



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**Análisis de la expresión de la
Inmunoglobulina E y su receptor FcεRI en
células presentadoras de antígeno en
tumores de pacientes con cáncer de mama**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Licenciada en Biología**

PRESENTA

Janik Adriana Tomás Morales

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alexander Pedroza González



2020

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Edo. de México.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por financiar el proyecto no. IA208717 “Análisis de la participación de la inmunoglobulina E en la respuesta inmunitaria en cáncer de seno”

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Sinceramente, agradezco a quienes formaron parte de mi camino en esta etapa de mi vida, pues sin ellos esta tesis no habría llegado a su fin.

Primordialmente, le agradezco de corazón a mis padres, Sergio y Adriana, por brindarme su apoyo incondicional y nunca perder la esperanza, deseándome siempre lo mejor.

A mis hermanas, Sofía y Alexia, que siempre me dieron fuerzas para seguir adelante, ayudándome en los momentos más difíciles.

A Paul Aguilar, por darme ánimos cuando lo creía todo perdido, por nunca dejarme rendir y siempre estar a mi lado. Recordaré eternamente la fe que tuviste en mí y el apoyo que nunca se desvaneció.

A mis abuelos paternos, Juan y Yolanda; a mis abuelos maternos, Nahum y Raquel. A mi familia, que, a pesar de estar lejos de mí, festejaban cada uno de mis logros.

Al Dr. Alexander, por brindarme la oportunidad de integrarme al proyecto y mantenerse al pendiente de mi desarrollo académico. Gracias por la paciencia y la sabiduría transmitida.

A mi comité sinodal, Dr. Jiménez, Dra. Gina y M. en C. Santiago, por sus comentarios y sugerencias que hicieron de este escrito un mejor trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio 7 “Inmunología”, particularmente a Aldo Hernández, que además de ser parte de mi comité sinodal, se convirtió en un gran amigo.

A mis compañeros de la carrera de Biología, Omar, Rubí, Elizabeth, Fernanda y Noemí, por todas las aventuras, las risas y las situaciones de pánico de las que fuimos capaces de sobresalir.

ÍNDICE

Agradecimientos	2
Agradecimientos Personales	3
Resumen	6
Introducción	7
El cáncer de mama, una problemática en México y en el mundo.	7
Clasificación del cáncer de mama.	9
La lucha contra el cáncer de mama: tratamientos.	10
La inmunoterapia contra el cáncer.	11
Mecanismos de la respuesta inmunitaria en la defensa contra el cáncer.	12
Mecanismos de evasión inmunológica	14
Linfocitos T como inmuno-reguladores en el cáncer de mama.....	16
La inmunoglobulina E y su receptor de alta afinidad.	17
Las células presentadoras de antígeno.	18
La inmunoglobulina E como un blanco en la inmunoterapia.	20
Justificación	22
Hipótesis	23
Objetivos	24
Objetivo General.....	24
Objetivos Particulares.	24
Metodología	25
1. Muestras clínicas.	25
2. Obtención y procesamiento de las muestras clínicas.	25
3. Determinación de la frecuencia e inmunofenotipo de Linfocitos B, Monocitos/Macrófagos y Células Dendríticas en sangre y tejido.....	26
4. Análisis Estadístico.	27
Resultados y Análisis	28

Características clínico-patológicas.	28
Infiltrado celular.	30
Expresión de la IgE y su receptor de alta afinidad.	37
Correlación con las características clínico-patológicas de los pacientes.	39
Discusión	47
Conclusiones	54
Abreviaturas	55
Anexo	57
1. Características de los anticuerpos	57
2. Elaboración de Reactivos	57
Bibliografía	59

RESUMEN

El cáncer de mama es una de las neoplasias más representativas, pues afecta a gran parte de la población mundial. En México, el cáncer de mama ha presentado una problemática, pues desde el 2006 se convirtió en la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas adultas. Son múltiples los factores que conllevan al desarrollo del cáncer, por ello se le refiere como enfermedad compleja.

En la búsqueda de nuevos tratamientos, la respuesta inmunitaria dentro del microambiente tumoral es un componente prometedor, pues se ha visto un interés creciente por parte de profesionistas en el área de salud, entre ellos médicos e investigadores. Se tiene en cuenta que la capacidad de inducir una respuesta antitumoral eficaz involucra conocer las cualidades de los diversos componentes del sistema inmunitario.

Los linfocitos Th2 se han asociado con un desarrollo tumoral desfavorable, respuesta que tiene como reflejo la producción de la inmunoglobulina E; no obstante, se desconoce su papel en la enfermedad. Antecedentes en modelos animales revelan que las células dendríticas son capaces de reconocer dicha inmunoglobulina con el FcεRI y con ello fortalecer la respuesta Th2.

En el presente trabajo se evaluó la interacción de la IgE y del FcεRI en células presentadoras de antígeno (APC) en tumores de pacientes con cáncer de mama. Se colectaron células mononucleares mediante un fraccionamiento por densidad a partir de muestras de sangre y tejido de pacientes, para posteriormente analizar la expresión de dichas moléculas por citometría de flujo. Los resultados fueron comparados con muestras controles provenientes de individuos sanos, y finalmente, las mediciones obtenidas por esta técnica también fueron correlacionadas con algunas características clínico-patológicas de los pacientes.

Los resultados mostraron la presencia del receptor de alta afinidad en APC dentro del microambiente tumoral, siendo capaces de reconocer a la IgE. Se encontraron distintos valores al comparar las muestras de pacientes con los controles, siendo los primeros los más altos; por otro lado, no se obtuvo ningún tipo de relación entre los datos clínico-patológicos y la expresión de las moléculas. Se recomienda seguir realizando estudios que impliquen a la IgE y su receptor de alta afinidad para determinar su participación en la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama, una problemática en México y en el mundo.

El cáncer es un grupo de enfermedades que afecta a gran parte de la población mundial; se caracteriza por un crecimiento descontrolado de células anormales, las cuales tienen la capacidad de invadir diferentes tejidos. Una de las neoplasias más representativas es el cáncer de mama, en donde se ha estimado que es la causa del 15% de muertes por cáncer entre las mujeres a nivel mundial (World Health Organization, 2018).

En México, el cáncer de mama ha presentado una problemática ante un incremento en la incidencia y en la mortalidad. En el 2006, se convirtió en la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas adultas, superando al cáncer cervicouterino. Se ha estimado que en promedio 24 mil mujeres son diagnosticadas con cáncer de mama al año y 6 mil pacientes fallecen por esta enfermedad (Knaul *et al.*, 2009; Cárdenas *et al.*, 2017).

Son múltiples los factores de riesgo, algunos están relacionados con procesos biológicos, como la edad, se ha determinado que mujeres entre 35 a 80 años son quienes presentan la mayoría de los casos. Los antecedentes familiares también son importantes, ya que pueden dar a conocer problemas hereditarios, donde se identifican mutaciones en genes que aumentan el riesgo de contraer cáncer, tal como ser portador de los genes *BRCA1* o *BRCA2* (Martín *et al.*, 2015; Cárdenas *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha mencionado que padecer algunas enfermedades como adenosis esclerosante, papilomas intraductales, hiperplasia ductal atípica, entre otros aumentan las probabilidades de desarrollar cáncer de mama; no obstante, la exposición prolongada de medicamentos hormonales también es riesgoso, aunque la manifestación de la neoplasia estará relacionada al tipo de hormonas usadas y a la duración del tratamiento (Martín *et al.*, 2015; Cárdenas *et al.*, 2017).

Por último, el estilo de vida puede conllevar al desarrollo del cáncer. Se tiene en cuenta que una mala alimentación, poca actividad física, tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol son factores relevantes. Un desbalance tendrá como consecuencia el surgimiento de otras enfermedades tal y como lo es la obesidad, que ha sido considerada como una de las más importantes, ya que aumenta las probabilidades de la aparición de esta neoplasia (Cárdenas *et al.*, 2017).

Se ha estimado que el cuerpo humano está conformado aproximadamente por 3.72×10^{13} células (Bianconi *et al.*, 2013). En ellas se pueden dar distintos tipos de mutaciones, las cuales se identifican como cambios en la secuencia del DNA; éstas surgen por procesos de eliminación, adición, amplificación y recombinación (Balin & Cascalho, 2009). Se ha calculado que la tasa de mutación en humanos está alrededor de 1.8×10^{-8} pb por ciclo celular (Baer *et al.*, 2007), sin embargo, este número puede aumentar por factores externos.

Las células anormales que promueven el desarrollo del cáncer surgen por un proceso de selección clonal, en el que las mutaciones les confieren a las células una ventaja de supervivencia y proliferación. Al ser poco estables, las células sufren de más cambios en el DNA que permitirán a sus descendientes crecer de manera formidable y formar pequeños tumores (Lodish *et al.*, 2000).

El cáncer de mama puede originarse de cualquier estirpe celular que compone al tejido mamario, sin embargo, las células epiteliales ubicadas en los conductos mamarios son usualmente las más comunes en volverse anormales y comenzar la formación de tumores (Romero-Urtilla *et al.*, 2014).

Se ha postulado que en un inicio los carcinomas son no invasivos, ya que no tienen la capacidad de extenderse a distancia, siendo denominados carcinomas intraductales; sin embargo, pueden transformarse en cáncer invasivo si no son tratados. Éste otro tipo de cáncer puede extenderse localmente dentro de la mama, infiltrarse a los músculos pectorales y propagarse a órganos distantes al invadir vasos sanguíneos locales, dando lugar a metástasis a distancia (Martín *et al.*, 2015).

El cáncer de mama no da síntomas o signos hasta que la enfermedad ha adquirido un notable desarrollo, por ello se han elaborado campañas informativas que sugieren autoexploraciones y chequeos paulatinos con el médico, ya que las probabilidades de curación cuando el cáncer se descubre en etapas tempranas son muy altas (Martín *et al.*, 2015; Cárdenas *et al.*, 2017).

Cuando existe la sospecha de un cáncer de mama, se deberá realizar un diagnóstico de confirmación, el cual incluye pruebas de imagen, tal y como lo son la mamografía, la ecografía y la resonancia magnética nuclear. De igual manera, se llevarán a cabo pruebas que requieren de muestras biológicas, por lo que se podrá efectuar la técnica de punción-aspiración con aguja fina (PAAF) y la biopsia con aguja gruesa (BAG) que tienen como objetivo obtener células del tejido mamario afectado; inclusive se podrán hacer biopsias quirúrgicas que tratarán de extirpar parte del

tejido sospechoso (Asociación Española Contra el Cáncer, 2014; Martín *et al.*, 2015). Con ello, la neoplasia será confirmada y posteriormente clasificada según sus características.

Clasificación del cáncer de mama.

Se reconoce que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, ya que el cambio de una célula normal a una cancerígena requiere de múltiples alteraciones entre ellas genéticas, como la inactivación de anti-oncogenes y la metilación del ADN; así como la pérdida de procesos de regulación normales, donde se incluye la reprogramación del metabolismo energético y la resistencia a la muerte celular (Chen & Mellman, 2013)

Por ello, es que se han considerado distintas características histológicas, clínicas e incluso marcadores moleculares para poder designar una clasificación (Asociación Española Contra el Cáncer, 2014).

Se han determinado alrededor de 17 tipos de cáncer de mama basados en aspectos histológicos, sin embargo, el carcinoma ductal y el lobular son los más comunes, representando el 75% y 15% de los casos respectivamente (Li *et al.*, 2005; Weigelt & Resi-Filho, 2009).

El grado es otra de las clasificaciones más empleadas, pues esta indica el aspecto de las células cancerosas cuando son analizadas en el microscopio. El grado I señala que el aspecto entre las células cancerosas y las células normales difiere sólo un poco; de forma contraria, el grado III indica un aspecto totalmente diferente. Estas categorías han sido relevantes para el pronóstico de la enfermedad (El mundo: Salud, 2006).

Así mismo, el paciente es catalogado en el sistema de estadificación TNM, en el cual se evalúan datos clínicos, radiológicos y de laboratorio; las siglas corresponden al tamaño del tumor primario (T), a los ganglios linfáticos regionales que han sido afectados (N) y la presencia de metástasis a distancia (M); su combinación definirá cuatro estadios que corresponden a la gravedad y se postulan en orden ascendente (I, II, III y IV) (Consejo de Salubridad General, s/f; Bombardieri *et al.*, 2010).

El estadio I es establecido cuando el tumor primario tiene como diámetro un máximo 2 cm y no se encuentran afectados los ganglios linfáticos ni otros tejidos (T1N0M0). Por su parte, el estadio II

indica que el diámetro máximo del tamaño del tumor es de 5 cm (T0,1,2,3N0,1M0); en cuanto al estadio III, tiene como particularidad que el crecimiento es directo a la pared torácica o la piel (T0,1,2,3,4N0,1,2,3M0). Éstos últimos dos, reconocen que los ganglios linfáticos pueden estar afectados, pero no habrá evidencia de metástasis a distancia. Por último, el estadio IV acepta cualquier clasificación del tamaño del tumor primario y de los ganglios linfáticos afectados, pero tiene como requerimiento la presencia de metástasis a distancia (TxNxM1) (Consejo de Salubridad General, s/f; Hunt *et al.*, 2008).

Para ofrecer el tratamiento adecuado, también se toma en cuenta otros factores que son evaluados por inmunohistoquímica. En ellos se incluyen los receptores hormonales de estrógenos (RE) y los receptores hormonales de progesterona (RP), así como la sobreexpresión de la proteína HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2) (Cárdenas *et al.*, 2017). En base a estos marcadores, se han determinado cuatro fenotipos moleculares del cáncer de mama, que en base a las estadísticas de la población mexicana, la mayor frecuencia corresponde a receptores hormonales positivos (Luminal A y Luminal B) con un 60%, seguido de los triples negativos con 23.1% y por último, la sobreexpresión de HER-2 con un 20.4% (Cárdenas *et al.*, 2017).

La lucha contra el cáncer de mama: tratamientos.

Para tratar las neoplasias, se han desarrollado distintos tratamientos que serán asignados al paciente tras haber analizado y catalogado la muestra tumoral (Consejo de Salubridad General, s/f). Uno de ellos es la cirugía, que tiene como objetivo remover los tumores quirúrgicamente; en la actualidad, suele combinarse con otros tipos de tratamientos (Dolinak & Matshes, 2003).

En el siglo XX la radioterapia fue introducida, ésta consta de someter al paciente a altas dosis de radiación para destruir las células cancerosas y con ello reducir el tamaño del tumor; su éxito de supervivencia sugirió que podría ser eficaz para estadios tempranos del cáncer de mama (Verdú *et al.*, 2002; Dolinak & Matshes, 2003).

Por otro lado, la quimioterapia ha sido la más utilizada. El tratamiento se basa en administrar diversos fármacos que tienen como objetivo destruir a las células cancerosas. Suele utilizarse en conjunto con endocrinoterapias; aunque en tumores sin expresión de receptores hormonales, la quimioterapia por sí sola es el tratamiento apropiado (Bombardieri *et al.*, 2010).

Sin embargo, hay evidencia de que los efectos secundarios provocados por la toxicidad se generan principalmente por la radioterapia y la quimioterapia. Recientemente, se ha observado que el orden en que se administran puede influir en el resultado, aunque se ha confirmado que la combinación de ambos puede causar estragos al tejido sano (Verdú *et al.*, 2002; Dolinak & Matshes, 2003).

La terapia hormonal o endocrinoterapia se ha considerado como una de las herramientas más efectivas contra los cánceres que expresan receptores estrogénicos, convirtiéndolos en diana del desarrollo de nuevas técnicas. La resistencia ante este tipo de tratamiento debido a cambios en la expresión de los receptores, alteraciones en las proteínas co-reguladoras e incluso afecciones en las vías de señalización (Osborne *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2015), ha hecho que se busquen alternativas a este tipo de tratamiento.

Retomando lo mencionado anteriormente, se confirma la complejidad del cáncer de mama y aunque se han desarrollado tratamientos que permitan prolongar la vida, estos suelen ser violentos y no aseguran una eficacia absoluta, ya que en muchos casos la enfermedad vuelve a aparecer de una manera más rápida y agresiva (García-Romo *et al.*, 2017).

Se reconoce que, ante un mejor conocimiento de la biología, es posible desarrollar nuevas técnicas que dirijan a mejores resultados. Actualmente, es sabido que el desarrollo del tumor depende de las interacciones de distintos tipos celulares presentes en el microambiente tumoral, el cual está conformado por las propias células cancerígenas, células estromales y células de la respuesta inmunitaria, representando un componente importante en la patogenia (Valdivia-Silvia & García-Zepeda, 2008; Knaul *et al.*, 2009; García-Romo *et al.*, 2017).

La inmunoterapia contra el cáncer.

Gracias a los avances en la inmunología, esta rama ha llamado la atención de un número creciente de profesionistas, entre ellos médicos e investigadores, pues ha demostrado tener un futuro prometedor para desarrollar nuevos tratamientos contra distintas neoplasias, entre ellas el cáncer de mama. La teoría para su aplicación se basa en la regulación del sistema inmune y su relación con los tumores, teniendo como objetivo que el individuo desarrolle una respuesta inmunológica eficaz contra las células malignas (Lage, 2011; García-Romo *et al.*, 2017).

Se han utilizado diversos componentes del sistema inmune para desarrollar técnicas de inmunoterapia. Uno de ellos han sido pequeñas proteínas involucradas en su regulación conocidas como citocinas. Éstas son producidas por más de un tipo celular; teniendo diversas funciones que afectan tanto a nivel autocrino como paracrino. Presentan diversos mecanismos de acción, por ello han sido aprovechados para ejecutar efectos antitumorales, ya sea actuando directamente sobre el tejido tumoral, aumentando la expresión de moléculas como el MHC o reclutando células efectoras que luchan en contra del mismo (Barrera-Rodríguez *et al.*, 1995).

Otra de las propiedades que han sido aprovechadas es la capacidad de presentación de antígenos por parte de las células dendríticas (DCs), que al ser las APC más eficientes del sistema inmune, pueden ser aisladas y manipuladas *in vitro* para desarrollar vacunas que aumentan la capacidad de protección y las respuestas inmunes contra tumores malignos. Sin embargo, hasta el 2002, la agencia regulatoria de los Estados Unidos de América: Food and Drug Administration (FDA) no había aprobado ningún fármaco oncológico, no obstante, ya existen ensayos clínicos (Barrera-Rodríguez *et al.*, 1995; Arango & González, 2002; Mitchell & Nair, 2000).

