IgE en el microambiente tumoral

Para identificar la presencia de IgE en el tejido tumoral se realizaron lisados de las muestras de tejidos con un buffer de lisis y maceración. La fase soluble de los lisados fue analizada por la técnica de ELISA para IgE. Se analizaron 10 muestras de tejido tumoral, de las cuales en 5 (50%) se detectó la presencia de IgE. Los niveles detectados fueron muy variables con un rango de 4.5 a 35 ng/mL con una media de 15.6 ± 6.4 ng/mL (figura 4).

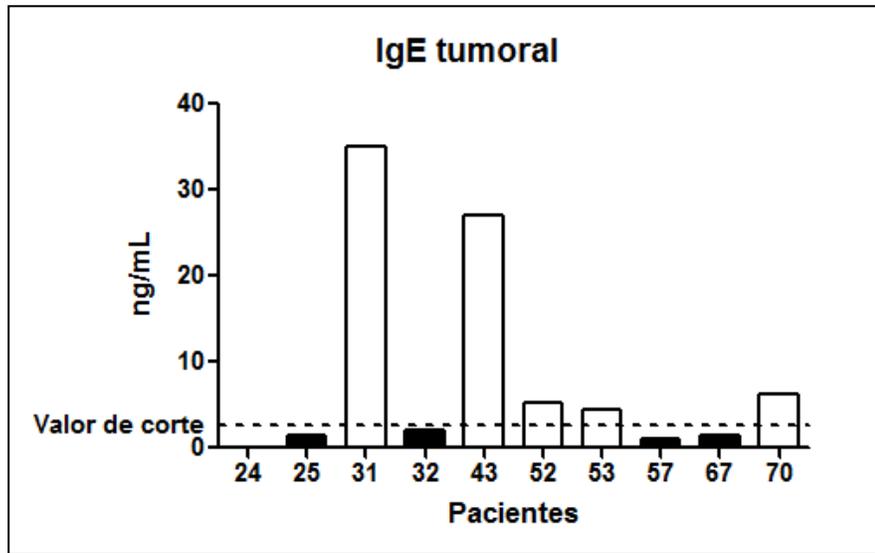


Figura 4. IgE tumoral. Se cuantificó la cantidad de IgE en los lisados de tejido tumoral mediante la técnica de ELISA. Las barras negras muestran a las muestras con valores por abajo del valor de corte, en tanto las barras blancas representan a aquellas muestras con valores superiores al valor de corte de la ELISA.

Capacidad de reconocimiento de antígenos tumorales por la IgE

Debido a la limitada cantidad de tejido tumoral disponible no es posible analizar las propiedades funcionales de la IgE tumoral, lo cual ya había sido considerado durante la elaboración del protocolo por lo que solo se planteó medir la capacidad de reconocimiento de antígenos tumorales a la IgE sérica. Para ello se tomaron lisados de tejido tumoral y se separaron en geles de electroforesis que posteriormente fueron trasferidos a membranas de PVDF (Polyvinylidene difluoride) especiales para la técnica de western blot (figura 5).

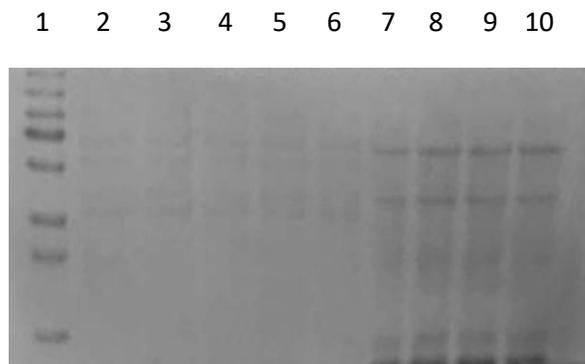


Figura 5. Membrana de PVDF transferida con proteínas de lisados tumorales. Lisados tumorales fueron separados en geles de poliacrilamida por electroforesis. Posteriormente trasferidos a una membrana de PVDF teñida con rojo Ponceau. Carril 1 marcadores de peso molecular, carriles 2-10 lisados tumorales.

