



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**EFFECTOS DEL YODO  
MOLECULAR/QUIMIOTERAPIA EN EL  
COMPONENTE INMUNE DEL MICROAMBIENTE  
TUMORAL EN CÁNCER DE MAMA**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR AL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
M. Sc. OLGA CUENCA MICÓ**

**DIRECTORA DE TESIS  
DRA. CARMEN ACEVES VELASCO  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR  
DRA. ALEJANDRA EUGENIA MEDINA RIVERA  
LIIGH-UNAM  
DR. FELIPE VACA PANIAGUA  
FES-IZTACALA**

**QUERÉTARO, JULIO 2022**



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.

## RESUMEN

El microambiente tumoral (por sus siglas en inglés: TME) es necesario y determinante para la progresión tumoral así como en la efectividad global de los tratamientos contra el cáncer. Dentro de los componentes del TME se encuentran células del sistema inmune, las cuales se han establecido como marcadores de pronóstico, lo que muestra que el sistema inmune es un componente activo en la enfermedad. Su estudio ha generado gran cantidad de aproximaciones terapéuticas que apuntan a células inmunes del TME en diferentes tipos de cáncer (inmunoterapia), entre ellos el de mama. Por otro lado, se conoce desde hace más de dos décadas los efectos antiproliferativos y antineoplásicos del yodo en cáncer de mama. El tratamiento con yodo, de manera exclusiva o como coadyuvante junto con tratamiento convencional de quimioterapia en pacientes con cáncer de mama, muestra una disminución del tamaño del tumor así como de su capacidad invasiva. Los datos de expresión de estos tumores revelan un efecto significativo variable del suplemento con yodo en genes inmunológicos en general. Estos cambios en la expresión génica en las células inmunes ante la estimulación antigénica están regulados por mecanismos epigenéticos (que controlan la transcripción). Dentro de estos mecanismos se encuentra la metilación del DNA, implicada en el compromiso de las células del sistema inmune a fenotipos diferenciados. Este estudio analiza cómo la suplementación con yodo molecular en pacientes con cáncer de mama estimula la reactivación de la respuesta inmune antitumoral, cómo esta activación mejora la respuesta a tratamientos quimioterapéuticos y cómo eventos epigenéticos podrían estar detrás del cambio de fenotipo inmune del microambiente tumoral. Se observó un aumento en la firma génica de la respuesta inmune antitumoral asociada a la suplementación de yodo, que correlaciona con la expresión de marcadores de activación inmune (tanto RNA como proteína). Los estudios exploratorios de cambios en la metilación de promotores de interferon gama (marcador de buen pronóstico en cáncer de mama) y del factor de crecimiento transformador beta (marcador de progresión tumoral en cáncer de mama), confirman los niveles de expresión génica encontrados en estos marcadores de y pudieran indicar efectos epigenéticos como parte de los mecanismos del yodo molecular