También se han evaluado anticuerpos monoclonales, cuyo mecanismo de acción se basa en la opsonización y fagocitosis, al igual que la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, lo que permite la eliminación de antígenos tumorales; se piensa que, de modo alterno podrían activar la vía intrínseca de la apoptosis (Abbas *et al.*, 2010). Un ejemplo son los anticuerpos anti-HER2 que actualmente se utilizan en el tratamiento de un subtipo de cáncer de mama con resultados muy eficaces. Actualmente se han desarrollado anticuerpos bloqueadores de los denominados puntos inmunitarios como CTLA-4 y PD-L1. Dichas moléculas son de regulación negativa y se expresan en las células que infiltran el microambiente tumoral provocando una inmunosupresión en el sitio de lesión. En el caso de PD-1, esta molécula se expresa en las células T, y su ligando PD-L, en células tumorales, y por ende, están siendo investigada arduamente. Actualmente, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que bloquean su interacción y permiten la destrucción de la célula anormal (Topalian *et al.*, 2012).

Mecanismos de la respuesta inmunitaria en la defensa contra el cáncer.

A pesar de todas las metodologías antes mencionadas, es importante recordar que en condiciones normales y favorables la naturaleza del sistema inmune es capaz de reconocer las células

anormales, pues tiene como objetivo defender al organismo de agentes que pudieran causar daño (Kindt *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que, aunque las células tengan tantos mecanismos de reparación (Lewin, 2008), algunas son capaces de convertirse en células malignas. Estas surgen con gran frecuencia, sin embargo, la mayoría no presentan gran riesgo para la salud del paciente (Lodish *et al.*, 2000), pues son reconocidas por el sistema inmune que es capaz de destruirlas.

Esto es posible debido a que se es capaz de identificar a las células neoplásicas mediante el reconocimiento de antígenos específicos de tumores (TSA), de los cuales sobresalen las proteínas mutadas; también se identifican antígenos asociados a tumores (TAA), que son originados por la sobreexpresión de proteínas no propias del tejido, siendo normalmente desconocidas para el sistema inmune (Díaz *et al.*, 2012; García-Romo *et al.*, 2017).

En el caso del microambiente tumoral, la infiltración de diversos tipos de leucocitos se relaciona con un aumento en la densidad vascular, sin embargo, se tiene en cuenta que se estarán efectuando procesos de defensa y reparación tisular (Valdivia-Silva & García-Zepeda, 2008).

La infiltración de linfocitos T CD8+ y Linfocitos Natural Killer (NK) se considera favorable, ya que se han reconocido como células anti-tumorales teniendo como efecto frenar el crecimiento del tumor; en cambio, una subpoblación de macrófagos asociados al tumor (TAM), que en la mayoría de los casos constituyen gran parte del componente del infiltrado leucocitario, se consideran catastróficos debido a que han demostrado favorecer el desarrollo del tumor (Valdivia-Silva & García-Zepeda, 2008).

Chen y Mellman en el 2013 postularon “The Cancer-Immunity Cycle”, el cual consiste en una serie de pasos que indican la forma en que se podrá neutralizar y eliminar la neoplasia por parte del sistema inmune. Se menciona que las células cancerígenas liberarán antígenos que después serán capturados y procesados por las células presentadoras de antígeno (APC). Posteriormente, se activarán las células T capaces de reconocer a los antígenos tumorales. Las células T efectoras activadas serán reclutadas al microambiente tumoral, ahí reconocerán a las células cancerosas, que ante la interacción entre su receptor (TCR), el antígeno y el complejo principal de histocompatibilidad I (MHC I) destruirán las células del tejido tumoral. Las células muertas

liberarán antígenos que serán utilizados para comenzar nuevamente el ciclo y aumentar la respuesta inmune anti-tumoral (Chen & Mellmen, 2013).

A pesar de todos los mecanismos de defensa antes mencionados, la respuesta inmunitaria anti-tumoral puede ser alterada y perder efectividad, ya que desafortunadamente, este proceso se ve evadido ante una inmunodeficiencia o alguna modulación sobre los mecanismos inmunológicos. Se ha sugerido que la presentación de antígenos y el reclutamiento de leucocitos al infiltrado tumoral no se lleva de manera adecuada; también, se tiene evidencia de que los factores secretados del microambiente tumoral pueden modular negativamente las respuestas inmunes (Díaz *et al.*, 2012; Motz & Coukos, 2013).

Mecanismos de evasión inmunológica

En el 2000, Hanahan y Weinberg postularon seis características que estaban presentes en todas las células cancerígenas, de las cuales provenía su éxito de supervivencia. Se destacó su autosuficiencia en señales de crecimiento, así como la evasión de factores supresores. También su capacidad de invadir tejidos, el potencial replicativo ilimitado, la inducción de angiogénesis y la evasión de la apoptosis o muerte celular programada. No obstante, una década después, se añadieron nuevas propiedades, en las cuales se resalta la evasión de la respuesta inmune (Hanahan & Weinberg, 2011; Ahmed & Aanei, 2017).

Se han descrito diversos mecanismos generados por los tumores que tiene como consecuencia el desarrollo del cáncer. Algunos de estos radican en la secreción de factores inmunosupresores que tienen por efecto la disminución de la expresión de moléculas de MHC, la baja expresión de genes que codifican para las proteínas transportadoras de antígeno y la secreción excesiva de citocinas supresoras de la actividad inmunológica (Barrera-Rodriguez *et al.*, 1995).

Diversos artículos han demostrado que los tejidos tumorales son capaces de regular negativamente la expresión de moléculas de MHC I, obteniendo ventaja para continuar con el desarrollo de la carcinogénesis. La falta de esta molécula obstaculiza la actividad de las células T, conllevando a un pronóstico desfavorable y por ende evidenciando la agresividad ante el crecimiento tumoral. Se sugiere que la pérdida del MHC I está relacionada a mutaciones en los genes *HLA* o en la regulación

anormal de su expresión, aunque también se han hallado indicios de que la falla reside en la regulación postranscripcional (Madjd *et al.*, 2005).

Las proteínas TAP1/TAP2 están involucradas con el procesamiento de antígenos, éstas se encargan de introducir péptidos del citosol al retículo endoplasmático para posteriormente ensamblarse con el MHC I; una vez unidos, el complejo se dirige a la superficie ubicándose en la membrana plasmática, permitiendo la presentación de antígenos a las células T CD8+. Este mecanismo de seguridad se ha visto evadido en el cáncer de mama, ya que se ha confirmado que en estadios tempranos ambas proteínas se ven expresadas en niveles bajos. Se ha sugerido que su regulación negativa puede proceder de mutaciones en los genes *TAP*, donde la pérdida del control de la expresión genética puede ser la causante. Por este mecanismo, la evasión del reconocimiento del sistema inmune da pie a la supervivencia de las células anormales (Henle *et al.*, 2017).

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y la interleucina 10 (IL-10) son citocinas con efecto inmunosupresor que están presentes en el desarrollo del cáncer (Salazar, 2000). El rol de TGF- β recae en la mediación de la respuesta inmune adaptativa, teniendo como principal efecto la inhibición de la proliferación de los linfocitos T efectores. Diversos estudios en cáncer han señalado que esta citocina tiene un papel supresor en estadios tempranos, actividad que se ve invertida en etapas posteriores, pues la progresión del tumor se ve acrecentada. Se ha confirmado que en el microambiente tumoral TGF- β interviniente en múltiples mecanismos de evasión inmunológica, como la regulación negativa de la expresión de los receptores de muerte o la supresión de la actividad de células citotóxicas, así mismo, proporciona una ventaja para la movilidad e invasión de las células anormales a otros tejidos, dando lugar a la metástasis (Kindt *et al.*, 2007; Salazar-Onfray *et al.*, 2007; Barcellos-Hoff & Akhurst, 2009).

Por su parte, la IL-10 ha sido identificada como una citocina cuyos efectos favorecen el escape tumoral de la respuesta inmune; estos se basan en la inhibición de la producción de diversas citocinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y la IL-12; además, influye en un decremento de la expresión de las moléculas CD80, CD86 y el MHC II. La maduración de monocitos (Mo) derivados de DCs y la respuesta de los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) también está moderada en relación con la expresión de la IL-10 (Salazar, 2000; Salazar-Onfray *et al.*, 2007).

Por lo tanto, la capacidad de inducir una respuesta eficaz involucra conocer las cualidades de los diversos componentes. Anteriormente se ha descrito que la respuesta antitumoral más efectiva se lleva a cabo cuando los mecanismos efectores celulares son capaces de reconocer y destruir las células anormales; por tanto, gran parte del diseño de estrategias en la inmunoterapia está dirigido a la activación y la participación de las células T (Arango & González, 2002, Hanahan & Weinberg, 2011).

Linfocitos T como inmuno-reguladores en el cáncer de mama

Se han descrito diversos mecanismos inmuno-reguladores en el cáncer de mama llevados a cabo por los linfocitos T, donde se ha definido que los CD8⁺ o linfocitos T citotóxicos (T_C) son clave para desarrollar una inmunidad antitumoral efectiva; sin embargo, éstos son influenciados por células T CD4⁺ o linfocitos T cooperadores (T_H), cuyas propiedades logran afectar tanto a la respuesta inmune adaptativa como la innata. Se pueden clasificar en diversas subpoblaciones en base a las citocinas secretadas; no obstante, dos de ellas juegan papeles contrarios, siendo ventajosa la respuesta Th1 para una predicción favorable en el desarrollo de la enfermedad (Aspord *et al.*, 2007; Gu-Trantien *et al.*, 2013; García-Romo *et al.*, 2017).

Las mejores condiciones para fortalecer los mecanismos antitumorales se dan al presentarse la respuesta Th1 y la acción de los linfocitos T_C, los cuales son productores de interferón γ (IFN- γ). Las DCs maduras, las células NK y los macrófagos M1, también apoyan el pronóstico positivo. De manera contraria, la respuesta Th2 junto con los linfocitos T reguladores (Treg) y los macrófagos M2 suprimen la inmunidad antitumoral y promueven la carcinogénesis (Mahmoud *et al.*, 2011; Gu-Trantien *et al.*, 2013).

Se ha reportado que en infiltrados tumorales del cáncer de mama predomina la respuesta Th2, la cual tiene como efecto la producción de diversas citocinas, entre ellas la IL-4 y la IL-13, que tienen como efecto incrementar la respuesta y diferenciación de los linfocitos T cooperadores (T_H) a tipo 2. Su presencia tiene un efecto inmunosupresor de la respuesta antitumoral, promoviendo la proliferación y resistencia de la apoptosis por parte de las células cancerígenas (Aspord *et al.*, 2007; Khohn *et al.*, 2011; Pedroza-González *et al.*, 2011; García-Romo *et al.*, 2017).

De forma paralela, tanto la IL-4 como la IL-13 interfieren en el cambio de isotipos en la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B teniendo como efecto una sobre producción de inmunoglobulina E (IgE) (Kindt *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2010). Ésta ha sido ampliamente

estudiada en infecciones parasitarias y en alergias; sin embargo, no hay estudios que pudiesen revelar su función en el cáncer.

La inmunoglobulina E y su receptor de alta afinidad.

La IgE tiene un nivel sérico muy bajo, siendo aproximadamente de 0.3 $\mu\text{g/mL}$. Su función está descrita en las reacciones de hipersensibilidad provocando reacciones alérgicas y la liberación de mediadores que facilitan la defensa antiparasitaria. Su estructura es similar a las demás proteínas que conforman la familia de las inmunoglobulinas, sin embargo, se puede diferenciar en base a la región constante de las cadenas pesadas con las que se identifican los isotipos, en el caso de la IgE se denotó como ϵ ; se ha calculado que su longitud está conformada por aproximadamente 440 aminoácidos y es posible su emparejamiento con las cadenas ligeras ya sean κ o λ . Cabe destacar que la región variable, tanto de la cadena ligera como de la pesada, son muy diferentes entre los distintos anticuerpos (Kindt *et al.*, 2007).

Las inmunoglobulinas tienen dos funciones principales, una es el reconocimiento de antígenos y la otra es la mediación de funciones efectoras por parte de los leucocitos. La primera es llevada a cabo por las porciones amino terminal ubicadas en la región Fab; la otra, por parte de los carboxilos terminales en la región Fc, éstos son reconocidos por glucoproteínas de membrana llamadas receptores de Fc (FcRs) ubicadas en varias células (Kikutani *et al.*, 1986; Kindt *et al.*, 2007).

Existen dos tipos de receptores de Fc para la IgE (Fc ϵ Rs), los cuales están diferenciados por su afinidad hacia dicha inmunoglobulina. El Fc ϵ RI tiene la mayor afinidad, donde se ha determinado que la $K_a = 10^{10} \text{ M}^{-1}$; el Fc ϵ RII, también conocido como CD23, tiene una baja afinidad siendo $K_a = 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Daniels *et al.*, 2012).

El Fc ϵ RI está conformado por tres distintas proteínas. Las subunidades α y β se presentan de forma única; en cuanto a la subunidad γ , esta corresponde a un homodímero. Es por ello que el receptor es considerado como una estructura tetramérica (Turner & Kinet, 1999; Eisenbraun *et al.*, 2000).

La subunidad α es una glicoproteína transmembranal cuyos dos dominios extracelulares se colocan en un ángulo agudo entre sí, formando una superficie convexa. Los aminoácidos ubicados en la parte superior de la molécula interactúan de forma directa en el reconocimiento y la unión con la porción Fc de la IgE, teniendo como consecuencia un cambio conformacional de la misma. Se ha

reportado que esta subunidad no compromete a la señalización celular, pues su cola citoplasmática es corta, estando conformada por tan sólo 17 aminoácidos (Turner & Kinet, 1999; Shin & Greer, 2015).

Las subunidades β y γ son responsables de la señalización, cada una contiene un motivo de activación en inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM), cuyo papel se centra en la capacidad de amplificar la transducción de señales, sin embargo, su estructura no es similar. Por su parte, la subunidad β es una proteína de membrana compuesta por cuatro dominios transmembranales y dos dominios citoplasmáticos; en cuanto a la subunidad γ , esta corresponde a una asociación de dos cadenas idénticas unidas por un enlace disulfuro entre los aminoácidos de cisteína N-terminal ubicados en la parte intracelular (Turner & Kinet, 1999; Eisenbraun *et al.*, 2000; Shin & Greer, 2015).

El Fc ϵ RI se ha encontrado principalmente en eosinófilos, basófilos y mastocitos, aunque también suele estar presente en algunas poblaciones celulares de APC. Se ha reportado que, en humanos, la estructura tetramérica anteriormente descrita no es obligatoria, ya que en DCs y monocitos se presenta como un trímero, en donde se compone de una subunidad α y dos subunidades γ (Turner & Kinet, 1999; Daniels *et al.*, 2012; Shin & Greer, 2015).

Las células presentadoras de antígeno.

Las células presentadoras de antígeno (APC) profesionales son células especializadas que se caracterizan por ser las únicas que expresan de manera natural el MHC II en la membrana celular. Tienen dos funciones principales. La primera es convertir los antígenos en pequeños péptidos para que puedan adherirse a las moléculas de MHC y así facilitar el reconocimiento por parte de los linfocitos T; la segunda, está relacionada a un papel co-estimulador, en donde las citocinas producidas benefician la activación de las células T, especialmente de los linfocitos T cooperadores (T_H). Las células del sistema inmune que son incluidas en este grupo son los monocitos (Mo)/macrófagos (Ma), los linfocitos B (LB) y las células dendríticas (DCs) (Kindt *et al.*, 2007, Abbas *et al.*, 2010).

Los Mo provienen de la línea mieloide, son células fagocíticas que se encuentran circulando en la sangre. Presentan un diámetro entre los 14-20 μ m. Contienen abundante citoplasma y un sólo

núcleo (LabCE, 2019). Son reconocidos mediante la expresión de marcadores específicos de la superficie celular, en humanos se evalúa el CD14 y CD16, donde las células con CD14+ High CD16- se consideran monocitos clásicos, mientras que las células CD14+ CD16+ se determinan como monocitos no clásicos y están relacionados a respuestas antiinflamatorias (R&D Systems, 2019).

Los M_a se encuentran en casi todos los tejidos, provienen de los monocitos que migraron y se diferenciaron. Reciben diferentes nombres según su ubicación, en el caso del hígado se conocen como células de Kupffer; en el sistema nervioso central, como microglía. Se identifican como células fagocíticas muy importantes en la defensa en la inmunidad innata, pues su deber es eliminar patógenos o células muertas (Murphy *et al.*, 2008; British Society for Immunology, 2019). Se dividen principalmente en dos subgrupos que presentan perfiles fagocíticos y secretores de citocinas totalmente diferentes. Los macrófagos M₁, que son los activados de forma clásica (IFN- γ), son células efectoras muy eficaces para eliminar patógenos e iniciar la inmunidad adaptativa; los macrófagos M₂, activados de forma alternativa (IL-4), suprimen la inflamación y las respuestas inmunes adaptativas, además de promover la reparación de tejidos y la angiogénesis (Rao *et al.*, 2014). Debido a que se considera como un grupo heterogéneo, sus marcadores de membrana suelen cambiar conforme a su ubicación y sus funciones, los más utilizados son CD14, CD16, CD23, CD32 y CD64 (Duque & Rojas, 2007).

Los LB pertenecen a la línea linfoide, pueden tener un diámetro cercano a los 15 μm y su papel se basa principalmente en mediar la respuesta humoral. Las células B maduras expresan moléculas de inmunoglobulina unidas a su membrana (mIg; generalmente IgM o IgD), que junto con el heterodímero Ig- α /Ig- β , forman el receptor de células B (BCR), siendo el responsable de transducir las señales. Ante el reconocimiento de un antígeno, la célula B se dividirá rápidamente dando lugar a la expansión clonal, en donde su progenie se diferenciará en células efectoras, ya sea en células de memoria o en células plasmáticas, conllevando consigo un cambio en el isotipo de inmunoglobulina. Las células B de memoria tienen una vida prolongada, expresan IgM pero no son capaces de secretar anticuerpos; las células plasmáticas, por el contrario, están altamente especializadas en la síntesis de anticuerpo soluble, aunque suelen carecer de IgM (Kindt *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2008). Se identifican por la presencia de distintas moléculas expresadas en la superficie de la membrana, para las células B inmaduras suele evaluarse el CD19, CD20, CD34,

CD38 y CD45R; para las células B maduras, se utilizan anticuerpos dirigidos a CD19 e IgM (Abcam, 2019).