Una vez transferidas las proteínas del tejido tumoral a las membranas, se realizó una inmunotinción utilizando sueros autólogos al lisado tumoral y posteriormente se detectó la presencia de anticuerpos IgE anti proteínas tumorales de acuerdo a lo descrito en la metodología. Como se ilustra en la figura 6 en 2 pacientes de 3 analizados se detectaron bandas de proteínas que fueron reconocidas por anticuerpos IgE. Con lo anterior se demuestra que el suero de los pacientes contiene anticuerpos IgE capaces de reconocer antígenos tumorales.

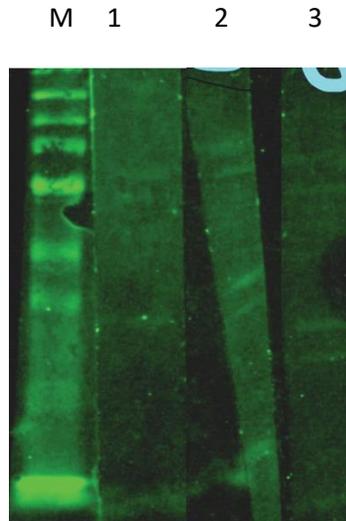


Figura 6. Análisis de western blot para anticuerpos IgE. Lisados de tejido tumoral fueron separados por electroforesis y transferidos a membranas para incubarlos con sueros autólogos y posteriormente detectar la presencia de IgE que se une a las proteínas del tejido tumoral. En el carril del lado izquierdo se observa los marcadores de peso molecular, en tanto en los carriles 1-3 se trata de lisados tumorales de tres distintos pacientes.

Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo

Para el análisis por citometría de flujo es necesario realizar suspensiones de células individuales para lo cual el tejido fue disgregado por digestión enzimática como se describe en los métodos. El tejido tumoral está constituido por diferentes células, entre ellas están las células tumorales, células del estroma y el infiltrado de leucocitos. El número de células viables que se pudo obtener de las muestras de tejido tumoral en promedio fue de 20,000-40,000 células totales. Para la citometría se requiere un mínimo de 10,000 a 20,000 células por tubo analizado, por lo cual no se obtuvo el número de células suficiente para analizar los tres tubos propuestos en la metodología. Ante tal panorama decidimos enfocarnos solo al análisis del tubo 1 para las células dendríticas, puesto que también se necesita un tubo control de tinción. Por tal motivo no se pudo analizar a las otras poblaciones celulares.

Células dendríticas.

Una de las poblaciones más importantes en la inducción y regulación de una respuesta inmune son las células dendríticas (DC). Las principales subpoblaciones de DC son las DC mieloides (mDC) o convencionales, caracterizadas por la expresión de CD11c y HLA-DR; y las DC plasmacitoides (pDC) identificadas por la expresión de CD123 y HLA-DR, ambas poblaciones son negativas para la expresión de marcadores de linajes como CD3, CD16, CD19 y CD56. Ambas poblaciones han sido identificadas en el infiltrado leucocitario en tumores de cáncer de mama. Para analizar si son capaces de interactuar con la IgE presente en el tejido tumoral medimos la expresión del receptor de alta afinidad para IgE: $Fc\epsilon R1$ por citometría de flujo en 14 pacientes incluidos prospectivamente, donde se identificó a las células por medio de marcadores de superficie como se ha descrito en la literatura. Para ello se seleccionó a las células CD45+ que fueran negativas para Lin (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 y CD56) y positivas para HLA-DR. Dentro de esta región de células se seleccionaron de acuerdo a la expresión de CD11c (mDC) y de CD123 (pDC) (figura 5A). Una vez seleccionadas las sub poblaciones de DC se analizó la expresión de $Fc\epsilon R1$ (Tabla 1). Cuando se realizó el análisis en tejido mamario sano no se encontró infiltrado leucocitario en la mayoría de las muestras por lo cual no se pudo realizar la comparación con el tejido tumoral.