## ABSTRACT

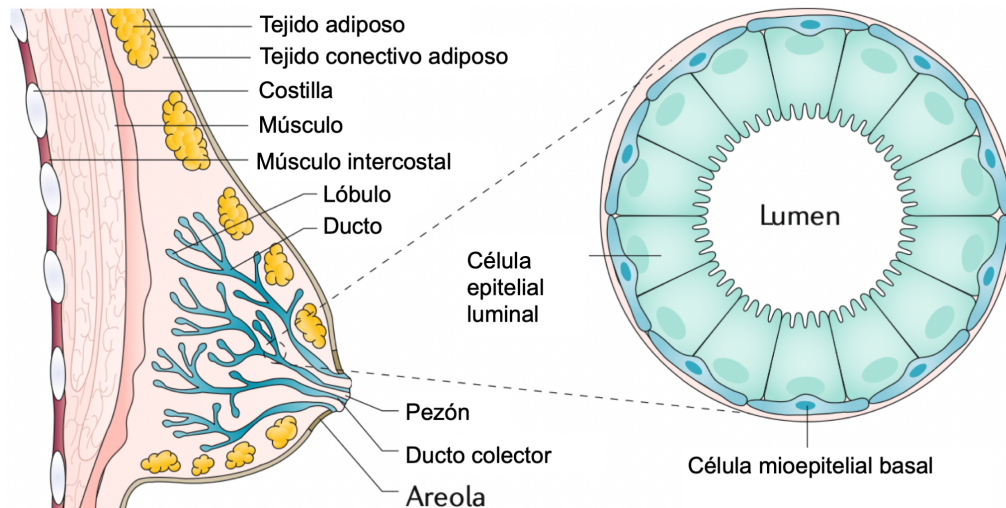
The tumor microenvironment (TME) is necessary and decisive for tumor progression as well as the overall effectiveness of cancer treatments. Within the components of the TME are cells of the immune system, which have been established as prognostic markers, which shows that the immune system is an active component in the disease. His study has generated a large number of therapeutic approaches that target immune cells of the TME in different types of cancer (immunotherapy), including breast cancer. On the other hand, the antiproliferative and antineoplastic effects of iodine in breast cancer have been known for more than two decades. Treatment with iodine, exclusively or as an adjuvant together with conventional chemotherapy treatment in patients with breast cancer, shows a decrease in tumor size as well as its invasive capacity. Expression data from these tumors reveal a variable significant effect of iodine supplementation on immune genes in general. These changes in gene expression in immune cells upon antigenic stimulation are regulated by epigenetic mechanisms (which control transcription). One of these mechanisms is DNA methylation, which is involved in the commitment of immune system cells to differentiated phenotypes. This study analyzes how molecular iodine supplementation in patients with breast cancer stimulates the reactivation of the antitumor immune response, how this activation improves the response to chemotherapy treatments and how epigenetic events could be behind the change in the immune phenotype of the tumor microenvironment. An increase in the gene signature of the antitumor immune response associated with iodine supplementation was observed, which correlates with the expression of immune activation markers (both RNA and protein). The exploratory studies of changes in the methylation of promoters of gamma interferon (marker of good prognosis in breast cancer) and transforming growth factor beta (marker of tumor progression in breast cancer), confirm the levels of gene expression found in these markers of y could indicate epigenetic effects as part of the mechanisms of molecular iodine.



## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Glándula mamaria normal

La glándula mamaria es una glándula exocrina representativa de los mamíferos, forma parte del aparato reproductor femenino y mediante la producción de leche, nutre y protege en sus primeras etapas a los neonatos. Está constituida por dos componentes: el parénquima (representado por el epitelio secretor y por el sistema de conductos) y el estroma (constituido por tejido adiposo, tejido conjuntivo, vasculatura sanguínea y linfática, así como aferencias nerviosas que participan en la evacuación láctea). El desarrollo del tejido mamario es multi-etapas; en su fase embrionaria se mantiene quiescente. En la pubertad, se presenta un crecimiento ductal y epitelial primordial bajo la inducción de hormonas sexuales, pero no es sino hasta el embarazo y la posterior lactancia, que se diferencia completamente formando estructuras alveolares y transformándose en un órgano lacto-secretor. El cese de estimulación-succión por parte del neonato genera una involución del tejido lacto-secretor que puede volver a iniciar el ciclo de expansión y regresión durante posteriores embarazos en la vida reproductiva de la mujer. Su función concluye al entrar a un estado de involución en la etapa postmenopáusica. La glándula mamaria humana normal se conforma por un sistema ductal-lobulillar ramificado. Estos lóbulos se organizan en 15 a 20 lobulillos que drenan mediante conductos colectores que convergen en el pezón dispuestos de manera radial. Cada lobulillo lo forman acinos (también llamados alvéolos) que son las unidades secretoras funcionales de la glándula mamaria. Los acinos y los conductos tienen un lumen central y están revestidos por dos capas de células, una capa interna de células epiteliales luminales polarizadas y una capa externa de células mioepiteliales. Rodeando esta estructura hay una membrana basal (MB) que separa el epitelio del estroma (**Figura 1.1.1**).