Las DCs tienen largas prolongaciones digitiformes. Cuando son inmaduras migran hacia los tejidos, donde reconocerán algún patógeno y serán capaces de fagocitarlo, posteriormente madurarán y se convertirán en células especializadas en la presentación de antígenos a linfocitos T. Es por ello que se consideran como el puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. A pesar de ello, la función principal de estas células no radica en destruir agentes patógenos, sino presentar antígenos a los linfocitos T vírgenes, promoviendo su activación y con ello iniciando la respuesta inmunitaria adaptativa. Para identificarlas, se ha usado la combinación HLA-DR+ y la ausencia de marcadores de linaje de otras poblaciones celulares como CD19, CD3, CD56 y CD16 (Murphy *et al.*, 2008; Collin *et al.*, 2013; Collin & Bigley, 2018).

Existen varias subpoblaciones de DCs, éstas presentan características fenotípicas diferentes y diversos patrones de respuesta funcional. Las dos subpoblaciones más representativas son las de tipo mieloides (mDCs) y las de tipo plasmacitoide (pDCs). Por su parte, las mDCs son conocidas como convencionales o clásicas. Se caracterizan por producir citocinas proinflamatorias como IL-12, TNF- α e IL-6, además inducen la respuesta Th1. Para identificarlas, han sido utilizados anticuerpos dirigidos contra los marcadores CD141 y CD1c; en otras ocasiones también se ha evaluado la expresión de CD11c; no obstante, los monocitos también la presentan, la diferencia radica en que las mDCs carecen de CD14 o CD16. Las pDCs son células productoras de interferón tipo 1 y promueven las respuestas Th2, de igual manera participan en la defensa contra infecciones virales. Se distinguen por la expresión de moléculas de membrana como CD123, CD303 y CD304 (Lozada-Requena *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2010; Collin *et al.*, 2013; Collin & Bigley, 2018).

La inmunoglobulina E como un blanco en la inmunoterapia.

Se ha sugerido que la IgE puede ser un punto clave en terapias contra el cáncer debido a las propiedades de sus receptores, particularmente del Fc ϵ RI; el cual, además de tener una alta afinidad carece de inhibidores específicos, por ello reflejando un alto beneficio, pues los receptores de Fc para la IgG, que es evaluada comúnmente, son modulados en el microambiente tumoral. Por otro lado, la concentración sérica y la vida media de la IgE, en contraste con la IgG, pueden conferir una ventaja en el tratamiento de tumores (Daniels *et al.*, 2012; Debra *et al.*, 2014).

Pocas investigaciones han desarrollado diversas estrategias terapéuticas donde se evalúa la repuesta inmunológica de la IgE en el cáncer. Éstas se han basado desde su apoyo como adyuvantes hasta el desarrollo de anticuerpos IgE recombinantes dirigidos a TAA. A pesar de que sus estudios como blanco de la inmunoterapia contra el cáncer han sido exitosos y sus resultados, que la han llevado a destacar como un componente de la inmunidad con un papel beneficioso en la oncología, no ha sido evaluada más allá de situaciones preclínicas (Debra *et al.*, 2014).

Un estudio reciente describe que la IgE unida al FcεRI en células dendríticas promueven la respuesta Th2 al interactuar con alérgenos. Considerando que las DCs forman parte del infiltrado tumoral y a importancia de la respuesta Th1 en tumores mamarios (Sallmann *et al.*, 2011), se considera que la presencia de anticuerpos IgE podría 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.

JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, no se cuenta con datos experimentales para poder definir el papel que juega la IgE en el cáncer de mama, sin embargo, la caracterización de los mecanismos inmunoregulatorios y de inmunosupresión son de gran importancia para poder identificar blancos terapéuticos que permitan el desarrollo de nuevas terapias inmunológicas.

Por ende, el presente proyecto tiene la intención de analizar la presencia de las APC dentro del microambiente tumoral en pacientes con cáncer de mama, tomando en cuenta su capacidad para reconocer a la IgE mediante el FcεRI. Asimismo, se pretende analizar la presencia de linfocitos B como posibles células productoras de IgE en el microambiente tumoral.

Con ello, se espera aportar información que pueda ser esencial para determinar la posible participación de dicha inmunoglobulina en la enfermedad.

HIPÓTESIS

Las células presentadoras de antígeno en el microambiente tumoral de cáncer de mama expresan el receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) y pueden reconocer a dicha inmunoglobulina.

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la expresión de la Inmunoglobulina E y su receptor de alta afinidad (FcεRI) en células presentadoras de antígeno en tumores de pacientes con cáncer de mama.

Objetivos Particulares.

- A.** Analizar el inmunofenotipo y la frecuencia de linfocitos B (LB), monocitos/macrófagos (Mo/Ma) y células dendríticas (DCs) por citometría de flujo en sangre y en suspensiones frescas de tejido tumoral.
- B.** Analizar la expresión del receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) y la posible presencia de IgE unida al receptor en monocitos/macrófagos (Mo/Ma) y células dendríticas (DCs) por citometría de flujo en sangre y tejido tumoral.
- C.** Analizar la expresión de la IgE de membrana en linfocitos B (LB) por citometría de flujo en sangre y tejido tumoral.
- D.** Analizar la expresión del FcεRI y la posible presencia de IgE unido al receptor en monocitos/macrófagos (Mo/Ma) y células dendríticas (DCs) por citometría de flujo en sangre y en suspensiones frescas de tejido de individuos sanos y compararlo con los datos obtenidos de los pacientes.
- E.** Analizar la expresión de la IgE de membrana en linfocitos B por citometría de flujo en sangre y en suspensiones frescas de tejido de individuos sanos y compararlo con los datos obtenidos de los pacientes.
- F.** Analizar la existencia de correlaciones entre las frecuencias o la expresión de la IgE y su receptor FcεRI con los datos clínicos patológico de los pacientes.

METODOLOGÍA

1. Muestras clínicas.

Del Hospital de Gineco-obstetricia del Centro Médico Nacional “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se colectaron muestras de sangre periférica y de tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama recién diagnosticadas que no hayan estado bajo tratamiento.

Las muestras de tejido sano fueron obtenidas por cirugía y se procesaron como muestras negativas una vez confirmado por patología. De cada paciente se obtuvo el consentimiento por escrito antes de la donación de tejidos.

Para la obtención de muestras sanguíneas control, se reclutaron mujeres adultas en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-Iztacala), UNAM. Se seleccionaron las muestras cuyas donadoras cayeran dentro del rango de edad de las pacientes y que no hayan sido diagnosticadas con ningún tipo de cáncer.

Los datos personales de las pacientes se manejaron confidencialmente y no fueron utilizados en ningún reporte o análisis de datos, por lo que se les designó un código de identificación que fue utilizado durante la investigación.

2. Obtención y procesamiento de las muestras clínicas.

Por punción venosa en el brazo (flebotomía) se obtuvieron de 5 a 10 mL de sangre, los cuales fueron colocados en tubos con heparina, para evitar la formación de trombos. Las muestras se mantuvieron a 4° C para ser transportada al Laboratorio 7 de Inmunología ubicado en la Unidad de Morfología y Función en la FES-Iztacala, UNAM.

En el laboratorio, la fase celular de la sangre fue separada del plasma. Después se realizó un fraccionamiento por gradiente de centrifugación, lo cual consistió en colocar 3 mL de Lymphoprep ($\delta = 1.077 \text{ g/mL}$) en un tubo de plástico de 15 mL y se agregó cuidadosamente la suspensión celular evitando mezclarlos, consecutivamente se centrifugó a 800g (2100 rpm) por 20 minutos a temperatura ambiente; al finalizar, se recolectó la interface superior al Lymphoprep, la cual contenía a las células mononucleares. Estas fueron transferidas a un nuevo tubo de 15 mL y lavadas

con solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (PBS) y Ácido etilendiaminotetraacético 0.2 mM (EDTA). Por último, las células se resuspendieron en PBS 1x-EDTA y se determinó su número y viabilidad utilizando el colorante azul de tripán.

Las muestras de tejido tumoral mamario y tejido sano se obtuvieron por medio de biopsias. El tejido fue cortado en pequeños fragmentos para facilitar la digestión enzimática 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 40 minutos. Posteriormente, se disgregaron y se removieron los fragmentos de tejido conectivo por medio de un homogeneizador (CD1 Sigma). La suspensión celular obtenida se lavó con PBS 1x-EDTA. Posteriormente las células muertas y eritrocitos fueron removidos por gradiente de centrifugación (Lymphoprep) de forma similar a lo descrito para el fraccionamiento de la sangre. Finalmente se determinó el número y viabilidad celular con azul de tripan de las suspensiones celulares obtenidas.

3. Determinación de la frecuencia e inmunofenotipo de Linfocitos B, Monocitos/Macrófagos y Células Dendríticas en sangre y tejido.

A partir de muestras frescas de sangre y tejido se obtuvieron suspensiones celulares que fueron analizadas por citometría de flujo.

Se realizó una tinción de viabilidad con el colorante Ghost Dyes™, el cual confirmaba la viabilidad de las células. La identificación por inmunofenotipo se llevó a cabo con combinaciones de anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos dirigidos contra moléculas de membrana celular. Para los linfocitos B (LB) se confirmó la expresión de CD45+ CD19+; para los Monocitos-Macrófagos (Mo/Ma) fue necesaria la expresión HLA-DR+ CD14+. Por su parte, las Células Dendríticas (DCs) fueron identificadas con anticuerpos contra LIN- (CD19, CD20, CD14, CD16, CD56 y CD3) y HLA-DR+; para identificar algunas de sus subpoblaciones se utilizaron anticuerpos contra CD11c (mDCs) y CD123 (pDCs). Así mismo, se les evaluó la expresión de las moléculas FcεRI e IgE.

Las células fueron teñidas durante 30 minutos con el colorante de viabilidad, después se lavaron con PBS 1x-EDTA para quitar el exceso de reactivo y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos monoclonales para la identificación de los marcadores de superficie. Posteriormente se lavó con PBS 1X-EDTA y consecuentemente se fijaron con un kit (BD

Cytofix/Cytoperm™). Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo BD LSRFortessa; los datos obtenidos fueron procesados con el software Flowjo v. X (Tabla 1).

Tabla 1. Panel de anticuerpos para citometría de flujo

Fluorocromo	<i>TUBO 1</i>	<i>TUBO 2</i>
	DCs 1	Mo/Ma LB
<i>FITC</i>	LIN	CD14
<i>Pe</i>	FcεRI	FcεRI
<i>PercP</i>	HLA-DR	HLA-DR
<i>APC</i>	IgE	IgE
<i>APC-H7</i>	CD11c	
<i>PeCy7</i>	CD123	CD19
<i>V-450</i>	CD45	CD45

Lista de anticuerpos monoclonales usados para la identificación celular por citometría de flujo. Se realizaron dos tubos diferentes con distintos marcadores.

4. Análisis Estadístico.

Se utilizó el software GraphPad Prism 5.0 para realizar el análisis estadístico. Los resultados se mostraron como la media ± el error estándar de media (SEM). Se compararon dos grupos mediante el análisis de Mann-Whitney; mientras que la diferencia entre múltiples grupos se evaluó mediante Kruskal-Wallis. Se consideró estadísticamente significativo designando un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Características clínico-patológicas.

Se recolectaron en total 17 muestras de sangre periférica y tejido tumoral de pacientes (P) con cáncer de mama en un periodo que comprendió de Agosto del 2018 a Mayo del 2019. Las muestras fueron catalogadas por diversas características clínico-patológicas, entre ellas el grado, la clasificación TNM, los ganglios afectados y la presencia de algunos receptores (*Tabla 2*).

Tabla 2. Datos clínico-patológicos de los pacientes con cáncer de mama.

P	EDAD (AÑOS)	GRADO	EP (TNM)	GANGLIOS POSITIVOS	RE (%)	RP (%)	HER-2
110	42	II	IIA T1N1M0	1	80	90	NEGATIVO
111	47	I	IA T1N0M0	0	90	30	NEGATIVO
112	58	II	IIIA T2N2M0	1	90	90	NEGATIVO
113	57	III	IV T1NXM1	X	90	90	NEGATIVO
114	63	II	IA T1N0M0	0	100	90	NEGATIVO
115	43	III	IIA T1N1M0	1	0	0	NEGATIVO
116	57	II	IIB T2N1M0	1	80	20	NEGATIVO
117	59	II	IIA T2N0M0	0	0	0	POSITIVO
122	36	III	IA T1N0M0	0	80	70	NEGATIVO
123	50	II	IIA T1N1M0	1	90	80	NEGATIVO
124	42	III	IA T1N0M0	0	20	20	POSITIVO
126	62	III	IIA T2N0M0	0	0	0	POSITIVO
127	58	II	IIA T1N1M0	1	80	80	NEGATIVO
128	59	II	IA T1N0M0	0	60	60	NEGATIVO

129	51	II	IIA T2N0M0	0	90	90	NEGATIVO
131	46	III	IIA T2N0M0	0	0	0	POSITIVO
136	76	II	IA T1N0M0	0	80	30	NEGATIVO

Características de los tumores de pacientes con cáncer de mama. P = Paciente; EP = Estadio patológica; RE = Receptores de estrógeno; RP = Receptores de progesterona; HER2 = Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2.

La edad de las mujeres se encontraba en el intervalo de 36 a 76 años, con una media de 53. En la clasificación del grado, la mayoría de los pacientes fueron designados en el grado II (58%); el grado I, sólo involucró a una persona (5.8%) y el grado III, un total de seis pacientes (35.3%).

Por parte del estadio patológico, se encontraron los cuatro estadios, sin embargo, hubo dominancia por parte de los primeros dos, pues el estadio I y el estadio II representaron el 35.2% y 52.9% respectivamente; en los estadios III y IV sólo fue designada una persona (5.8% en ambos).

En cuanto a los ganglios afectados, solamente siete de los pacientes se categorizaron como positivos (41.1%). Por último, al analizar el comportamiento de los receptores hormonales en el tejido tumoral, únicamente una persona resultó ser triple negativo (5.8%); tres, sobre expresaron la proteína HER-2 (17.6%); los últimos 12, pertenecieron al grupo Luminal (70.6%).

Las muestras control fueron obtenidas de donadoras sanas que no estuvieron diagnosticadas con ninguna clase de neoplasia. Para la sangre, la edad oscilo entre los 20 y 75 años con una media de 44; por parte del tejido sano, entre 19 a 95 años (*Tabla 3*).

Tabla 3. Datos de los donadores de sangre y tejido.

DONADORA SANGRE SANA (SC)	EDAD (AÑOS)	DONADORA TEJIDO SANO (TC)	EDAD (AÑOS)
1	58	123	50
2	60	124	42
3	47	125	85
4	51	135	60

5	75	137	64
6	50	4	55
7	60	5	19
8	59	6	95
9	50		
10	38		
12	33		
19	22		
20	20		
21	21		
22	21		

La media de la edad de los controles de sangre fue de 44, mientras que la de los controles de tejido fue de 58. Los pacientes 123 y 124 se repiten en la *Tabla 1*, pues a ellos se les extrajo tanto tejido canceroso como sano.

Infiltrado celular.

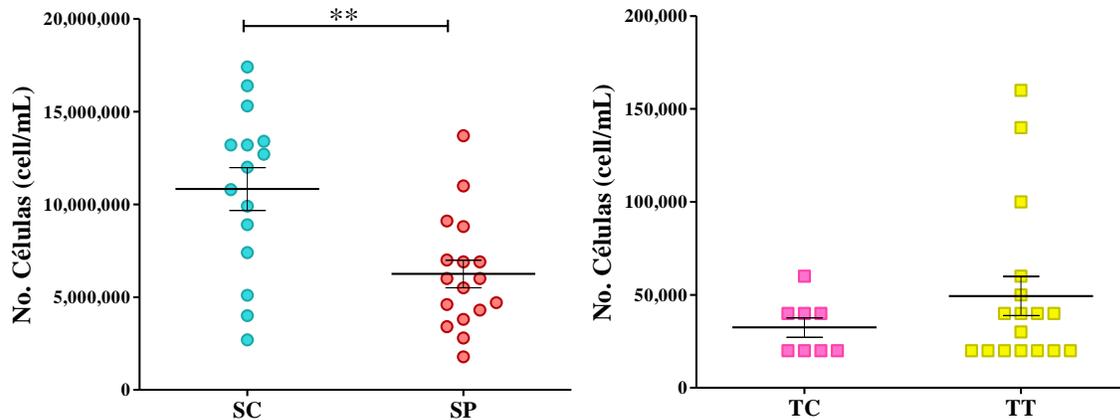


Figura 1. Concentración celular de las muestras.

Comparación de la concentración celular de las muestras de sangre y tejido entre los pacientes con cáncer de mama y los controles. ** $p = 0.0065$. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

El análisis estadístico reveló diferencias significativas al comparar la cantidad de células por mL entre las muestras de sangre control (SC) y las de sangre del paciente (SP), pues en la primera se

reveló un valor promedio de 10,820,000 células/mL; por otro lado, la media de la sangre del paciente fue de 6,251,800 células/mL. La comparación de las muestras de tejido control (TC) y tejido tumoral (TT) no reflejaron diferencias significativas (*Figura 1*). Es importante recalcar que este conteo fue realizado después de la separación por el gradiente de densidad, así que no representa el conteo de células totales.

Para el análisis por citometría de flujo, las células fueron analizadas por su tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A). Se delimitaron regiones para seleccionar únicamente a aquellas que correspondieran a células mononucleares; se excluyeron las células muertas, los polimorfonucleares y los fragmentos celulares (*Figura 2*).