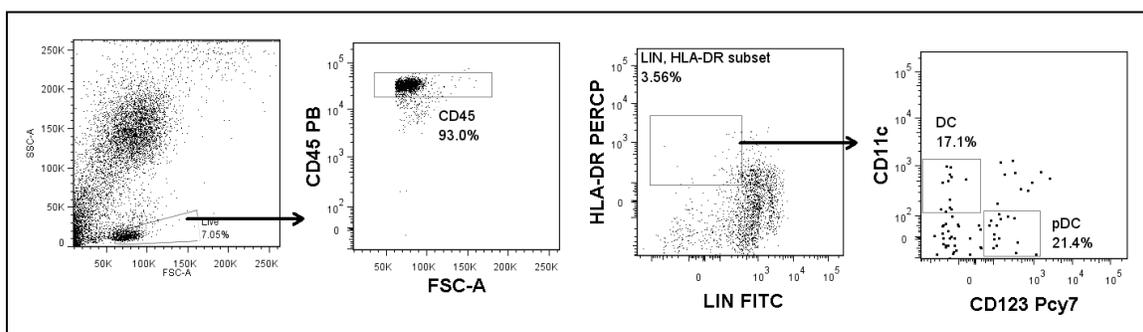


Figura 5. Células dendríticas en tejido tumoral y sangre. Suspensiones celulares obtenidas de tejido tumoral y sangre fueron analizadas por citometría de flujo. A) Estrategia de análisis para identificar a pDC (CD45+Lin-HLA-DR+CD123+) y mDC (CD45+Lin-HLA-DR+CD11c+) en las muestras clínicas.

Paciente	Sangre							Tumor						
	CD45	DC/CD45	FcεR1+	IgE+/FcεR1+	pDC/CD45	FcεR1+	IgE+/FcεR1+	CD45	DC/CD45	FcεR1+	IgE+/FcεR1+	pDC/CD45	FcεR1+	IgE+/FcεR1+
108	98.5	0.568	0	0	1.136	0	33	21	3.52	25	0	4.4	100	0
109	99.7	0.129	25	0	0.2838	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
110	99.7	0.033127	0	0	0.057776	0	25	70	3.276	50	0	2.886	0	0
111	96.8	0.108	18	0	0.162	0	0	92	2.86	12.5	0	2.145	0	0
112	99.2	0.1848	0	0	1.056	2	30	25	0	ND	ND	0	ND	ND
113	93.5	0.665	14	0	1.82	16.4	0	0	0	ND	ND	0	ND	ND
114	93.3	0.26	40	20	0.36	7	21	25	4.35	100	0	4.35	0	0
115	89.7	0.0336	0	0	0.385	0	78	74	0.4004	0	0	0.4004	0	0
116	98.8	0.16	3	0	0.21	12	0	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND
117	92.2	0.105	0	0	0.42	0	0	10	1.444	0	33	2.812	0	0
122	86.9	0.46	40	5	0.276	8	8	4	3.7	0	0	0	ND	ND
123	89.5	0.485	16	0	0.725	33	0	19	1.944	25	75	1.458	33	0
124	60	0.5859	0	0	0.9765	20	0	0	0	0	0	0	0	0
126	97.6	0.357	0	0	0.5565	5	18	85	0.39	0	0	0.35	0	0
Promedio		0.295316	11.14286	1.78571429	0.601755	7.385714	15.214286		1.8237	21.25	10.8	1.5667833	14.77778	0

Tabla 1. Expresión del receptor FcεR1 y de IgE en células dendríticas. Se analizó la expresión del receptor de alta afinidad para IgE en las células dendríticas mDC y pDC en sangre y tejido tumoral. Los datos representan porcentajes de cada población celular. CD45 está en referencia al total de células, DC/CD45 se refiere al porcentaje de DC en la fracción CD45 positiva. Los porcentajes en las poblaciones FcεR1 e IgE+/FcεR1+ están referidos sobre el valor de DC/CD45. En verde se indica a las muestras que tienen DC que expresan el receptor FcεR1 y en amarillo a las DC que unen a la IgE a través de dicho receptor.