**Figura 1.1.1:** Estructura de la glándula mamaria humana. A la derecha se observa la ampliación de un ducto mamario junto con las células que lo componen. Modificado de (Harbeck, 2020).

## 1.2 Cáncer mamario

El cáncer de mama presenta una alta incidencia a nivel mundial, especialmente en mujeres. En el 2018, aproximadamente 2,1 millones de mujeres fueron diagnosticadas de cáncer de mama; además, fallecieron alrededor de 600.000 mujeres debido a esta patología a nivel mundial. La incidencia mundial de este cáncer muestra aumentos anuales del 3,1 %, comenzando con 641 000 casos en 1980 y aumentando a más de 1,6 millones en 2010 (Bray et al., 2015). De hecho, la carga mundial de cáncer en las mujeres está aumentando en los países, independientemente del nivel de ingresos, debido al crecimiento de la población y al envejecimiento de la población. La población femenina representa el 49,5% de la población mundial, y constituyen una mayor proporción de la población >60 años (Harbeck et al., 2019).

En general, los carcinomas se caracterizan por la pérdida de la polaridad epitelial y de la organización tisular. Las células cancerosas que permanecen dentro del sistema ductal-lobulillar mamario se clasifican como carcinomas in situ benignos. Una vez que las células neoplásicas rompen la MB e invaden el estroma adyacente, el tumor se vuelve maligno (Weigelt & Bissell, 2008). En la figura 1.2.1

se observan las características tisulares de los subtipos histológicos del cáncer de mama según sean pre-invasivos o invasivos (imagen modificada de *Blamb / Shutterstock*)

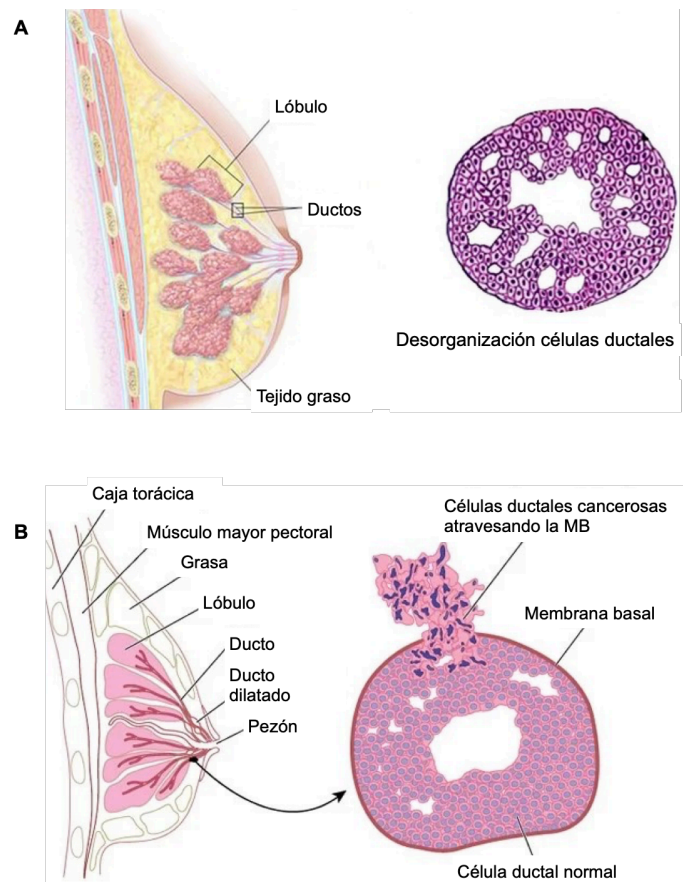


Figura 1.2.1: **A:** Carcinoma pre-invasivo ductal (*in situ*); **B:** Carcinoma invasivo ductal. Modificado de <https://www.shutterstock.com/es/g/blamb?searchterm=mammary+gland&sort=popular>

Actualmente, la práctica clínica suele utilizar una clasificación de cinco subtipos sobre la base de características histológicas y moleculares: Basales; Tumores con expresión de HER2; Tumores que expresan receptor de estrógenos y/o receptor de progesterona (ER+ y/o PR+) y, los tumores que no expresan ER, PR o HER2 de denominan triple negativo (TNBC por sus siglas en inglés) En la **Figura 1.2.2** se esquematizan las principales características de estos subtipos.