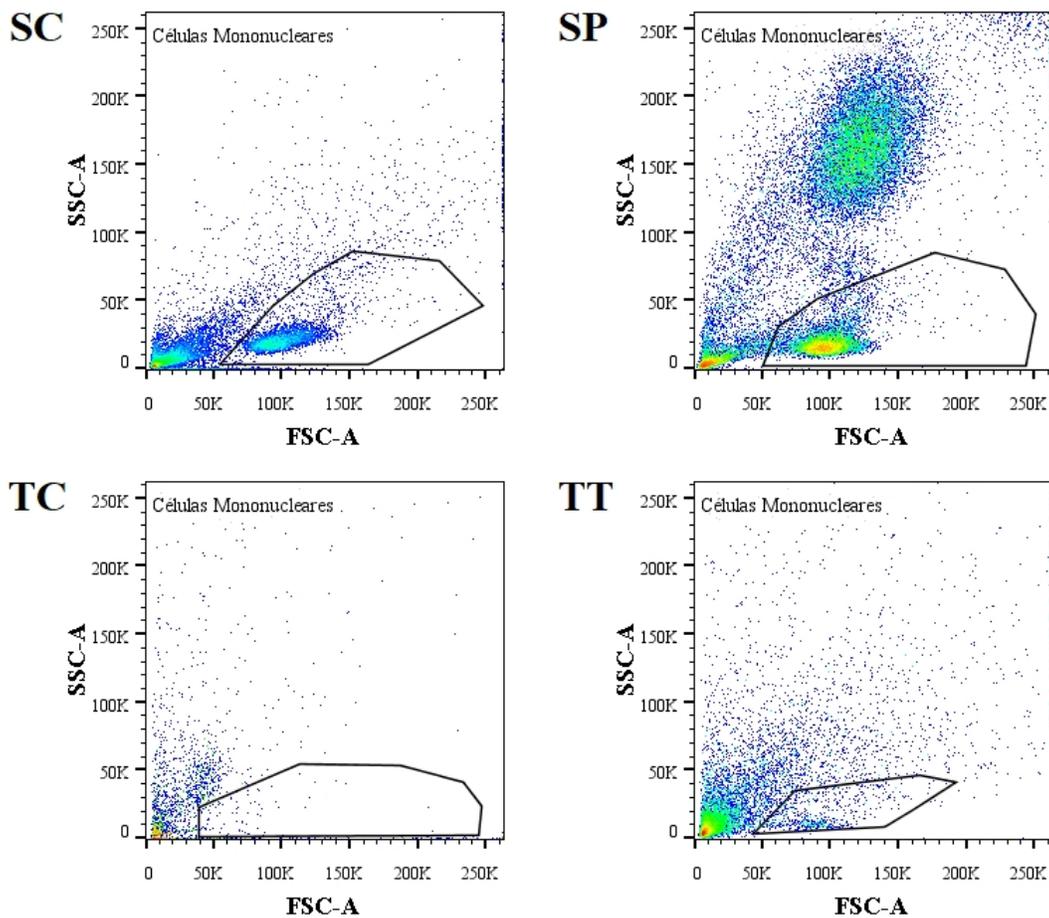


Figura 2. Selección de las células mononucleares.

Selección de células mononucleares a partir del análisis por citometría de flujo. Se encontró una mayor frecuencia de células en muestras del paciente a comparación de los controles. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

Del total de células evaluadas, el mayor porcentaje de células mononucleares fue encontrado en las muestras de sangre en comparación a las muestras de tejido. En efecto, las muestras de SP fueron las que obtuvieron el mayor porcentaje con un valor promedio de 23%; en el caso de SC, este valor disminuyó a 17%. Con respecto a las muestras de tejido, estas proporciones disminuyeron abruptamente, pues para TC sólo se presenta en el 3%; la muestra de TT, revelaba que sólo el 5% pertenecían a la misma población.

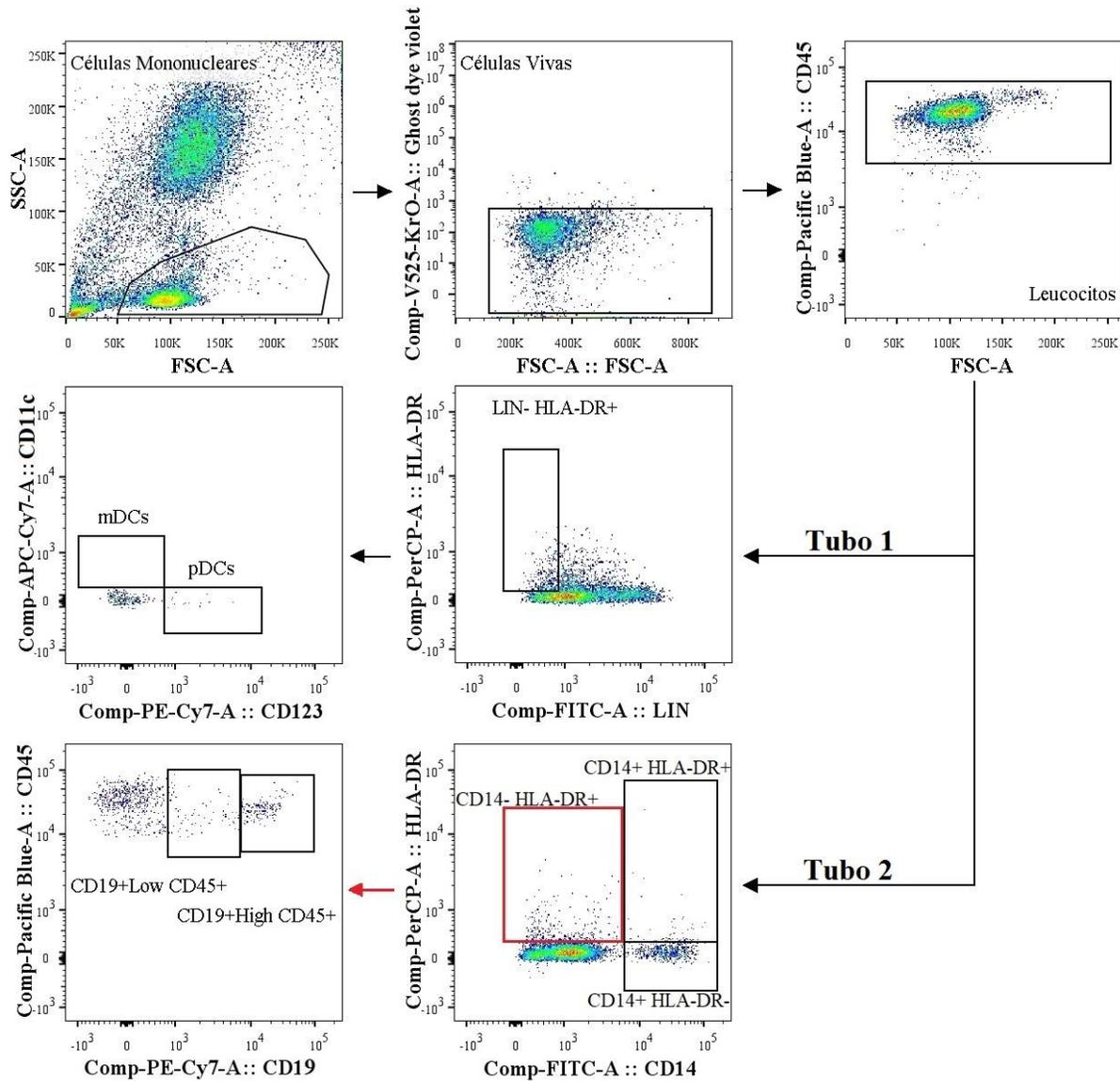


Figura 3. Identificación de las APC por inmunofenotipo.

Identificación de las células presentadoras de antígeno a partir de su inmunofenotipo por citometría de flujo. Se muestran las regiones delimitadas para la selección de las distintas subpoblaciones. Los anticuerpos y colores utilizados se describen en la *Tabla 1*.

La identificación de las células presentadoras de antígeno se realizó mediante su evaluación por inmunofenotipo. En primera instancia, se seleccionaron las células vivas (Ghost Dye-); posteriormente, la expresión de CD45+ reveló a las células leucocitarias. Se lograron diferenciar dos subpoblaciones de DCs, las cuales se distinguieron como mDCs (LIN-/HLA-DR+/CD123-/CD11c+) y pDCs (LIN-/HLA-DR+/CD123+/CD11c-). De igual manera, se identificaron dos poblaciones de Mo/Ma, las cuales diferían en la expresión de HLA-DR (CD14+/HLA-DR+ y CD14+/HLA-DR-). En cuanto a los LB (HLA-DR+ CD19+), se diferenciaron dos poblaciones: CD19+^{High} CD45+ y CD19+^{Low} CD45+ (*Figura 3*).

Se encontraron diferencias significativas al comparar el porcentaje de leucocitos (CD45+) sobre el total de células mononucleares en las muestras de tejido. El TC revelaba una media del 15%; mientras que para TT, el valor correspondiente fue de 40%. Demostrando que la presencia de células leucocitarias en el tejido tumoral supera drásticamente a la presente en el tejido sano (*Figura 4*). Cabe destacar que los valores antes mencionados no están referidos a la totalidad del tejido tumoral, si no a la población recolectada de las suspensiones celulares después del fraccionamiento por densidad.

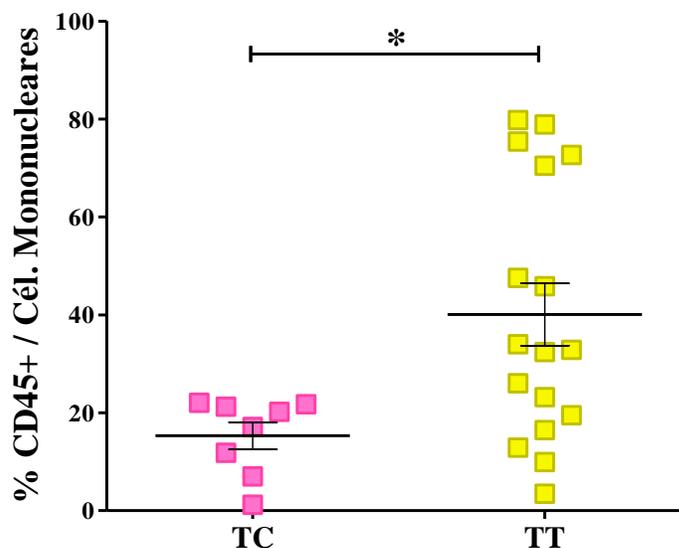


Figura 4. Frecuencia de leucocitos en el total de células mononucleares de las muestras de tejido.

Comparación de la frecuencia de leucocitos (CD45+) en el total de células mononucleares entre las muestras de tejido. La media de la frecuencia fue más alta en tejido canceroso. * $p = 0.0183$. TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

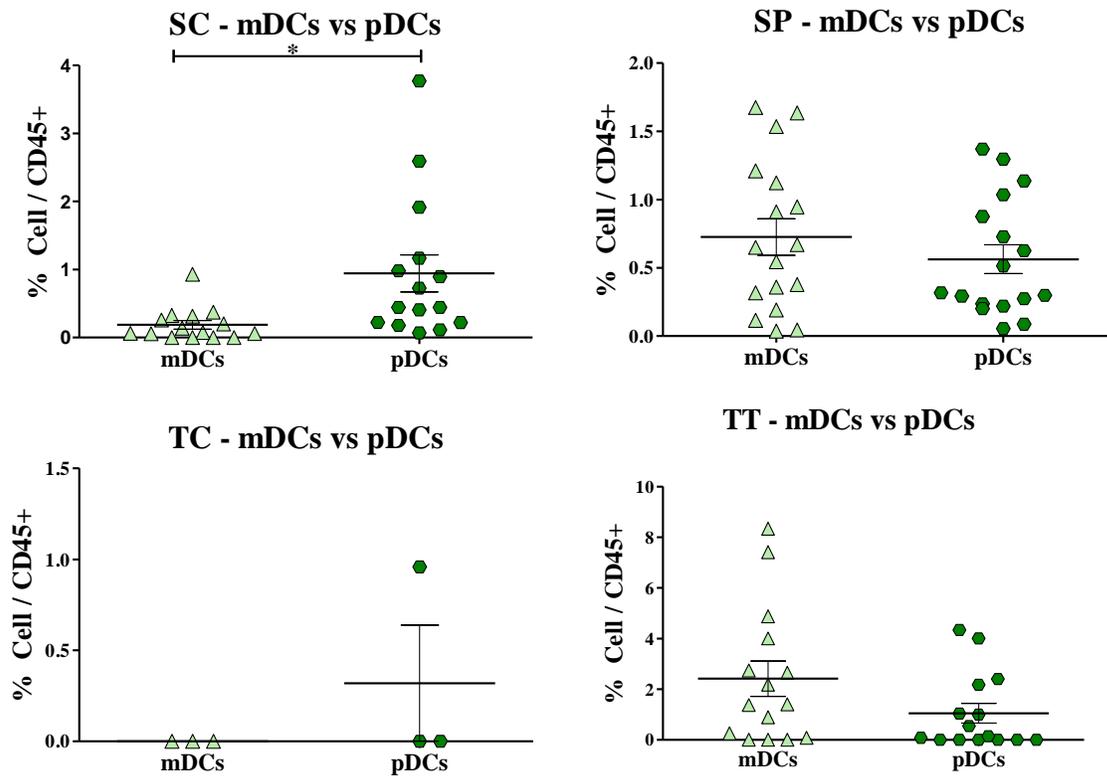


Figura 6. Frecuencia de mDCs y pDCs en el total de leucocitos de las distintas muestras.

Comparación entre la frecuencia de las subpoblaciones de DCs en el total de leucocitos (CD45+) de las distintas muestras biológicas. Las mDCs fueron más frecuentes en muestras de pacientes, en cambio, las pDCs en las muestras control. Para el análisis estadístico se realizó la t de Student con 95% de confianza. * $p = 0.0226$. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

La población CD14+ HLA-DR+ presentó una mayor frecuencia del total de leucocitos en las muestras TT a pesar de no existir una diferencia significativa. En el caso de las muestras sanguíneas, los porcentajes fueron muy similares, con una media de 2.27%. La población CD14+ HLA-DR- fue más representativa en SP; para las muestras SC, TC y TT se reflejaron medias similares con frecuencias pequeñas. En ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas (Figura 7).

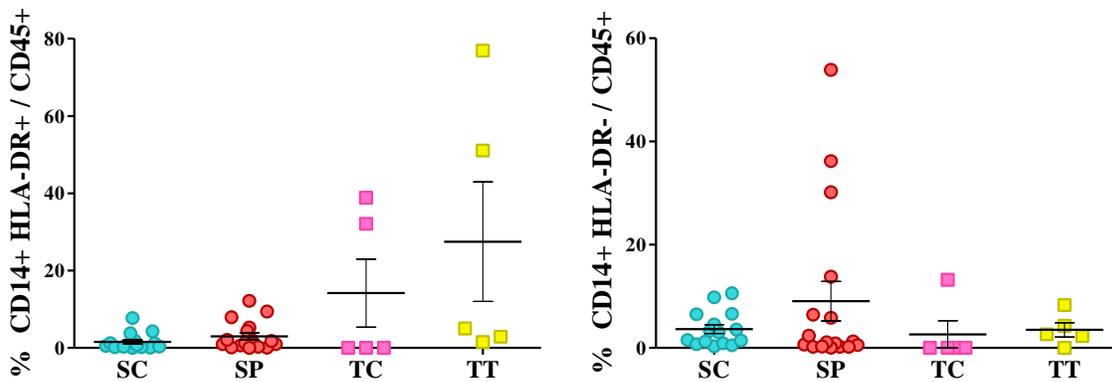


Figura 7. Frecuencia de las poblaciones de CD14+ en el total de leucocitos.

Frecuencia de CD14+ HLA-DR+ y CD14+ HLA-DR– del total de leucocitos (CD45+) de las muestras de sangre y tejido. Para la primera población, la frecuencia dominante se presentó en TT; en la segunda, SP fue la más sobresaliente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

La población CD19+^{High} fue más frecuente en las muestras de sangre que en las de tejido, aunque en ninguna de ellas sus promedios superaron el 5%. La frecuencia de las células CD19+^{Low} fue similar en todos los tejidos analizados (*Figura 8*).

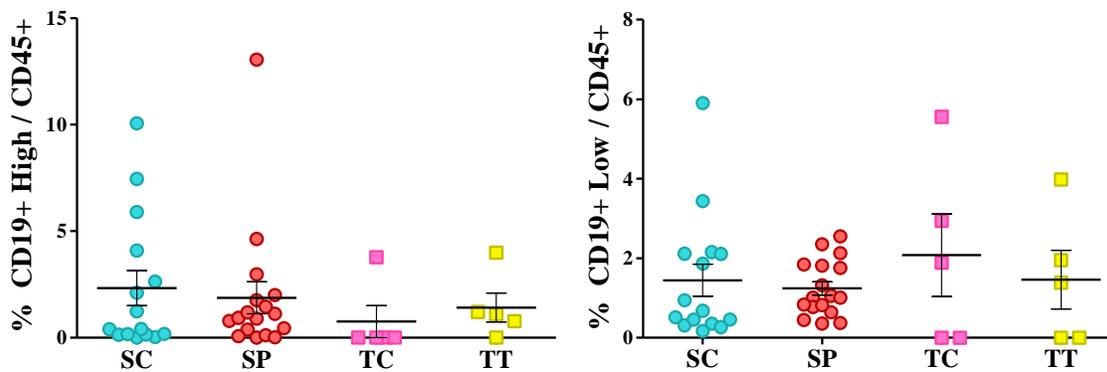


Figura 8. Frecuencia de las poblaciones de CD19+ en el total de leucocitos.

Frecuencia de CD19+^{High} y CD19+^{Low} del total de leucocitos (CD45+) de las muestras de sangre y tejido. La media de las frecuencias fue similar al comparar las muestras de controles con las de los pacientes. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

Expresión de la IgE y su receptor de alta afinidad.

Fue analizada la frecuencia en la que las mDCs, pDCs, CD14+ HLA-DR+ y CD14+ HLA-DR- expresaban la IgE como unida al receptor FcεRI (Figura 9). Se observó que una porción de las pDCs y mDCs presentes en la sangre tienen unida la IgE al receptor de alta afinidad. No hubo diferencias significativas en las proporciones de pDCs y de mDC entre la sangre de donadores sanos y la de las pacientes. Sin embargo, la proporción fue mayor en las pDCs que en las mDCs tanto en la sangre de donadores sanos (P = 0.0004), como en la de las pacientes (P = 0.0006).