De acuerdo a los resultados de la tabla 1, se observa que en sangre existe una fracción del 50% (7/14) de los pacientes con mDC que expresan el receptor FcεR1, y solo el 14% (2/14) tiene unidad la IgE al receptor FcεR1. En tanto las pDC fueron positivas para el receptor en un 57% de los pacientes y el 50% del total de pacientes analizados tuvieron pDC dobles positivas para IgE y su receptor. En el tejido tumoral un porcentaje similar al de la sangre fue positivo para mDC con el receptor FcεR1 y el 20% tuvo mDC dobles positivas, ligeramente mayor a lo observado en sangre. Sin embargo, las pDC se encuentran en menor frecuencia que las mDC y solo el 22% tuvo pDC que expresan el FcεR1 y no se observaron pDC positivas para la IgE.

Ensayos funcionales no realizados.

Debido a que el porcentaje de células dendríticas del tejido tumoral que fueron positivas para el receptor FcεR1 y la IgE estuvieron presentes solo del 20% de los tumores analizados hace suponer que la interacción entre las células dendríticas y la IgE no es un mecanismo frecuente en el microambiente tumoral, al menos no en etapas tempranas ya que la mayoría de los pacientes tenían estadios I y II. Con base a estos hallazgos se decidió a no proceder con los ensayos funcionales utilizando células dendríticas puesto que los indicios indican que no es un mecanismo importante en cáncer de mama y probablemente no se tengan resultados positivos.

DISCUSIÓN

El desarrollo tumoral depende en gran medida de las condiciones inmunológicas del individuo. En una gran variedad de tumores se ha observado la presencia de mecanismos de evasión inmune o inmunosupresión que permiten el desarrollo de la enfermedad. En cáncer de mama se han descrito algunos mecanismos por los cuales la respuesta inmune se vuelve ineficiente y permite el crecimiento tumoral, entre ellos destacan la presencia de linfocitos T reguladores capaces de suprimir la respuesta de linfocitos T CD8 citotóxicos y la actividad de células natural killer ²⁴. Otro de los mecanismos es la presencia de linfocitos Th2 que favorecen el crecimiento acelerado de los tumores mamarios ⁸. Los linfocitos Th2 productores de IL-4 y IL-13 favorecen el desarrollo tumoral al inducir la producción de factores de crecimiento celular en otras células como los macrófagos ¹⁰. Así mismo, las células Th2 inhiben la generación de una respuesta Th1, que es esencial para el control del crecimiento tumoral ²⁴. Uno de los mecanismos efectores de las respuestas Th2 es la producción de anticuerpos IgE, sin embargo, no hay reportes de la participación de estos anticuerpos en cáncer de mama. En el presente estudio encontramos que los niveles de anticuerpos IgE en el suero de pacientes con cáncer de mama son muy similares a los de individuos sanos, lo cual sugiere que no hay una asociación entre el desarrollo de cáncer de mama y los niveles séricos de IgE en un individuo. Este hallazgo ya ha sido descrito previamente en otros estudios ²⁵⁻²⁷. Tampoco encontramos ninguna asociación de los niveles de IgE y diversos parámetros clínicos patológicos indicando que la IgE sérica no afecta el desarrollo de la enfermedad. Resultados similares fueron encontrados por el grupo de Brennan y colaboradores ²⁸. Interesantemente, encontraron una asociación entre la IgE sérica y la tasa de recurrencia, donde la recurrencia fue significativamente mayor en los pacientes con niveles más altos de IgE. En nuestra cohorte de pacientes la tasa de recurrencia ha sido muy baja en el tiempo de seguimiento (menos de tres años) por lo cual no podemos corroborar dicha observación. Pero este hallazgo pudiera indicar una posible participación de la IgE en la susceptibilidad a la recaída. En cuanto al