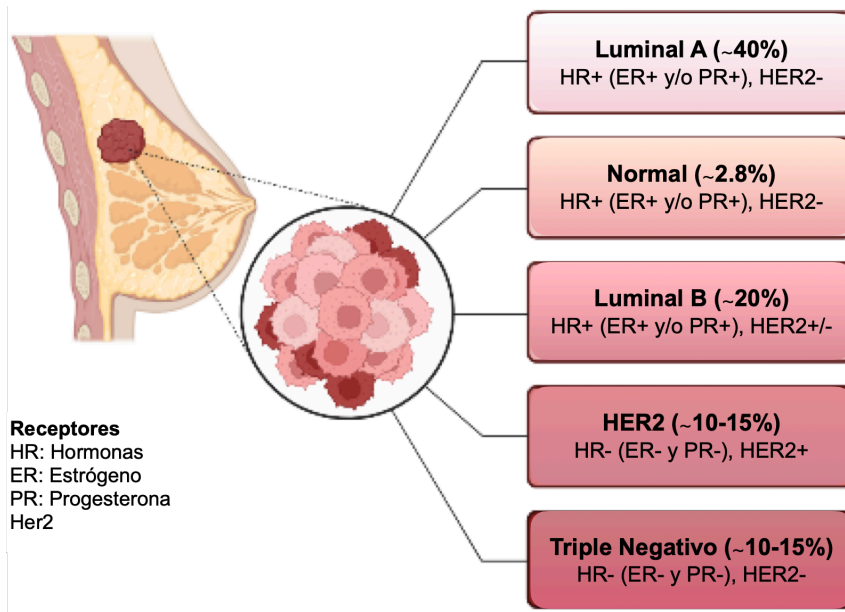


Figura 1.2.2: Subtipos histológicos de cáncer de mama. En la figura se define el patrón de expresión de receptores de cada subtipo así como el porcentaje de incidencia en población mundial. De arriba a abajo según su probabilidad de mejor pronóstico. Modificado de (Wawruszak et al., 2021).

A pesar de la creencia general, el cáncer de mama hereditario o relacionado con historial familiar representa sólo un 10% de los casos de cáncer a nivel mundial. El resto de factores de riesgo abarcan un amplio rango, siendo desde demográficos, hormonales o reproductivos, hasta relacionados con el estilo de vida y la polución (Momenimovahed & Salehiniya, 2019). En la **Figura 1.2.3** se resumen los principales factores de riesgo. (Imagen modificada de <https://www.lalpathlabs.com/blog/breast-cancer-signs-and-symptoms/print-25/>)