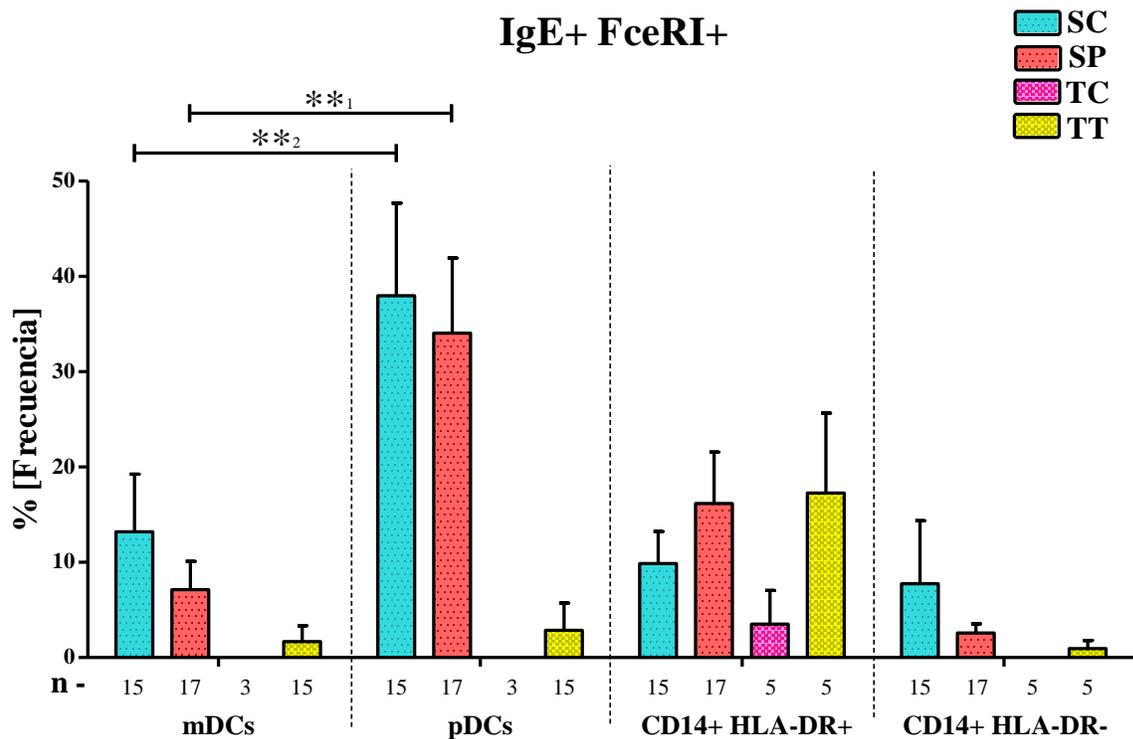


Figura 9. Frecuencia de las subpoblaciones de DCs y poblaciones de CD14+ que presentan IgE unida al receptor FcεRI.

Frecuencia de APC que expresan la IgE unida al receptor de alta afinidad (IgE+ FcεRI+). La población pDCs fue la más frecuente en muestras de sangre; CD14+ HLA-DR+, lo fue en tejido. ***¹ P = 0.04; ***² P = 0.02. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

La población CD14+ HLA-DR- obtuvo los menores niveles de frecuencia al evaluar la expresión de ambas moléculas. Por su parte, la población CD14+ HLA-DR+ se detectó tanto en la sangre de

donadores sanos como en la de pacientes, mostrando proporciones comparables; de igual forma, dicha población estuvo presente en TT con valores similares a los de la sangre. Por parte del tejido mamario sano (TC) se detectó una pequeña población con proporciones menores a las observadas en el TT, siendo la población con la mayor expresión de la IgE unida a su receptor dentro del microambiente tumoral.

A las poblaciones de CD19+ se les evaluó la frecuencia con la que las células expresaban la IgE de membrana (Figura 10). Ambas poblaciones CD19+^{High} y CD19+^{Low} estuvieron presentes en la sangre tanto de donadores sanos como de pacientes y en el tejido tumoral en proporciones similares, en tanto no fueron detectables en el tejido mamario sano.

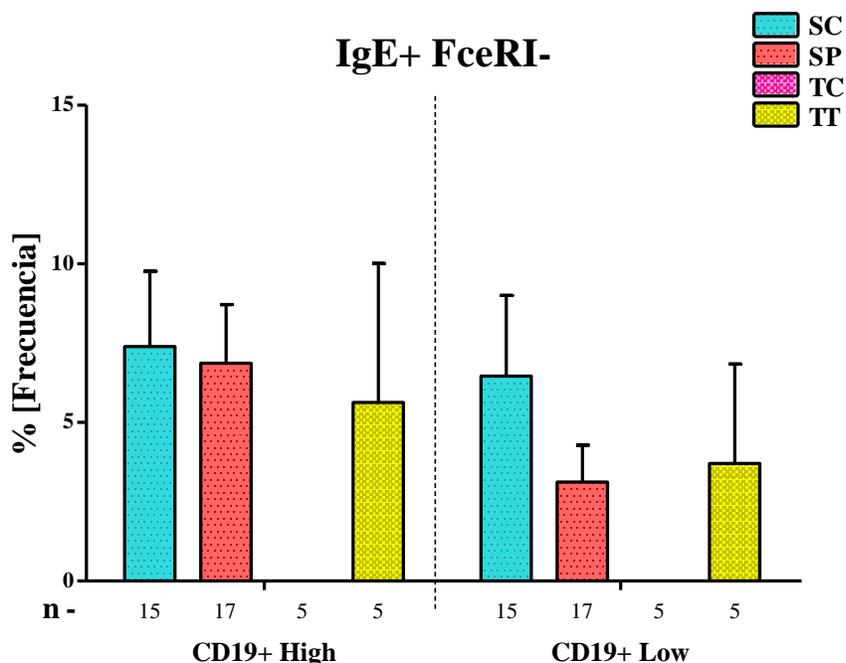


Figura 10. Frecuencia de células CD19+^{High} y CD19+^{Low} que presentan la IgE de membrana.

Frecuencia de CD19+^{High} y CD19+^{Low} que presentan la IgE de membrana en las muestras de sangre y tejido. La media de las frecuencias fue similar entre sí. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

En cuanto a los niveles de expresión de la IgE de membrana, se observan niveles similares a ambas poblaciones CD19+^{High} y CD19+^{Low} en la sangre de donadores sanos. Sin embargo, en la sangre

de pacientes hay una disminución en los niveles de expresión en la población CD19+^{High} (Figura 11). Aun así, en TT la expresión de la molécula fue prácticamente nula en ambas poblaciones. Solamente se encontró una diferencia significativa al evaluar las poblaciones en SP.

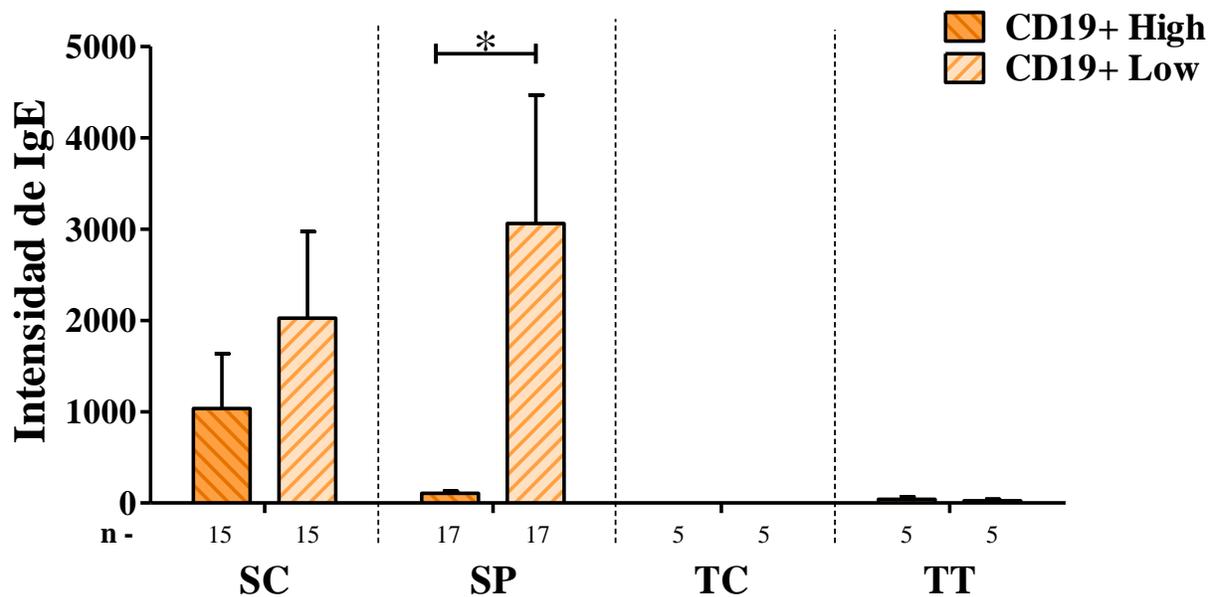


Figura 11. Media de intensidad de la IgE de membrana de células CD19+^{High} y CD19+^{Low}.

Media de la intensidad de la expresión de la IgE de membrana en células CD19+^{High} y CD19+^{Low}. CD19+^{Low} fueron las predominantes principalmente en muestras sanguíneas. En TT se presenta en pequeñas unidades. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

Correlación con las características clínico-patológicas de los pacientes.

Para determinar si algunas de las características de los pacientes pudieran estar asociadas con los niveles de células leucocitarias, se realizaron análisis agrupando a los pacientes de acuerdo con algunas de sus características.

Primero se analizó la frecuencia de las APC con respecto a la edad de las pacientes, para lo cual se dividieron en dos grupos, uno de ellos incluía a mujeres jóvenes, cuyas edades oscilaban entre los 36 y 55 años; el otro grupo, sólo incluía a las personas que estuvieran entre 56 y los 75 años (Figura 12).

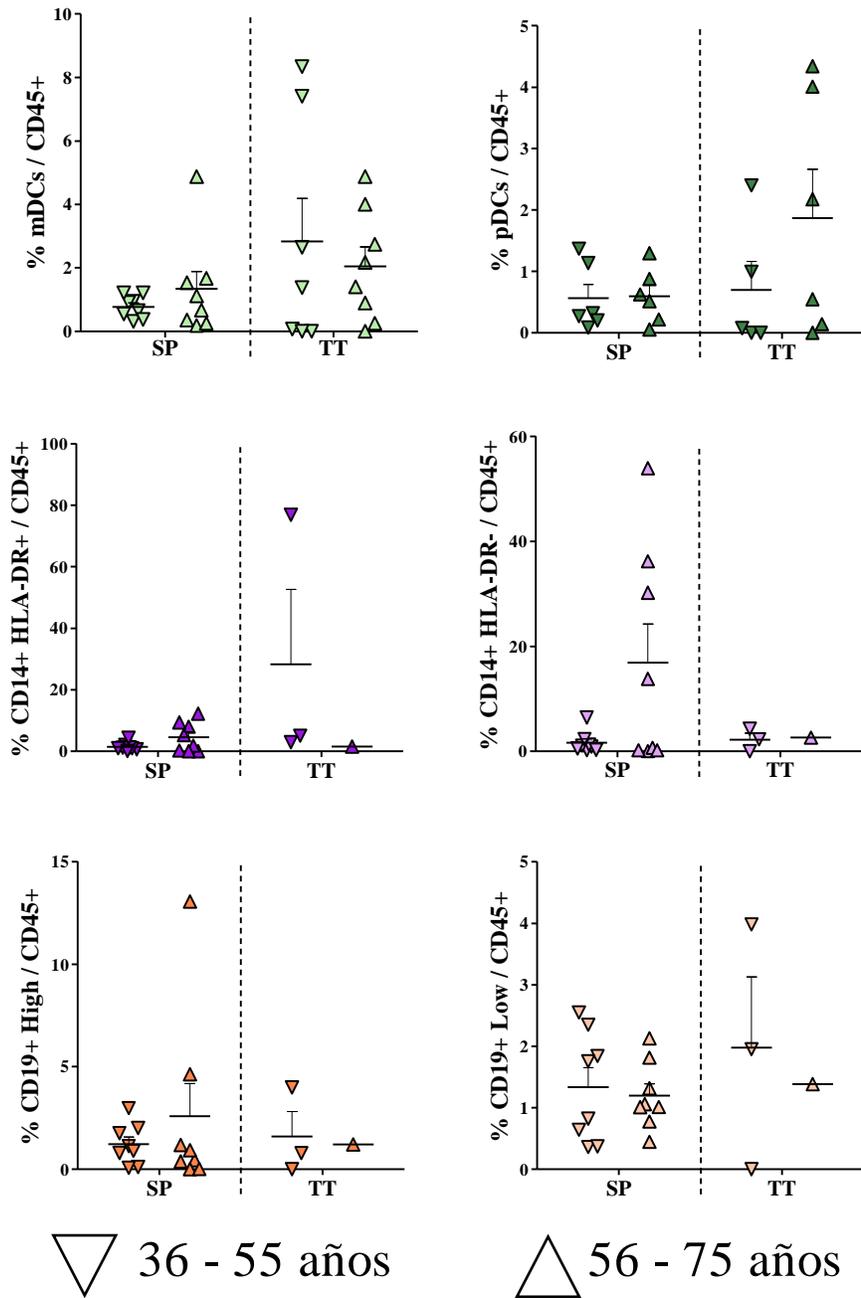


Figura 12. Correlación de la frecuencia de las APC del total de leucocitos con la edad de las pacientes.

Comparación de la frecuencia de las APC en correlación a la edad de los pacientes. Se formaron dos grupos cuyos rangos se establecieron de 36 - 55 años y de 56 - 75 años. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

No se encontraron diferencias significativas en ninguna población celular. Sin embargo, en el TT la frecuencia de pDCs fue más alta en las edades mayores (56 - 75 años), contrario a lo sucedido en las mDCs, cuya media fue ligeramente mayor en las edades jóvenes (36 - 55 años). Los valores del promedio de la frecuencia de CD14+ HLA-DR-, CD19+^{High} y CD19+^{Low} en TT fueron muy parecidos. En SP la población CD14+ HLA-DR- aumentó drásticamente en las edades de 56 a 75 años. A pesar de ello, el análisis estadístico no lo señaló como significativo debido a la variabilidad entre las diferentes muestras.

Al correlacionar el grado con la frecuencia de las APC, se identificó que las mDCs en TT se incrementaban conforme avanzaba la clasificación; caso contrario a lo sucedido en las pDCs, dónde la mayor frecuencia se localizó en el grado I, comportamiento que se repitió en la población CD14+ HLA-DR+. A pesar de que los valores de frecuencia diferían entre sí, no se revelaron diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, no se encontraron células pertenecientes a CD14+ HLA-DR- y las poblaciones de CD19+ en el grado I del TT (*Figura 13*).

En SP se observó que la frecuencia en las poblaciones CD14+ aumentaba al incrementarse la categoría del grado; mientras que para las mDCs como para las poblaciones de CD19+, no se encontró ninguna tendencia.

Es importante mencionar que una limitante del trabajo es el número de muestras, la necesidad de incluir más muestras, pues en el presente trabajo sólo una de las pacientes fue designada como grado I; asimismo, las poblaciones CD14+ HLA-DR+, CD14+ HLA-DR-, CD19+^{High} y CD19+^{Low} tenían un número de muestras muy limitado en TT. Debido a lo anterior, no se pudo realizar ningún análisis estadístico, por ende, no se determinaron diferencias significativas.

La correlación de la frecuencia de las APC con los demás parámetros clínicos, tales como los estadios de la clasificación TNM, la afección de los ganglios axilares y el comportamiento de los receptores hormonales (Triples negativos, Sobreexpresión de HER-2 y Luminal) no revelaron relaciones que reflejaran diferencias estadísticamente significativas (resultados no mostrados).

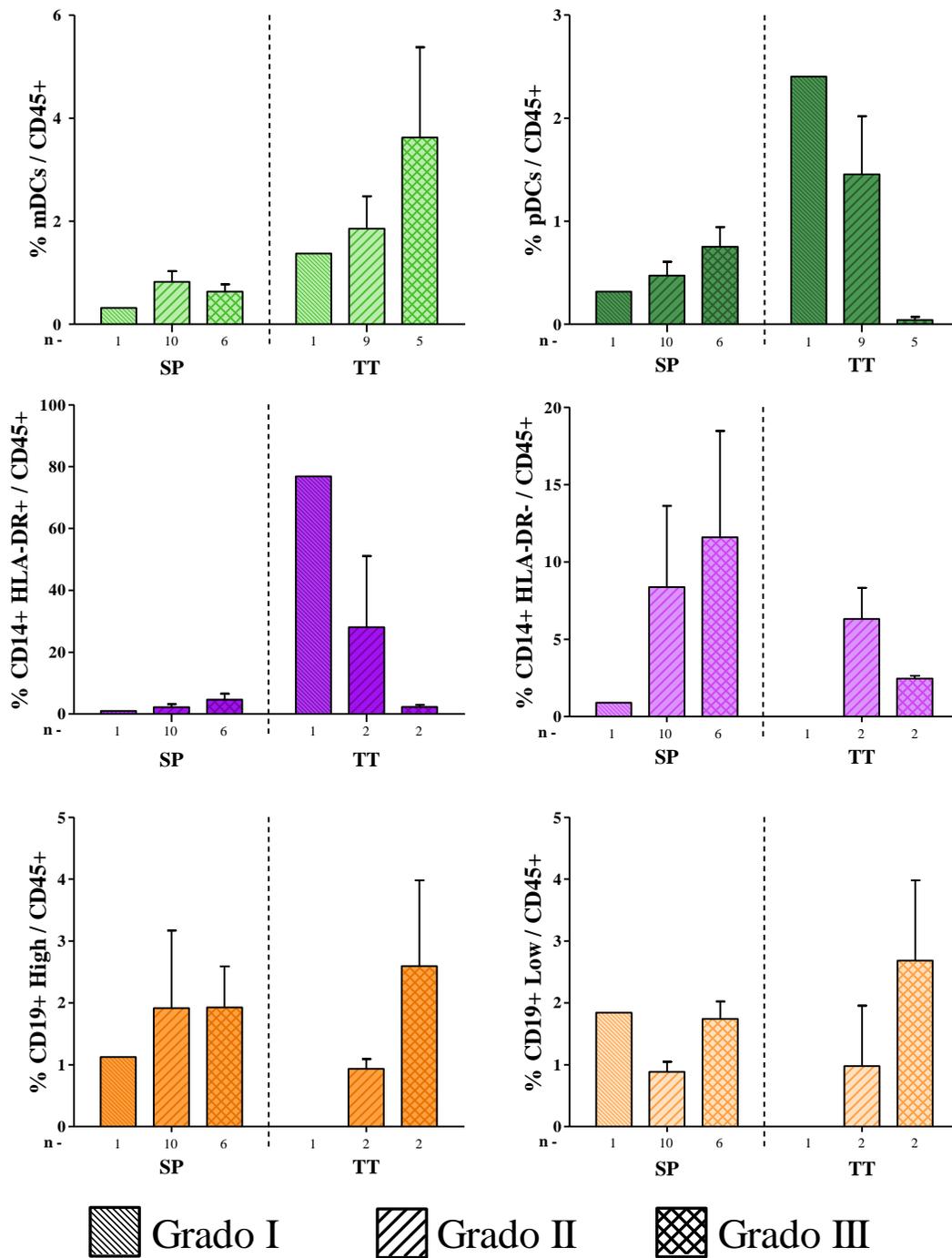


Figura 13. Correlación de la frecuencia de las APC del total de CD45+ con el grado de los tumores.