tejido tumoral en un 50% de los pacientes analizados se detectó la presencia de IgE, esto podría sugerir una activa participación de la IgE durante el desarrollo tumoral debido al elevado porcentaje de positividad. El hecho de que no todos los pacientes fueran positivos podría deberse a que la IgE solo participa en algunos subtipos de tumores o en ciertas condiciones dentro del microambiente tumoral. Por lo cual se requiere de futuros estudios que analicen un mayor número de pacientes para poder evaluar si existe alguna asociación con el subtipo de tumor o alguna característica clínico-patológica. La importancia de nuestro estudio es que por primera vez se describe la presencia de la IgE en el microambiente tumoral y la capacidad de los anticuerpos IgE séricos para reconocer antígenos tumorales, abriendo con ello una nueva línea de investigación para analizar el papel de esta inmunoglobulina en la respuesta inmunitaria inducida por el proceso tumoral.

En referencia a la expresión del receptor FcεR1 en células dendríticas se observó que en sangre periférica la expresión del receptor fue similar en las dos poblaciones de DC, pero las pDC son las que tuvieron un mayor porcentaje de unión con la IgE. Contrariamente en el tejido tumoral las pDC se encuentran en bajas proporciones y prácticamente no expresan el receptor FcεR1 por lo cual fueron negativas para la IgE. En tanto las mDC tumorales expresan el receptor en 2 de los 10 pacientes analizados (20%), un porcentaje ligeramente mayor al observado en sangre periférica. El bajo porcentaje de pacientes con DC que expresan el receptor de alta afinidad para la IgE sugiere que estas células quizá no sean las principales en interactuar con la IgE en el microambiente tumoral. Por lo cual se vuelve importante el análisis futuro de otras poblaciones celulares capaces de expresar el FcεR1 y que además pudieran estar presentes en el microambiente tumoral. Una población celular candidata a ello son los macrófagos debido a los reportes que describen una importante infiltración de estas células en el tejido tumoral y su capacidad para expresar el receptor FcεR1 ^{29, 30}. De hecho, un estudio que acaba de ser publicado describe el efecto de la IgE para polarizar el fenotipo de macrófagos hacia un perfil inflamatorio que podría favorecer la respuesta inmune anti-tumoral ³¹. En nuestro

estudio no pudimos analizar otras poblaciones celulares que estaban contempladas por el limitado número de células que se obtienen de las muestras. Ante la dificultad de conseguir más tejido debido al tamaño de los tumores en etapas tempranas se sugiere realizar varios estudios futuros enfocados a poblaciones celulares distintas. Por lo tanto, nuestro estudio sienta las bases para futuras investigaciones que permitan corroborar los hallazgos encontrados y su relación con la clínica y patogenia de la enfermedad.

CONCLUSIONES

Los niveles séricos de IgE no se encuentran asociados con la presencia o el desarrollo de cáncer de mama.

Se detectó la presencia de anticuerpos IgE en el microambiente tumoral en un porcentaje importante de pacientes con cáncer de mama, lo que sugiere una posible implicación en la respuesta inmunitaria y/o en la patogenia de la enfermedad.

Los anticuerpos IgE séricos de pacientes con cáncer de mama son capaces de reconocer antígenos tumorales.

En estadios tempranos, puesto que la mayoría de los pacientes se encontraban en estadios I y II, existe un predominio de mDC en el tejido tumoral, mientras que en sangre periférica son las pDC las células dendríticas dominantes.

La subpoblación de DC en el tejido tumoral que expresan el receptor de alta afinidad por la IgE son las mDCs.