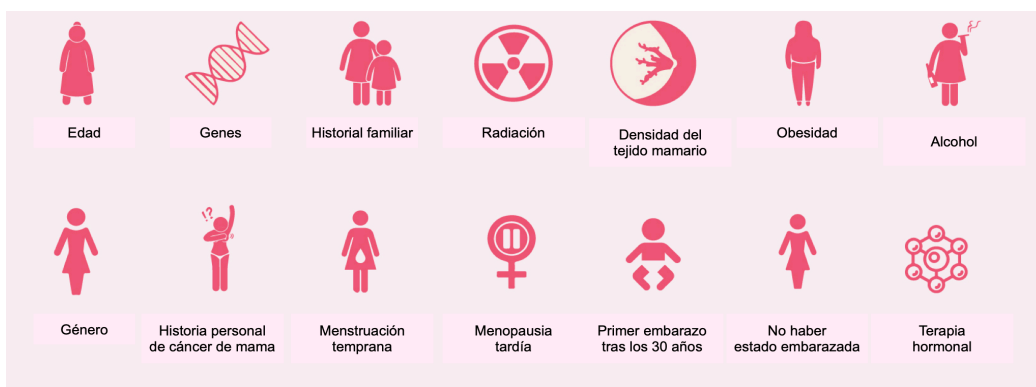
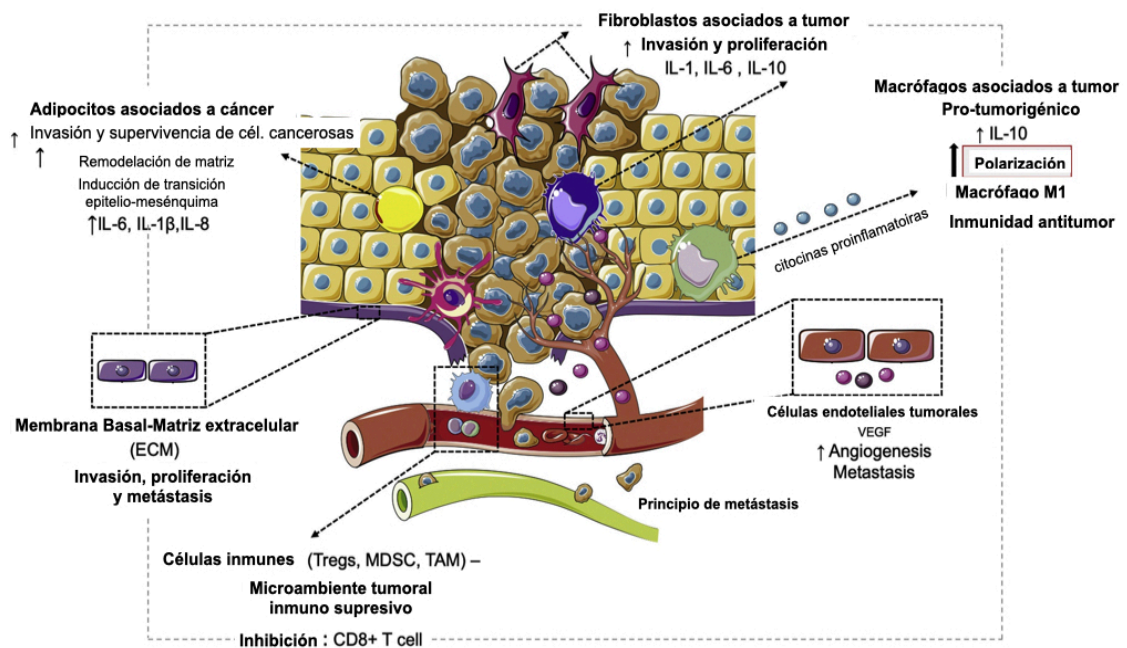


Figura 1.2.3: Principales factores de riesgo del cáncer de mama.

### 1.3 Microambiente tumoral

El microambiente tumoral (TME) es un entorno complejo y dinámico que representa todos los componentes del tumor que no sean células cancerosas. Incluyendo: células inmunes (como macrófagos tipo M2 (sin capacidad de presentar antígeno) y las células supresoras derivadas mieloides (MDSC por sus siglas en inglés), fibroblastos asociados a tumor, células endoteliales asociadas a tumor y más (**Figura 1.3.1**). Pero además de distintos tipos celulares, existen factores solubles que son parte de este microambiente como: citocinas, factores angiogénicos, entre otros. Estos estimulan de forma autocrina o paracrina sus correspondientes receptores influyendo en el proceso de malignidad del cáncer (Kenny et al., 2007). Las células tumorales están en interacción bilateral constante con los componentes del (TME) (Bissell & Radisky, 2001), siendo estas las que proveen el estímulo inicial crítico para su establecimiento (Kalinski & Talmadge, 2017).