Comparación de la frecuencia de las APC en correlación al grado de los tumores. No se encontraron células de CD14+ HLA-DR- y de las subpoblaciones de CD19+ en el grado I del TT. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

IgE+ FcεRI+

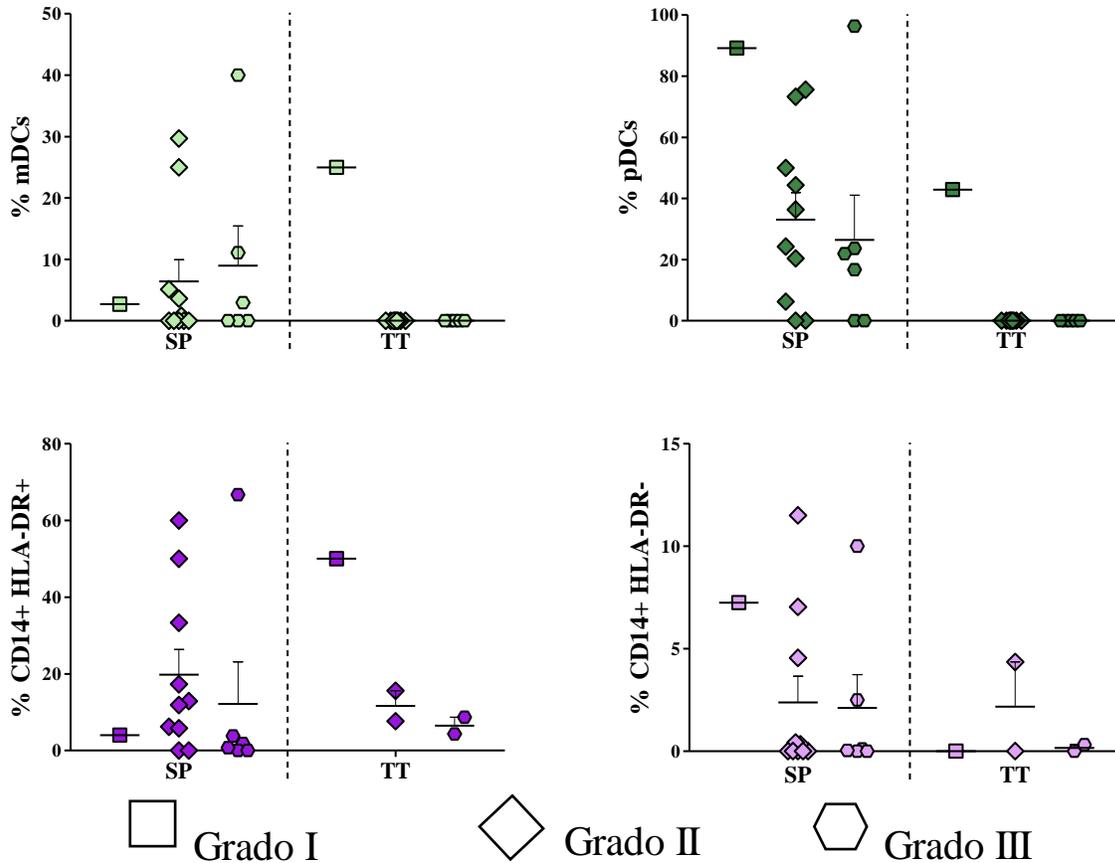


Figura 14. Correlación de la expresión tanto del FcεRI y de la IgE en las subpoblaciones de DCs y CD14+ con el grado de los tumores.

Comparación de la frecuencia de las APC que expresan la IgE unida al receptor de alta afinidad en correlación al grado de los tumores. En pDCs y CD14+ HLA-DR-, la frecuencia disminuyó conforme avanzaba el grado. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

Posteriormente, se correlacionó el grado del tumor con la frecuencia de las subpoblaciones de DCs y CD14+ que presentaban la IgE unida al FcεRI (Figura 14).

El análisis estadístico no reveló ninguna diferencia significativa, sin embargo, se reconoce que ambas moléculas están mayormente presentes en la SP que en TT. En el grado II y el grado III no

se detectó la expresión de dichas proteínas en TT para las mDCs y pDCs. En cuanto a la población CD14+ HLA-DR+, aunque no hubiera diferencias estadísticas la mayor frecuencia correspondió al grado I en TT, mientras que para CD14+ HLA-DR- fue en el grado II.

Al correlacionar la afección de los ganglios axilares con la frecuencia de las mDCs, pDCs y CD14+ HLA-DR+ que expresaban tanto la IgE como el FcεRI no se identificaron diferencias significativas (Figura 15).

IgE+ FcεRI+

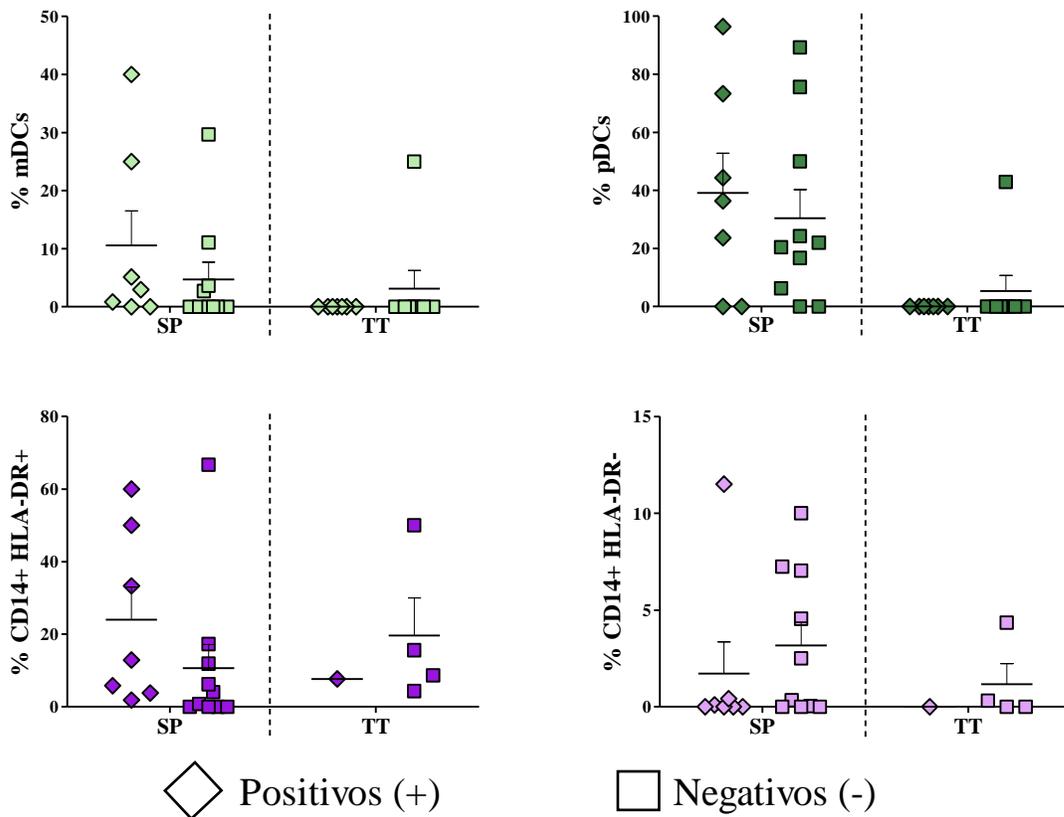


Figura 15. Correlación de la expresión tanto del FcεRI y de la IgE en las subpoblaciones de DCs y CD14+ con los ganglios afectados de las pacientes.

Comparación de la frecuencia de las APC que expresan la IgE unida al receptor de alta afinidad en correlación a la afección en ganglios linfáticos. En la sangre del paciente, las mDCs, pDCs y CD14+ HLA-DR revelaron una mayor frecuencia cuando los ganglios linfáticos estaban afectados; caso contrario en TT, donde la frecuencia de las subpoblaciones era prácticamente nula. No se reflejaron diferencias estadísticamente significativas. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

IgE+ FceRI-

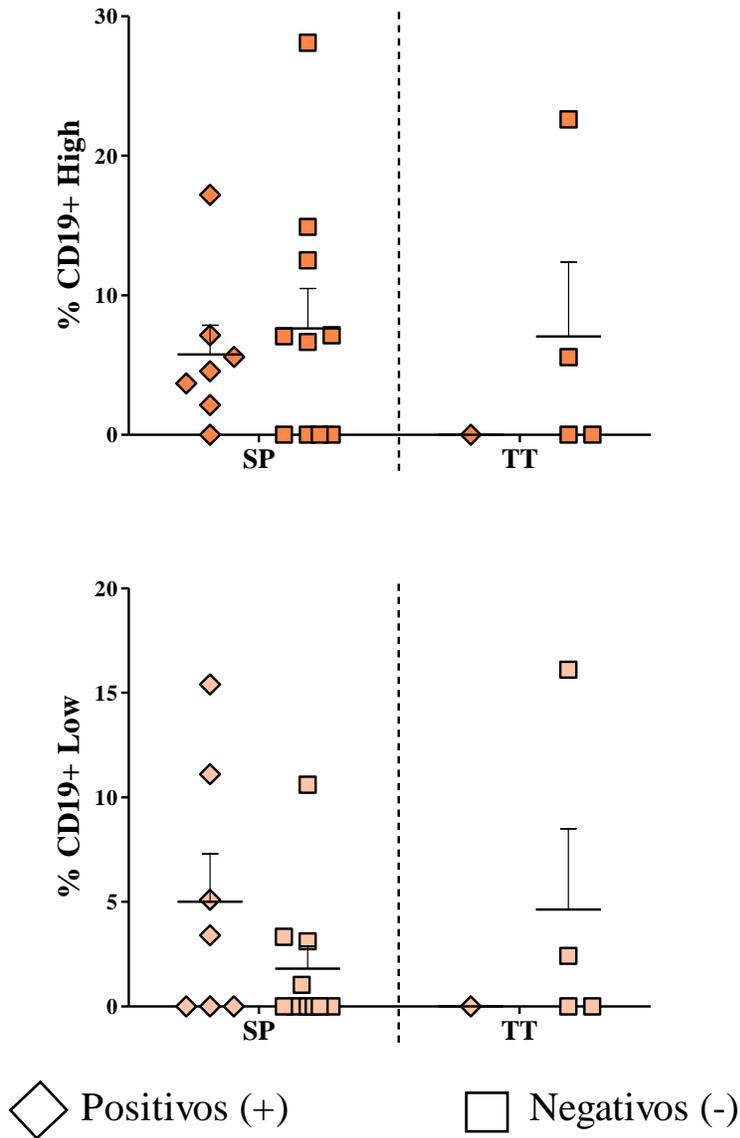


Figura 16. Correlación de la expresión de la IgE en las poblaciones de CD19+ con los ganglios afectados de las pacientes.

Comparación de la frecuencia de CD19+^{High} y CD19+^{Low} que expresan la IgE de membrana en correlación a la afección en ganglios linfáticos. En la sangre del paciente, la media de la frecuencia fue similar para ambos grupos. En el TT, se encontró una disminución en el grupo afectado. A pesar de que la distribución de los datos, el análisis estadístico no reflejó diferencias significativas. SC = Sangre control; SP = Sangre del paciente; TC = Tejido control; TT = Tejido tumoral.

Por último, la correlación de las poblaciones CD19+ con la afección de los ganglios axilares tampoco reveló diferencias significativas (*Figura 16*).

Se recalca la importancia de aumentar la cantidad de muestras, pues ante un número muy limitado no se pueden realizar análisis estadísticos de confianza y de igual manera los datos dejan de ser representativos.

DISCUSIÓN

El cáncer de mama ha representado una gran problemática en el sector salud, pues como ha sido mencionado anteriormente, su incidencia y mortalidad se ha visto incrementada (Cárdenas *et al.*, 2017).

La epidemiología de la enfermedad señala que la mayoría de los casos son diagnosticados entre los 35 a 80 años, lo cual fue similar en el presente trabajo, pues las pacientes se encontraban en ese intervalo de edad (Martín *et al.*, 2015). La clasificación molecular junto con la inmunohistoquímica indicó que la mayoría de los tumores de cáncer de mama pertenecen a receptores hormonales positivos (Luminal), seguidos de la sobreexpresión de HER-2 y por último a los triples negativos. Éstos últimos datos difirieron a las estadísticas de la población mexicana, pues se reconoce una mayor frecuencia por parte de los triples negativos en comparación a los que sobreexpresan HER-2 (Cárdenas *et al.*, 2017).

Anteriormente se ha visto que en personas con cáncer, las células sanguíneas se pueden ver afectadas de diversas maneras; siendo consecuencia de diversos factores, sin embargo, otros trabajos sólo abordan la investigación en cambios de la información genética o inclusive en el flujo sanguíneo (Sharma *et al.*, 2005; Mankoff *et al.*, 2019). Es importante recalcar que hasta ahora, no se han llevado a cabo investigaciones dirigidas a alteraciones de la concentración celular en la sangre en este tipo de neoplasias, por ello no se tiene una hipótesis a que pueda deberse esta disminución celular en las muestras de pacientes en contraste con los donadores.

Múltiples artículos mencionan que el tejido tumoral presenta varias células de la respuesta inmune, sin embargo, en términos de la concentración la información es prácticamente nula. Aun así, se confirma que la expresión fenotípica y cantidad de las células presentes en el microambiente del tumor de mama cambia según factores histopatológicos, moleculares e incluso clínicos (Arango & Rodríguez-Padilla, 2006).

Las muestras de tejido mamario sano no tuvieron una alta cantidad de células mononucleares, pues como se esperaba, no había razón de un infiltrado leucocitario, por ello la frecuencia fue pobre a comparación de las muestras de pacientes. Por otro lado, se denota una región perteneciente a granulocitos en las muestras SP, esto se debió a un cambio en la densidad tanto en eritrocitos como

de leucocitos, reflejando perfiles alterados en el gradiente de densidad. Esto pudo ser confirmado al evaluar las muestras SP a distintos tiempos, pues cuando las muestras eran procesadas un día posterior a su recolección, se presenciaban un aumento en restos celulares, eritrocitos y células granulocíticas; en cambio, cuando se procesaba al momento de su recolección, la muestra reflejaba en mayor medida células mononucleares (resultados no mostrados) (Lewis *et al.*, 1986; Franco *et al.*, 2013).

Al igual que Misharin y colaboradores (2013), la identificación de las subpoblaciones de células fue complicada debido a que los marcadores de superficie son expresados por diversos tipos celulares. Aun así, distintos artículos han utilizado un panel de anticuerpos similar al que se empleó en el presente trabajo (Sims *et al.*, 2005; Aspord *et al.*, 2007; Marimuthu *et al.*, 2018).

Las poblaciones HLA-DR⁺ LIN⁻ CD11c⁺ y HLA-DR⁺ LIN⁻ CD123⁺ correspondieron a las mDCs y pDCs respectivamente (Aspord *et al.*, 2007). Por otro lado, se encontraron dos poblaciones de Mo/Ma que diferían en la expresión de HLA-DR (Yuan *et al.*, 2011); sin embargo, se considera una posible contaminación por parte de alguna población de DCs CD14⁺ derivadas de Mo (Collin *et al.*, 2013). En el presente trabajo no fueron evaluados otros marcadores que pudieran establecer la diferencia entre estas poblaciones, por ende, sólo fueron denominadas como CD14⁺. En cuanto a las subpoblaciones de CD19, se sugiere que la población CD19^{High} corresponde a los linfocitos B y que las CD19^{Low} podrían ser células plasmáticas (Morbach *et al.*, 2010); sin embargo, para confirmar es necesario evaluar otras moléculas de membrana como CD20, CD27, CD28, CD138, IgM e IgD, pues esto aseguraría su linaje y se podría tener mayor precisión de su estado de madurez (Moren & García Merino, 2016).

Es normal pensar que el tejido tumoral presentaría una mayor frecuencia de leucocitos (CD45⁺) que el tejido sano. Pues es importante recordar que el microambiente tumoral es muy heterogéneo, y además de presentar antígenos que pueden ser detectados por el sistema inmune, se liberan distintas citocinas con actividad quimio atrayente responsables del reclutamiento de células leucocitarias (Gazzaniga, 2007).

Múltiples artículos han reportado que en individuos sanos, hay un mayor número de mDCs que pDCs (Tjomsland *et al.*, 2010; Vázquez *et al.*, 2012), lo cual no fue congruente con los resultados encontrados. Esto podría deberse a diferencias poblacionales o al número de muestras del cohorte que es pequeño.

El presente trabajo difirió con lo publicado por Tjomsland y colaboradores (2013), ya que ellos mencionaban un decremento por parte de las DCs en pacientes con cáncer en comparación con sus controles; esta diferencia podría deberse a que se estudiaron neoplasias diferentes. Por el contrario, otra publicación que trabajó cáncer de mama obtuvo resultados semejantes a los nuestros, donde la frecuencia de mDCs era menor en las muestras sanas (Paek *et al.*, 2019).

Se ha descrito una migración de las DCs de la sangre al tumor, lo cual está muy bien presentado en el trabajo, pues se ve una acumulación por parte de las subpoblaciones en TT; cabe destacar que este comportamiento se ha visto en diferentes neoplasias. Anteriormente se ha demostrado que tanto mDCs como pDCs son capaces de infiltrar el tumor, sin embargo, su localización dependerá de distintas propiedades (Tjomsland *et al.*, 2010; Karthaus *et al.*, 2012).