Los datos obtenidos en la presente investigación permiten asentar las bases y justificar la realización de futuros estudios para confirmar la implicación de la IgE en la respuesta inmune y la patogenia del cáncer de mama.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Soto-Perez-de-Celis E, Chavarri-Guerra Y. National and regional breast cancer incidence and mortality trends in Mexico 2001-2011: Analysis of a population-based database. *Cancer epidemiology*. 2016;**41**:24-33.
2. Hernanda PY, Pedroza-Gonzalez A, Sprengers D, Peppelenbosch MP, Pan Q. Multipotent mesenchymal stromal cells in liver cancer: implications for tumor biology and therapy. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;**1846**(2):439-445.
3. Hernanda PY, Pedroza-Gonzalez A, van der Laan LJ, Broker ME, Hoogduijn MJ, Ijzermans JN, et al. Tumor promotion through the mesenchymal stem cell compartment in human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2013;**34**(10):2330-2340.
4. Pedroza-Gonzalez A, Zhou G, Vargas-Mendez E, Boor PP, Mancham S, Verhoef C, et al. Tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression by Tr1 cells in human liver tumors. *Oncoimmunology*. 2015;**4**(6):e1008355.
5. Ueno H, Schmitt N, Klechevsky E, Pedroza-Gonzalez A, Matsui T, Zurawski G, et al. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunological reviews*. 2010;**234**(1):199-212.
6. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016;**13**(4):228-241.
7. Dushyanthen S, Beavis PA, Savas P, Teo ZL, Zhou C, Mansour M, et al. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC medicine*. 2015;**13**:202.
8. Aspod C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, et al. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *The Journal of experimental medicine*. 2007;**204**(5):1037-1047.

9. Pedroza-Gonzalez A, Kwekkeboom J, Sprengers D. T-cell suppression mediated by regulatory T cells infiltrating hepatic tumors can be overcome by GITRL treatment. *Oncoimmunology*. 2013;**2**(1):e22450.
10. Pedroza-Gonzalez A, Xu K, Wu TC, Aspord C, Tindle S, Marches F, et al. Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2011;**208**(3):479-490.
11. Sisirak V, Faget J, Gobert M, Goutagny N, Vey N, Treilleux I, et al. Impaired IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer research*. 2012;**72**(20):5188-5197.
12. Ghirelli C, Reyat F, Jeanmougin M, Zollinger R, Sirven P, Michea P, et al. Breast Cancer Cell-Derived GM-CSF Licenses Regulatory Th2 Induction by Plasmacytoid Predendritic Cells in Aggressive Disease Subtypes. *Cancer research*. 2015;**75**(14):2775-2787.
13. Criscitiello C, Curigliano G. Immunotherapeutics for breast cancer. *Current opinion in oncology*. 2013;**25**(6):602-608.
14. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell death and differentiation*. 2008;**15**(1):3-12.
15. Ruffell B, DeNardo DG, Affara NI, Coussens LM. Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;**21**(1):3-10.
16. Faghieh Z, Erfani N, Haghshenas MR, Safaei A, Talei AR, Ghaderi A. Immune profiles of CD4+ lymphocyte subsets in breast cancer tumor draining lymph nodes. *Immunology letters*. 2014;**158**(1-2):57-65.
17. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;**140**(6):883-899.
18. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer cell*. 2009;**16**(2):91-102.