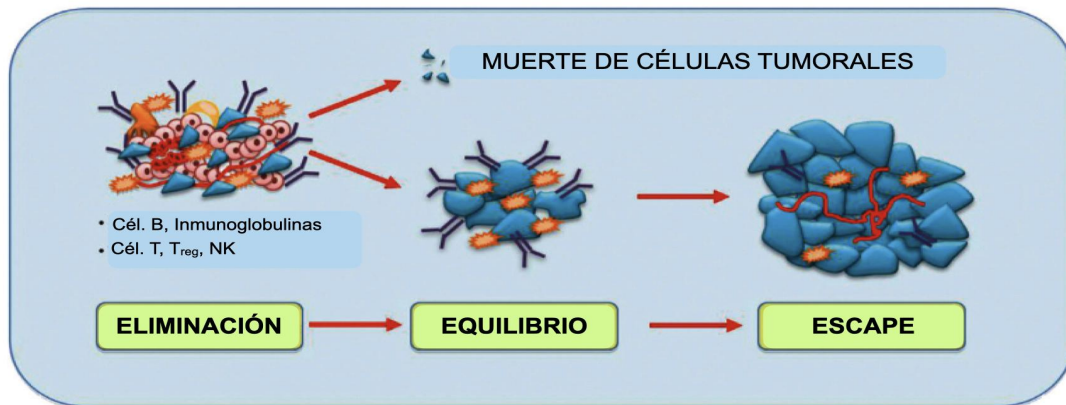


**Figura 1.3.1:** Esquema de los distintos componentes del microambiente tumoral (TME por sus siglas en inglés). La figura indica cada componente y sus efectos sobre el establecimiento o progresión tumoral. Las flechas hacia arriba indican un aumento del efecto y las flechas hacia abajo una disminución de efecto del componente del TME. (IL: interleucinas, VEGF: Factor de crecimiento epitelial-vascular, Tregs: Linfocitos T CD4+ reguladores; MDSC: Células supresoras derivadas mieloides; TAM: Macrófagos asociados a tumor. (Modificado de Franco et al. 2020).

#### 1.4 Función inmune en el contexto tumoral

La relación entre sistema inmune y cáncer comenzó a describirse desde 1863, cuando Rudolf Virchow refiere leucocitos embebidos en tejidos neoplásicos. Desde entonces, infinidad de proyectos han centrado su interés en el estudio del sistema inmune asociado a tumor, como elemento necesario para el establecimiento y la progresión del cáncer (Coussens & Werb, 2002); (Lesterhuis et al., 2011).

El concepto de vigilancia inmunológica se describió por primera vez en 1963 por Burnet (Burnet, n.d.) e implica el reconocimiento y destrucción de células transformadas tempranas por parte del sistema inmune. Estudios posteriores mostraron una inmunoedición del sistema inmune en cáncer. La inmunoedición del cáncer es un proceso dinámico compuesto por tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Dunn et al., 2004). Las fases: eliminación, equilibrio y escape (Schreiber et al., 2011), se ven esquematizadas en la **Figura 1.4.1** La fase de eliminación representa el concepto clásico de inmunovigilancia del cáncer; donde, tanto elementos del sistema inmune innato como los del adaptativo, trabajan en conjunto para destruir tumores en desarrollo antes de que den manifestación clínica. Las células tumorales no destruidas en esta fase pasan a la fase de equilibrio, que es el período de latencia inmunomediada después de la destrucción incompleta del tumor en la fase de eliminación. Es en esta etapa donde, por presión selectiva del sistema inmune, se facilita la supervivencia de variantes de células transformadas que han perdido los antígenos (Ag) de moléculas de histocompatibilidad tipo I (MHC I) y de tipo II (MHC II) y que presentan menor cantidad de Ag tumorales (Kim et al., 2007). En la última fase, el escape, se refiere al crecimiento final de los tumores que han superado las restricciones inmunológicas de la fase de equilibrio. (Dunn et al., 2002).