Diversos grupos de investigadores han centrado sus estudios en el papel que juega el subconjunto de células CD14+ HLA-DR^{-Low} en diferentes tipos de cáncer. Se ha revelado que respecto a su frecuencia en sangre periférica, esta población suele estar ligeramente más elevadas en pacientes en comparación con los controles sanos; de manera contraria a CD14+ HLA-DR⁺, donde se ha calculado que su frecuencia en pacientes y controles no muestra cambios (Yuan *et al.*, 2011; Chikamatsu *et al.*, 2012; Speigl *et al.*, 2018).

Al igual que Chikamatsu y colaboradores en el 2012, el porcentaje de células infiltrantes del tumor CD14+ HLA-DR⁺ y CD14 + HLA-DR⁻ fue mayor que la calculada en tejido sano, siendo esto posible por las diversas moléculas secretadas en el microambiente tumoral, incluidas las citocinas proinflamatorias, los factores angiogénicos y los factores quimio-atrayentes. Por ende, se confirma lo demostrado por Hoechst *et al.* (2008), en donde se señala que las células CD14+ HLA-DR⁻ aumentan tanto en la sangre del paciente como en el tumor.

En sangre periférica de individuos sanos, la frecuencia en CD19^{High} en comparación a CD19^{Low}, no mostró diferencia significativa, siendo similar a lo publicado por Lee *et al.* (2011); no obstante, cabe destacar que el panel de anticuerpos usado para diferenciar las poblaciones difirió en su mayor parte.

Se ha detectado la presencia de estas células tanto en sangre de paciente como en tejido canceroso (Wang *et al.*, 2012). En trabajos dirigidos al estudio del cáncer de mama, no se han reflejado diferencias al evaluar el número de CD19⁺ entre los pacientes y los controles en las muestras de

sangre periférica (Van der Pompe *et al.*, 1998). Sin embargo, se ha demostrado que en otro tipo de cáncer que la densidad de la población LB se ve incrementada dentro del tejido tumoral; cabe destacar que la identificación de estas células se hizo por medio de otros marcadores moleculares, incluyendo el CD20 (Woo *et al.*, 2014).

Como ha sido mencionado anteriormente, la IgE es la inmunoglobulina con menor concentración sérica; aun así, antecedentes señalan que este valor se ve incrementado en distintas enfermedades como resultado de la respuesta dirigida por linfocitos Th2. La respuesta Th2 predomina en distintas neoplasias, entre ellas el cáncer de mama (Domínguez-Santalla *et al.*, 2006; Kindt *et al.*, 2007; García-Romo *et al.*, 2017). Sin embargo, no existen datos acerca de la presencia de IgE en tumores, por lo que se resalta la importancia de haber encontrado la presencia de LB positivos para dicha inmunoglobulina en el tejido tumoral. Lo anterior sugiere que estas células pudieran estar produciendo y liberando IgE en el microambiente tumoral. Dicha suposición es congruente con el hallazgo observado en el presente estudio, en el que las células que presentaron la IgE unidad al receptor de alta afinidad (FcεRI) fueron CD14+HLA-DR+ y en menor frecuencia las pDCs y mDCs dentro del tejido tumoral.

Segura y colaboradores (2013) sugieren que la población que expresa en mayor medida el FcεRI debería pertenecer a DCs derivadas de Mo, pues artículos hacen alusión de la ausencia de dicho receptor en Ma (Murer *et al.*, 1994). Estas hipótesis no concuerdan con lo obtenido en el presente trabajo, ya que la mayor frecuencia de células con IgE+ FcεRI+ no perteneció a las principales subpoblaciones de DCs (mDCs y pDCs), sino a CD14+ HLA-DR+, lo cual podría relacionarse con un artículo que confirma la existencia del FcεRI en Ma (Untersmayr *et al.*, 2010). Anteriormente se consideraba a CD14 como un marcador de Mo/Ma, sin embargo, diversos trabajos han demostrado que existen subpoblaciones de DCs que expresan CD14+, por lo cual es posible que las células CD14+HLA-DR+ detectadas en nuestro trabajo pudieran pertenecer a alguna subpoblación de DCs y no necesariamente representar Ma. Para poder discernir dicho cuestionamiento será necesario que en futuros estudios se implemente un panel mayor de marcadores que permita identificar más claramente dicha población. En las expectativas del proyecto se consideraba que la población dominante podría estar en las mDCs, sin embargo, los resultados mostraron que dicha población aunque si está presente y es positiva para la IgE y el FcεRI en el tejido tumoral, no es la población dominante.

Se esperaría que la frecuencia de ambas poblaciones de CD19+ con IgE fueran superiores en muestras de pacientes debido a la respuesta Th2 que normalmente es predominante en el microambiente tumoral en el cáncer de mama (García-Romo *et al.*, 2017). A pesar de ello, en las muestras sanguíneas se ve una mayor frecuencia en los controles; siendo totalmente diferente a lo reportado por Horst *et al.* (2002), cuyo trabajo exponía una frecuencia parcialmente nula en las muestras sanguíneas de donantes, sin embargo, esto podría deberse a que su estudio se enfocó a enfermedades atópicas y no al cáncer. De manera contraria, hubo un mayor número de células en el tejido tumoral en comparación al tejido sano; lo cual podría justificarse por un mayor efecto a nivel regional dentro del microambiente tumoral (Arango & Rodríguez-Padilla, 2016)

La intensidad de IgE en CD19+^{High} fue similar a lo expresado en CD19+^{Low}, sin embargo, se esperaría un contraste más notorio, pues las primeras deberían presentar la inmunoglobulina de membrana como parte del BCR; de igual forma, hubiera sido más comprensible una menor expresión en CD19+^{Low}, pues si fueran células plasmáticas, la IgE no estaría expuesta en la superficie de la membrana, si no produciéndose intracelularmente (Horst *et al.*, 2002; Abbas *et al.*, 2010). Por lo tanto, el nivel de expresión de CD19 no es suficiente para definir el subtipo de LB positivos para IgE. De igual forma, se reconoce la importancia de medir si la IgE está unida a través de receptores Fc al LB para realmente estar seguros que se trata de IgE que forma parte del BCR. En el presente proyecto los LB IgE+ fueron seleccionados en la región de células negativas para FCεRI, pero no se tomó en cuenta a CD23 en el análisis, por lo cual se puede estar sobre estimando la proporción de linfocitos B con IgE como BCR.

Cómo ha sido mencionado anteriormente, hay diversos factores que han sido utilizados para determinar el pronóstico del cáncer de mama, entre ellos algunas características de las pacientes, así como métodos de estadificación y clasificaciones patológicas (Arango & Rodríguez-Padilla, 2016; Cárdenaz *et al.*, 2017). La correlación de los datos clínico-patológicos con la frecuencia de las poblaciones de APC no demostraron ninguna tendencia ni correlación, uno de los factores que podría estar influenciando esto podría deberse a la heterogeneidad de la enfermedad y el número de muestras analizadas (Chen & Mellman, 2013).

Con respecto a las subpoblaciones de DCs, se ha reportado que en sangre de personas sanas, la edad está relacionada con un cambio en el número de pDCs, población que se ve disminuida conforme avanza el tiempo; en cuanto a las mDCs, se hace mención que su frecuencia no se ve

alterada entre individuos de distintas edades. No obstante, se asegura un cambio en la frecuencia de dichas poblaciones ante la afección del estado de salud (Desai *et al.*, 2010).

Un trabajo dirigido al carcinoma pancreático no encontró diferencias estadísticamente significativas con la frecuencia de mDCs y pDCs respecto al grado histológico (Tjomsland *et al.*, 2010). De manera paralela, Paek y colaboradores en el 2019 tampoco revelaron diferencias con la frecuencia de dichas poblaciones al evaluar la invasión de los ganglios linfáticos y el estadio TNM; no obstante, en el mismo trabajo, estos autores demuestran que tanto las muestra con RE positivos y la sobreexpresión de HER-2 tienen niveles más altos de mDCs y pDCs respectivamente, lo cual no fue detectado en el presente trabajo. Sin embargo, podría relacionarse con un estudio que sugiere que las pDCs podrían predecir un pronóstico desfavorable (Karthaus *et al.*, 2012).

La población CD14+ HLA-DR+ tampoco demostró alguna asociación significativa con la edad, afección de los ganglios linfáticos, la sobreexpresión de HER-2 y la presencia de receptores hormonales, resultando ser análogo a lo reportado anteriormente por Fleng *et al.* (2011); los cuales, sólo revelaron diferencias significativas con respecto al tamaño del tumor y la estadificación patológica, demostrando que los pacientes en etapas tempranas presentan las tasas más altas de monocitos (CD14+ CD16+). Aunque esto fue contradictorio a lo obtenido en el presente trabajo, se sugieren que dicha población podría tener un papel importante en la tumorigénesis.

El porcentaje de CD14+ HLA-DR⁻ no señaló ninguna dependencia con las características clínico-patológicas, siendo similar a los resultados de Chikamatsu y colaboradores (2012), que a pesar de haber centrado sus estudios en otro tipo de carcinoma, la edad, el estadio del tumor y el grado histológico no fueron estadísticamente relevantes. De manera contraria, otros artículos aseguran un incremento de CD14+ HLA-DR^{-low} conforme progresan distintos tipos de carcinomas; pues se correlaciona positivamente con el tamaño del tumor, la clasificación TNM y la metástasis linfática (Willcox *et al.*, 2009; Arango & Rodríguez-Padilla, 2016; Chen *et al.*, 2017).

Se ha hecho mención de que el perfil de LB (CD19+) en personas sanas puede cambiar conforme avanza la edad, pues las células dentro de este linaje tienen distintos deberes (Quingtao *et al.*, 2019). Aún con lo anterior, no ha habido reportes que afirmen una diferencia significativa de la frecuencia de las subpoblaciones de CD19+ con la edad de las personas con algún tipo de neoplasia (Qi-Ming *et al.*, 2012).

Otros trabajos han mencionado que sólo detectaron diferencias significativas al correlacionar la frecuencia de CD19+ con algunas características clínico-patológicas de pacientes con cáncer, entre ellas la clasificación TNM y la afectación de ganglios linfáticos. Ni el grado histológico, ni el tamaño del tumor han resultado relevantes para afectar la frecuencia de CD19+ en la patogenia (Qi-Ming *et al.*, 2012; Mehdipour *et al.*, 2015).

Garaud y colaboradores (2019) reportan que la densidad de la infiltración de LB en tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama está altamente relacionada con los grados tumorales y la negatividad de receptores hormonales. Además, confirman un mayor número de LB en tejido canceroso en pacientes designados como triples negativos o en aquellos que sobreexpresan la proteína HER2. Estos resultados parecen contradecir a lo obtenido en el presente trabajo, pues no se identificaron diferencias significativas ante ninguna característica clínico-patológica.

Ante una búsqueda exhaustiva, no se encontraron trabajos cuyos reportes mencionen alguna correlación de la expresión tanto la de IgE como el FcεRI dependiente de características clínico-patológicas en pacientes con cáncer de mama. A pesar de ello, este tipo de análisis podría ser esencial para un mejor entendimiento de su papel en la enfermedad.

Se acredita que unas de las causas de no reflejar diferencias estadísticamente significativas en algunas de las correlaciones de la frecuencia de APC y la expresión de moléculas con los datos clínico-patológicos puede deberse al escaso número de muestras, pues no son suficientes para que el estudio sea representativo.

Desafortunadamente la obtención de muestras clínicas es complicada debido a que las pacientes candidatas a cirugía tienen tumores pequeños que limita la cantidad de tejido proporcionado para este estudio. Además de ello, la cantidad de células que se pueden obtener de dichas biopsias es muy escasa limitando el número de poblaciones a evaluar y el número de muestras con suficientes células para el análisis. En general, se obtuvieron un total de 22 muestras de sangre y tejido de pacientes con cáncer de mama, no obstante, cinco de esas muestras fueron descartadas, pues no hubo presencia de células mononucleares dentro del tejido, lo cual demuestra la dificultad de la manipulación de las muestras.

CONCLUSIONES

Es cierto que el cáncer de mama es una enfermedad frecuente en mujeres, representando gran parte del porcentaje de mortalidad. Por ello, es importante el estudio de distintas terapias para su tratamiento, siendo la inmunología una rama bastante prometedora.

El estudio realizado refleja diferencias entre las muestras de sangre y el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama en comparación a los controles.

Se distinguieron varias poblaciones celulares correspondientes a células presentadoras de antígeno, como mDCs (CD11c+), pDCs (CD123+), CD14+ HLA-DR+, CD14+ HLA-DR-, CD19+^{High} y CD19+^{Low} tanto en muestras de sangre periférica de pacientes como en el infiltrado tumoral.

Se detectó la presencia del receptor de alta afinidad para la IgE en las células presentadoras de antígeno en el tejido canceroso, aunque su existencia está más representada en muestras de sangre periférica. De igual manera, el receptor de alta afinidad es capaz de reconocer a la IgE, sugiriendo una posible participación de la IgE en el microambiente tumoral.

Las características clínico-patológicas no demostraron tener ninguna relación con la frecuencia de las células presentadoras de antígeno ni con la expresión de la IgE y su receptor de alta afinidad en las muestras de pacientes.

Se sugiere incrementar el número de muestras para obtener resultados más representativos; así mismo, es necesario añadir más marcadores de membrana para definir las poblaciones celulares por su inmunofenotipo.

Se recomienda seguir realizando estudios que impliquen a la IgE y su receptor de alta afinidad para determinar su participación en el cáncer de mama.

ABREVIATURAS

APC - Antigen-presenting cell; Células presentadoras de antígeno

BAG - Biopsia con aguja gruesa

BCR - B cell Receptor; Receptor de células B

CD - Cluster of differentiation: Cúmulo de diferenciación

DCs - Dendritics Cells: Células Dendríticas

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - Deoxyribonucleic Acid; Ácido Desoxirribonucleico

Fab - Fragment antigen binding; Fragmento de unión de antígeno

Fc - Fragment crystallizable; Fragmento cristalizable

FcR - Receptors for the Fc; Receptores para Fc

FcεRI - High-affinity IgE receptor; Receptor de Fc de la IgE tipo 1

FcεRII - low-affinity receptor for IgE; Receptor de Fc de la IgE tipo 2

FcεRs - IgE receptors; Receptores de Inmunoglobulina E

FES-Iztacala - Facultad de Estudios Superiores Iztacala

GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

Ig - Inmunoglobulina

IL - Interleucina

ITAM - Immunoreceptor tyrosine-based activation motif; motivo de activación inmunoreceptor basado en tirosina

LB - Linfocitos B

Ma - Macrófagos

MHC - Major Histocompatibility Complex; Complejo mayor de histocompatibilidad

mIg - Inmunoglobulina de membrana

Mo - Monocitos

NK - Linfocitos Natural Killer

PAAF - Punción-aspiración con aguja fina

PBS - Phosphate Buffered Saline; Buffer de fosfatos salinos

PD-1 - Programmed Death-1

RE - Receptores de Estrógeno

RP - Receptores de Progesterona

SC - Sangre Control

SP - Sangre del Paciente

TAA - Tumor-Associated Antigens; Antígenos Asociados a Tumores

TAM - Tumor-associated macrophage; Macrófagos asociados al tumor

T_C - Linfocitos T citotóxicos

TC - Tejido Control

TCR - T Cell Receptor; Receptor de Célula T

TGF - Transforming Growth Factor; Factor de Crecimiento Transformante

T_H - Linfocitos T cooperadores

Th1 - Linfocitos T cooperadores tipo 1

Th2 - Linfocitos T cooperadores tipo 2

TNF - Tumor necrosis factor; Factor de Necrosis Tumoral

TNM - Tumor, Nódulos Ganglionares, Metástasis

TSA - Tumor-Specific Antigens; Antígenos Específicos de Tumores

TT - Tejido Tumoral

ANEXO

1. Características de los anticuerpos

Nombre	Color	Marca	Clona
Anti-Human CD45	VioletFluor 450	TONBO Biosciences	HI30
Anti-Human IgE	APC	eBioscience	Ige21
Anti-Human CD19	PE-Cyanine7	TONBO Biosciences	HIB19
Anti-Human FcεRI	PE	eBioscience	AER-37(CRA1)
Anti-Human CD14	FITC	TONBO Biosciences	61D3
Anti-Human CD123	PE-Cyanine7	eBiosciences	6H6
Anti-Human CD11c	APC-Cyanine7	TONBO Biosciences	3.9
Anti-Human HLA-DR	PercP	BD Biosciences	L243

2. Elaboración de Reactivos

Colorante de Viabilidad

Es un colorante que reacciona con los grupos amino, ya sea en las proteínas en la superficie celular o en los complejos presentes intracelularmente que quedan expuestos ante membranas celulares comprometidas. Por ello es útil para discriminar células vivas o muertas.

Contenido: Ghost Dye™ Violet 510

Emisión: 510 nm

Marca: TONBO Biosciences

Tampón fosfato salino (PBS) 10x

Solución salina que ayuda a mantener un pH constante, además asemeja la osmolaridad y la concentración de iones del humano.