19. Faghieh Z, Rezaeifard S, Safaei A, Ghaderi A, Erfani N. IL-17 and IL-4 producing CD8+ T cells in tumor draining lymph nodes of breast cancer patients: positive association with tumor progression. *Iranian journal of immunology : IJI*. 2013;**10**(4):193-204.
20. Srabovici N, Mujagic Z, Mujanovic-Mustedanagic J, Muminovic Z, Softic A, Begic L. Interleukin 13 expression in the primary breast cancer tumour tissue. *Biochimica medica*. 2011;**21**(2):131-138.
21. Daniels TR, Leuchter RK, Quintero R, Helguera G, Rodriguez JA, Martinez-Maza O, et al. Targeting HER2/neu with a fully human IgE to harness the allergic reaction against cancer cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2012;**61**(7):991-1003.
22. Platzer B, Elpek KG, Cremasco V, Baker K, Stout MM, Schultz C, et al. IgE/FcepsilonRI-Mediated Antigen Cross-Presentation by Dendritic Cells Enhances Anti-Tumor Immune Responses. *Cell reports*. 2015e-pub ahead of print Mar 3;10.1016/j.celrep.2015.02.015.
23. Sallmann E, Reininger B, Brandt S, Duschek N, Hoflehner E, Garner-Spitzer E, et al. High-affinity IgE receptors on dendritic cells exacerbate Th2-dependent inflammation. *Journal of immunology*. 2011;**187**(1):164-171.
24. Garcia-Romo GS, Garcia-Castillo KG, Diaz-Rodriguez A, Reyes-Hernandez D, Pedroza-Gonzalez A. [Main immunoregulatory mechanisms that favor breast cancer development]. *Gac Med Mex*. 2017;**153**(2):229-237.
25. Helby J, Bojesen SE, Nielsen SF, Nordestgaard BG. IgE and risk of cancer in 37 747 individuals from the general population. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015;**26**(8):1784-1790.
26. Alsabti EA. Serum immunoglobulins in breast cancer. *Journal of surgical oncology*. 1979;**11**(2):129-133.
27. Pettingale KW, Merrett TG, Tee DE. Prognostic value of serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM and IgE) in breast cancer: a preliminary study. *British journal of cancer*. 1977;**36**(5):550-557.

28. Ownby DR, Ownby HE, Roi LD, Howard LM, Heppner GH, Brennan MJ. Prognostic significance of serum IgE levels in primary breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 1982;**2**(3):221-226.
29. Gok Yavuz B, Gunaydin G, Gedik ME, Kosemehmetoglu K, Karakoc D, Ozgur F, et al. Cancer associated fibroblasts sculpt tumour microenvironment by recruiting monocytes and inducing immunosuppressive PD-1(+) TAMs. *Scientific reports*. 2019;**9**(1):3172.
30. Yang M, Li Z, Ren M, Li S, Zhang L, Zhang X, et al. Stromal Infiltration of Tumor-Associated Macrophages Conferring Poor Prognosis of Patients with Basal-Like Breast Carcinoma. *J Cancer*. 2018;**9**(13):2308-2316.
31. Pellizzari G, Hoskin C, Crescioli S, Mele S, Gotovina J, Chiaruttini G, et al. IgE re-programs alternatively-activated human macrophages towards pro-inflammatory anti-tumoural states. *EBioMedicine*. 2019;**43**:67-81.

ACTIVIDAD	FECHAS PROGRAMADAS	FECHAS REALIZADAS
Elaboración protocolo:	Enero 2018- abril 2019	Enero 2018-abril 2019
Registro protocolo:	Mayo 2019	Mayo 2019
Selección de los pacientes:	Junio-Julio 2019	Junio-Julio 2019
Colección Información:	Julio – noviembre 2019	Julio 2019
Análisis de datos:	Diciembre 2019	Julio 2019
Interpretación resultados:	Enero 2020	Julio 2019
Formulación reporte:	Febrero 2020	Julio 2019

ANEXOS



**Carta de consentimiento informado para
participación en protocolo de investigación**



Título de la investigación: Análisis de la participación de la inmunoglobulina e en la modulación de la respuesta inmunitaria tipo th2 en cáncer de mama para la identificación de posibles blancos terapéuticos”

Número de registro: R-2019-785-043.

Por medio de la presente le estamos invitando a un protocolo de investigación que se está realizando en el Hospital de Gineco-obstetricia del Centro Médico la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en colaboración con la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para analizar la funcionalidad de las células del sistema de defensa del organismo localizadas en tumores de cáncer de mama con el objetivo de desarrollar nuevos tratamientos.