1 Litro (L) - 0.9% (w/v) cloruro de sodio a 10 mM buffer de fosfatos con pH 7.4

NaCl - 8.00 g

KCl - 0.20 g

Na₂HPO₄ - 1.44 g

KH₂PO₄ - 0.24 g

diH₂O - 800 mL

Ajustar pH 7.4 con HCl O NaOH y completar con diH₂O hasta 1L

Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.2 mM

Molécula que tiene actividad quelante de cationes divalentes de metales desarrollando una actividad inhibitoria sobre algunas enzimas dependientes de cationes metálicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtman, A. & Pillai, S. (2010). Cellular and Molecular Immunology. 6ª Ed. ELSEVIER. China.
- Abcam. (2019). B cells immunophenotyping. Recuperado de <https://www.abcam.com/primary-antibodies/b-cells-basic-immunophenotyping>
- Ahmed, Y. & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*, 7(5): 1016-1036.
- Arango, C. & Rodríguez-Padilla, C. (2016). Protagonismo del sistema inmune en el microambiente de los tumores malignos de la mama. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(2): 190-202.
- Arango, M. & González, A. (2002). Vacunas terapéuticas en cáncer: Ensayos clínicos actuales. *Revista Cubana de Medicina*, 41(6).
- Asociación Española Contra el Cáncer. Cáncer de mama. Madrid, España.
- Aspord, C., Pedroza-González, A., Gallegos, M., Tindle, S., Burton, E., Su, D., Marches, F., Banchereau, J. & Palucka, A. (2007). Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(5): 1037-1047.
- Baer, C., Miyamoto, M. & Denver, D. (2007). Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. *Nature Reviews Genetics*, 8(8), 619-631.
- Balin, S. & Cascalho, M. (2009). The rate of mutation of a single gene. *Nucleic Acids Research*, 38(5): 1575-1528.
- Barcellos-Hoff, M. & Akhust, R. (2009). Transforming growth factor- β in breast cancer: too much, too late. *Breast Cancer Research*, 11: 1-6.
- Barrera-Rodríguez, R. & Peralta-Zaragoza, O. (1995). Bases Moleculares de la inmunología del cancer. *Salud Pública de México*, 37(4): 344-353.
- Bianconi, E., Piovensan, A., Facchin, F., Beraudi, A., casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Chiara, M., Tassani, S., Piva, F., Perez-Amodio, S., Strippoli, P. & Canaider, S. An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Body*, 40(6); 463-471.
- Bombardieri, E., Bonadonna, G. & Gianni, L. (2010). *Breast Cancer Nuclear Medicine in Diagnosis and Therapeutic Options*. New York, Estados Unidos. Springer.
- British Society for Immunology. (2019). Macrophages. Recuperado de <https://www.immunology.org/public-information/bitesized->

immunology/células/macrophages#targetText=Macrophages&targetText=Macrophages%20are%20specialised%20cells%20involved,cytokines)%20that%20activate%20other%20cells.

- Cárdenas, J., Bargalló, J., Bautista, J., Cervantes, G., Valle-Solís, A., Flores, C., Maffuz, E., Pérez, V., Poitevin, A., Salas, E., Torrecillas, L. & Valero, V. (2017). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. 7° Revisión. Colima.
- Chen, D. & Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*, 38: 1-10.
- Chen, Y., Pan, G., Tian, D., Zhang, Y. & Li, T. (2017). Functional analysis of CD14+HLA-DR^{-low} myeloid-derived suppressor cells in patients with lung squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 14(1): 349-354.
- Chikamatsu, K., Sakakura, K., Toyoda, M., Takahashi, K., Yamamoto, T. & Masuyama, K. (2012). Immunosuppressive activity of CD14+ HLA-DR⁻ cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Science*, 103(6): 976-983.
- Collin, M. & Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 154(1): 3-20.
- Collin, M., McGovern, N. & Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 140; 22-30.
- Consejo de Salubridad General. (s/f). Diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama en segundo y tercer nivel de atención. Guía de Referencia Rápida. Guía de Práctica Clínica
- Daniels, T., Leutcher, R., Quintero, R., Helguera, G., Rodríguez, J., Martínez-Maza, O., Schultes, B., Nicodemus, C. & Penichet, M. (2012). Targeting HER2/neu with a fully human IgE to harness the allergic reaction against cancer cells. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 61: 991-1003.
- Debra, J., Spicer, J., Karagiannis, P., Gould, H. & Karagiannis, S. (2014). IgE immunotherapy. *mAbs*, 6(1): 54-72.
- Desai, A., Grolleau-Julius, A. & Yung, R. (2010). Leukocyte function in the aging immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, 87 (6): 1001-1009.
- Díaz, V., Peniche, A., Fierro, V. & Ponce, R. (2012). La inmunoterapia en el melanoma maligno: revisión. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 10(2): 123-138.
- Dolinak, D. & Matshes, E. (2003). *Medical Therapy of Breast Cancer*. Edimburgo, Reino Unido. Cambridge University.
- Domínguez-Santalla, M., Vidal, C., Viñuela, J., Pérez, L. & González-Quintela, A. (2006). Increased Serum IgE in Alcoholics: Relationship With Th1/Th2 Cytokine Production by Stimulated Blood Mononuclear Cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(8): 1198-1205.

- Duque, M. & Rojas, M. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*, 26(2): 73-86.
- Eisenbraun, M., Hawkes, G. & Carter, B. (2000). Structure of the γ -chain of the human IgE FcR1 receptor: NMR and molecular dynamics studies. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2: 1301-1307.
- El Mundo: Salud. (2006). Estadío, grado y pronóstico de un tumor. Recuperado de <https://www.elmundo.es/elmundosalud/2006/04/20/oncodudasypreguntas/1145554030.html>
- Fleng, A., Xhu, J., Yang, M., Neckenig, M., Wang, X., Shao, Q., Song, B., Yang, Q., Kong, B. & Qu, X. (2011). CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clinical & Experimental Immunology*, 164(1): 57-65.
- Franco, R., Puchulu-Campanella, M., Barber, L., Palascak, M., Joiner, C., Low, P. & Cohen, R. (2013). Changes in the properties of normal human red blood cells during in vivo aging. *American Journal of Hematology*, 88(1): 44-51.
- Garaud, S., Buisseret, L., Solinas, C., Gu-Trantien, C., De Wind, A., Van den Eynden, G., Naveaux, C., Lodewyckx, J., Boisson, A., Duvillier, H., Craciun, L., Ameye, L., Vays, I., Paesmans, M., Larsimont, D., Piccart-Gebhart, M. & Willard-Gallo, K. (2019). Tumor-infiltrating B cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. *JCI Insight*, 4(18): e129641.
- García, I. & García-Merino, A. (2016). Anti-CD20 monoclonal antibodies in multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 17(4): 359-371.
- García-Romo, G., García-Castillo, K., Díaz-Rodríguez, A., Reyes-Hernández, D. & Pedroza-González, A. (2017). Main immunoregulatory mechanisms that favor breast cancer development. *Gaceta Médica de México*, 153(7): 210-217.
- Gazzaniga, S. (2007). El papel del infiltrado inflamatorio en tumores: dos caras de una misma moneda. *Química Viva*, 6(1): 28-40.
- Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., Veys, I., Haibe-Kains, B., Singhal, S., Michiels, S., Rothé, F., Salgado, R., Duvillier, H., Ignatiadis, M., Desmedt, C., Bron, D., Larsimont, D., Piccart, M., Sotiriou, C. & Willard-Gallo, K. (2013) CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(7): 2873-2892.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674.

- Henle, A., Nassar, A., Puglisi-Knutson, D., Youssef, B. & Knutson, K. (2017). Downregulation of TAP1 and TAP2 in early stage breast cancer. *PLoS ONE*, 12(11): 1-12.
- Hoechst, B., Ormandy, L., Ballmaier, M., Lehner, K., Krüger, C., Manns, M., Greten, T. & Korangy, F. (2008). A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4 + CD25 + Foxp3 + T cells. *Gastroenterology*, 135: 234–43.
- Horst, A., Hunzelmann, N., Arce, S., Herber, M., Manz, R., Radbruch, A., Nischt, R., Schmitz, J. & Assenmacher, M. (2002). Detection and characterization of plasma cells in peripheral blood: correlation of IgE+ plasma cell frequency with IgE serum titre. *Clinical & Experimental Immunology*, 130(3): 370–378.
- Hunt, K., Robb, G., Strom, E., Ueno, N. & Mendelsohn, J. (2008). *Breast Cancer*. 2a Ed. Texas, Estados Unidos. M.D. Anderson cancer care series.
- Kikutani, H., Inui, S., Sato, R., Barsumian, E., Owaki, H., Yamasaki, K., Kaicho, T., Uchibayashi, N., Hardy, R., Hirano, T., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Suemura, M. & Kishimoto, T. (1986). Molecular Structure of Human Lymphocyte Receptor for Immunoglobulin E. *Cell*, 47: 657-665.
- Kindt, T., Goldsby, R. & Osborne, B. (2007). *Inmunología de Kuby*. 6ª. Ed. McGraw Hill. México.
- Knaul, F., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A. & Frenk, J. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México*, 51 (Suplemento 2): S335-S344.
- Krohn, M., Listins, M., Tjahnono, G., Raissauer, A., Peters, E., Klapp, B. & Rauchfuss, M. (2011). Depression, mood, stress, and Th1/Th2 immune balance in primary breast cancer patients undergoing classical massage therapy. *Support Care Cancer*, 19:1303–1311.
- LabCe. (2019). Monocyte Appearance. Recuperado de https://www.labce.com/spg538139_monocyte_appearance.aspx#targetText=Monocytes%20are%20the%20largest%20of,a%20%22ground%20glass%22%20appearance.
- Lage, A. (2011). El espacio de la biotecnología en el control del cáncer: oportunidades y desafíos en Cuba. *Revista Cubana de Salud Pública*, 37(Supl): 661-674.
- Lee, J., Noh, J., Noh, G., Choi, W. & Lee, S. (2011). IL-10 is Predominantly Produced by CD19(low)CD5(+) regulatory B Cell Subpopulation: Characterisation of CD19 high) and CD19(low) Subpopulations of CD5(+) B cells. *Yonsei Medication*, 52(5): 851-855.
- Lewin, B. (2008). *Genes IX*. 9ª Ed. McGraw Hill. México.
- Lewis, S., Van Epps, D. & Chenoweth, D. (1986). Density Changes in Leukocytes following Hemodialysis or Exposure to Chemotactic Factors. *American Journal of Nephrology*, 6: 34-41.
- Li, C., Uribe, D. & Daling, J. (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British Journal of Cancer*, 93: 1046-1052.

- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. 4a Ed. WH Freeman. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Lozada-Requena, I., Núñez, C., Álvarez, Y. & Aguilar, J. (2009). Efecto de un extracto hidroalcohólico de uncaria tomentosa (uña de gato) sobre la población de células dendríticas y sus moléculas HLA-DR y CD86 ante el estímulo con lipopolisacáridos. *La Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26(2): 168-74.
- Madjd, Z., Spendlove, I., Pinder, A., Ellis, I. & Durrant, L. (2005). Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 117: 248–255.
- Mahmoud, S., Paish, E., Powe, D., Macmillan, D., Grainge, M., Lee, A., Ellis, I. & Green, A. (2011). Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *Journal Of Clinical Oncology*, 29(15): 1949-1955.
- Mankoff, C., Dunnwald, L., Gralow, J., Ellis, G., Schubert, B., Tseng, J., Lawton, T., Linden, H. & Livingston, R. (2019). Changes in Blood Flow and Metabolism in Locally Advanced Breast Cancer Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. *Journal of Nuclear Medicine*, 44(11): 1806-1814.
- Marimuthu, R., Francis, H., Dervish, S., Li, S.C., Medbury, H. & Williams, H. (2018). Characterization of Human Monocyte Subsets by Whole Blood Flow Cytometry Analysis. *Journal of Visualized Experiments*, (140): e57941.
- Martín, M., Herrero, A. & Echavarría, I. (2015). El Cáncer de Mama. *ARBOR Ciencia, Pensamiento y Cultura*, 191(773). 1-7.
- Mehdipur, F., azmkhah, M., Hosseini, A., Bagheri, M., Safaei, A., Talei, A. & Ghaderi, A. (2015). Increased B Regulatory Phenotype in Non-Metastatic Lymph Nodes of Node-Positive Breast Cancer Patients. *Scandinavian Journal of Immunology*, 83(3): 195-202.
- Misharin, A., Morales-Nebreda, L., Mutli, G., Budinger, G. & Perlman, H. (2013). Flow Cytometric Analysis of Macrophages and Dendritic Cell Subsets in the Mouse Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(4), 503-510.
- Mitchell, D. & Nair, S. (2000). RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *The Journal of Clinical Investigation: Nucleic acid therapeutics*, 106(9): 1065-1069.
- Morbach, H., Eichhorn, E., Liese, J. & Girschick, H. (2010). Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clinical & Experimental Immunology*, 162(2): 271-279.
- Motz, G. T., & Coukos, G. (2013). Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. *Immunity*, 39(1): 61–73.

- Murer, D., Fiebiger, E., Reininger, B., Wolff-Winiski, B., Jouvin, M., Kilgus, O., Kinet, P. & Sting, G. (1994). Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. *Journal of Experimental Medicine*, 179(2):745–750.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2008). *Inmunobiología de Janeway*. McGrawHill. México.
- Osbrone, C., Bardou, V., Hopp, T., Chamness, G., Fuqua, S., Wong, J., Allred, D., Clark, G. & Schiff, R. (2003). Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95:353-361.
- Paek, S., Kim, H., Lee, J., Woo J., Kwon, H., Kim, J., Lim, W., Kim, J., Moon, B. & Paik, N. (2019). Circulating Plasmacytoid and Myeloid Dendritic Cells in Breast Cancer Patients: A Pilot Study. *Journal of Breast Cancer*, 22(1): 29-37.
- Pedroza-Gonzalez, A., Xu, K., Wu, T., Aspor, C., Tindle, S., Marches, F., Gallegos, M., Burton, E., Savino, D., Hori, T., Tanaka, Y., Zurawski, S., Zurawski, G., Bover, L., Liu, Y., Banchereau, J. & Palucka, A. (2011). Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 208 (3): 479-90.
- Qi-Ming, Y., Chuan-Ding, Y. & Zhi-Qiang, L. (2012). Elevated Circulating CD19+ Lymphocytes Predict Survival Advantage in Patients with Gastric Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13: 2219-2224.
- R&D Systems. (2019). Monocyte Markers. Recuperado de <https://www.rndsystems.com/research-area/monocyte-markers#targetText=Monocyte%20Markers,cells%20in%20the%20bone%20marrow.&targetText=Human%20monocytes%20that%20are%20CD14,cells%20are%20non%2Dclassical%20monocytes>.
- Rao, X., Zhong, J. & Sun, Q. (2014). The heterogenic properties of monocytes/macrophages and neutrophils in inflammatory response in diabetes. *Life Sciences*, 116(2): 59-66.
- Romero-Urtilla, A., Osuna-Ramos, J., Candanedo-González, F., Ramírez, M. & Peñuelas, J. (2015). Cáncer de Mama: Entidad Patológica de Biología Heterogénea. *Archivos de Salud de Sinaloa*, 8(3): 109-116.
- Salazar, F. (2000). El sistema inmune, herramienta estratégica en la batalla contra el cáncer. *Revista chilena de pediatría*, 71(4): 296-306.
- Salazar-Onfray, F., López, M. & Mendoza-Naranjo, A. (2007). Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *ELSEVIER Cytokine & Growth Factor Reviews*, 18: 171–182.
- Sallman, E., Reininger, B., Brandt, S., Duschek, N., Hofehner, E., Garner-Spitzer, E., Platzer, B., Dehlink, E., Hammer, M., Holcman, M., Oettgen, H., Wiedermann, U., Sibilila, M., Fiebiger, E.,

- Rot, E. & Maurer, D. (2011). High-Affinity IgE Receptors on Dendritic Cells Exacerbate Th2-Dependent Inflammation. *Journal of Immunology*, 187: 164-171.
- Sharma, P., Sahni, N., Tibshirani, R., Skaane, P., Urdal, P., Berghagen, H., Jensen, M., Kristiansen, L., Moen, C., Sharma, P., Zaka, A., Arnes, J., Sauer, T., Akslen, L., Schlichting, E., Borresen-Dale, A. & Lönneborg, A. (2005). Early detection of breast cancer based on gene expression patterns in peripheral blood cells. *Breast Cancer Research*, 7(R634).
 - Shin, J. & Greer, A. (2015). The role of FcεRI expressed in dendritic cells and monocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(12): 2349-2360.
 - Sims, G., Ettinger, R., Shirota, Y., Yaboro, C., Illei, G. & Lipsky, P. (2005). Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*, 105(11): 4390-4389.
 - Tjomsland, V., Sandström, P., Spångeus, A. Messmer, D., Emilsson, J, Falkmer, U., Falkmer, A., Magnusson, K., Borch, K. & Larsson, M. (2010). Pancreatic adenocarcinoma exerts systemic effects on the peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells: an indicator of disease severity?. *BMC Cancer* 10(87):
 - Topalian, S., Drake, C. & Pardoll, D. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current Opinion in Immunology*, 24(2) :207-212.
 - Turner, H. & Kinet, J. (1999). Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεRI. *Nature*, 402: B24-B30.
 - Untersmayr, E., Bises, G., Starkl, P., Bevins, C., Scheiner, O., Boltz-Nitulescu, G., Wurba, F. & Jensen, Jarolim, E. (2010). The High Affinity IgE Receptor FcεRI Is Expressed by Human Intestinal Epithelial Cells. *PLOS One*, 5(2): e9023.
 - Valdivia-Silva, J. & Garcia-Zepeda, E. (2008). Importance of the tumor microenvironment in Breast Cancer progression. *ECIPeru: Revista del Encuentro Científico Internacional*, 5(2):1-7.
 - Van dr Pompe, G., Antoni, M., Visse, A. & Heijnen, C. (1998). Effect of mild acute stress on immune cell distribution and natural killer cell activity in breast cancer patients. *Biological Psychology*, 48(1): 21-35.
 - Vázquez, M., Sureda, M. & Rebollo, J. (2012). Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología*, 31(1): 21-30.
 - Verdú, J., Algara, M., Foro, P., Domínguez, M. & Blanch, A. (2002). Atención a los efectos secundarios de la radioterapia. *Revista De Medicina Familiar y Comunitaria*, 12(7): 426-435.
 - Wang, K., Wi, G. & Liu, D. (2012). C D19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental Hematology & Oncology*, 1(36).
 - Weigelt, B. & Reis-Filho, J. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy?. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6: 718–730.

- Wilcox, R., Nevala, W., Thompson, M., Witzig, T., Ansell, S. & Markovic, S. (2009). CD14+ HLA-DR⁻/Lo Myeloid-Derived Suppressor Cells Express Immunosuppressive B7-H Family Members and Are Depleted Following Taxane-Based Chemotherapy in Melanoma. *Blood*, 144(22): 464.
- Woo, j., Liss, m., Muldong, M., Palazzi, K., Strasner, A., Ammiranye, M., Varki, N., Shabaik, A., Howell, S., Kane, C., Karin, M. & Jamieson, C. (2014). Tumor infiltrating B-cells are increased in prostate cancer tissue. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 30.
- World Health Organization. (2018). Cancer: Breast Cancer. Recuperado de <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>
- Yuan, K., Zhao, X., Xia, Y., Zhu, X. & Xiao, P. (2011). Increased circulating immunosuppressive CD14(+) HLA-DR⁻/low cells correlate with clinical cancer stage and pathological grade in patients with bladder carcinoma. *Journal of International medical research*, 39(4):1381-1391.