Con el fin de realizar el estudio antes mencionado, le solicitamos nos permita obtener dos tubos adicionales de sangre (20 mL) que equivalen a cuatro cucharadas soperas. Así mismo le solicitamos permiso para utilizar una pequeña porción de la biopsia o tejido mamario que será obtenida como parte de su diagnóstico y/o tratamiento para utilizarla en la investigación antes mencionada. Parte del tejido será congelado y almacenado para futuros estudios si usted así lo acepta. Las muestras serán almacenadas en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM por un periodo de al menos 10 años bajo el resguardo del Dr. Alexander Pedroza González.

Posibles riesgos y molestias:

Si usted decide participar en la investigación se le tomará una muestra de sangre adicional que no tiene riesgos para su salud, solo podría causarle un poco de dolor y un moretón en la zona de donde se tome; de igual forma la toma de tejido extra se tomará del tejido extraído durante el procedimiento al cual usted está programada, lo cual significa que no tiene riesgos adicionales.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:

No hay beneficios directos para usted relacionados con este estudio. Esta investigación nos ayuda a aprender más sobre el sistema de defensa en cáncer de mama. En última instancia, esto podría conducir al desarrollo de nuevos tratamientos para esta enfermedad en el futuro.

Participación o retiro:

Su participación en este estudio es voluntaria y puede retirarse del mismo cuando usted lo desee. Si usted decide no participar, esta decisión no afectará su tratamiento. Usted no está obligada a participar en este estudio.

Privacidad y confidencialidad:

Sus datos de identificación personal solamente serán conocidos por personal autorizado. Estos son los miembros del equipo de investigación, el personal médico y los miembros del Comité de Ética Médica. Los datos personales recogidos durante este estudio serán reemplazados por un código, de tal forma que sus datos confidenciales no serán utilizados en informes o publicaciones sobre esta investigación.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Responsable:

Dra. Patricia Alanis López

Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3 del Centro Médico Nacional la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social

Tel. 57245900 ext 23 726 Correo electrónico: drapatriciaalanis@yahoo.com.mx

Colaboradores:

Dr. Elio Alejandro González Bermúdez

Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3 del Centro Médico Nacional la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social

Tel. 57245900 ext 23 726 Correo electrónico: elio_alejandro@outlook.com

Dr. Alexander Pedroza González

Laboratorio de Investigación en Inmunología Unidad de Morfología y Función. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

Tel. 56231220 Correo electrónico: alexander_pg@hotmail.com

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com

- Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio
- Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.

Fecha:

Nombre y firma del sujeto

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, relación y firma

Nombre, relación y firma

Hoja de Captura de información.

Fecha: _____

Nombre: _____

Edad: _____

Número de identificación (Asignado por el investigador): _____

Lugar de nacimiento: _____

Diagnóstico: _____

Antecedentes de alergias o enfermedades parasitarias:

Grado del tumor: _____

Receptores	Positivo/negativo	% Células positivas	Intensidad
Estrógenos			
Progesterona			
Her-2 neu			

Estadio: _____

TNM: _____

Tamaño del tumor(es) primario(s): _____

Sitios de metástasis: _____

Características de metástasis (Número de lesiones, tamaño, localización):

Tratamiento: _____

Fecha de cirugía: _____

Tipo de cirugía: _____

Muestras obtenidas y fecha: _____

Sangre (volumen): _____

Biopsia: _____

Tejido postoperatorio

Tejido normal (Características y tamaño):

Tejido tumoral (Características y tamaño):

Número de células vivas obtenidas de _____ sangre, tejido mamario normal _____ y tejido tumoral _____.

Frecuencia (%) de leucocitos (CD45+):

	Sangre	Tejido normal	Tumor
Linfocitos B			
Células DCs			
Células pDCs			
Monocitos/Macrófagos			