**Figura 1.4.1:** Esquema de las fases de la inmunoedición. Modificado de (Gelao et al., 2013). Detalla los pies de figura

Las células cancerosas presentan diversos mecanismos moleculares para contrarrestar la respuesta inmune citotóxica del organismo (Biragyn & Longo, 2012). Aunque el cáncer puede escapar de las células inmunitarias efectoras utilizando numerosos mecanismos, la gran cantidad de hallazgos recientes indican que también recibe ayuda del propio sistema inmunitario, en particular el componente del sistema diseñado para prevenir o controlar la inducción de respuestas autoinmunes dañinas. Este aumento inmunitario de la progresión del cáncer implica el reclutamiento y la activación de varias células inmunitarias, lo que puede ocurrir tan pronto como en la etapa de lesiones preinvasivas (Clark et al, 2007).

Entre algunas de las estrategias de las células tumorales para evitar su destrucción por parte del sistema inmune, se encuentran:

- . La interferencia en la presentación de antígenos a células T vírgenes.
- . Disminución de la expresión de moléculas MHC para que los linfocitos T no las detecten como células aberrantes.
- . Síntesis de factores que eliminan o paralizan la respuesta específica de las células T.
- . Síntesis de factores que polarizan y reclutan células inmunotolerantes del tipo M2, Th2...
- . Reclutamiento de T reguladoras y células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSCs) que presentan funciones promotoras de tumor.

Pero además, el reclutamiento de células inmunes que promueven la actividad del tumor (como macrófagos M2, linfocitos Th2, células cel



sistema inmune innato como Neutrófilos de tipo 2, células dendríticas tipo 2 o MDSC) muestra la necesidad de cierto microambiente inmune para la progresión cancerosa. Un TME inmune citotóxico es determinante para la inhibición de la progresión tumoral así como en la efectividad global de los tratamientos contra el cáncer (Binnewies et al., 2018). La eficacia de las terapias inmunes así como de la quimioterapia y radioterapia depende de la cantidad y fenotipo de los linfocitos T infiltrados en tumor (TILs) (Kalinski & Talmadge, 2017). Los TILs contravienen de la visión canónica de que las células T activadas atraviesan rápidamente estados transicionales hacia unos pocos estados discretos estables T predominantes. Lo que realmente se observa es un continuo de estados entre dos extremos: Th1 (fenotipo antitumoral) y Th2 (fenotipo protumoral) (Azizi et al., 2018). Los linfocitos T pueden alojarse en los nódulos linfáticos drenantes del tumor y darán lugar a linfocitos citotóxicos diferenciados, lo que puede ocurrir en la sangre, tejidos, órganos linfoides o tumores (D. S. Chen & Mellman, 2017). Una vez en el tumor, las células inmunes activadas se someten a una expansión clónica. El trabajo del grupo de Azizi analizó, mediante secuenciación de single-cell de RNA de células CD45+, los diferentes fenotipos de tumores de mama, observando que no existe una subpoblación específica de linfocitos T en glándula mamaria sana sino que el tejido mamario normal contiene una gama de subpoblaciones incluyendo también aquellas observadas en tumores.

Existe una clasificación de tumores en relación con la cantidad de linfocitos T citotóxicos (CTLs) infiltrados: tumores “calientes” y “fríos”. Los tumores “calientes” se caracterizan por una alta infiltración de CTLs que expresan la proteína de muerte programada PD-1. Son altamente inmunogénicos y presentan respuestas Th1 y niveles elevados de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Por su parte los tumores “fríos” presentan amplia infiltración de células inmunes en la periferia del tumor pero pocos CTLs en el interior (Binnewies et al., 2018). En cáncer, ni el tumor ni el TME son estáticos.

En la actualidad, la infiltración de algunos subtipos celulares inmunes en diferentes cánceres son considerados marcadores de pronóstico (Bingle et al., 2002). Desglosando los diferentes tipos celulares junto con sus productos solubles podemos hablar de:



- . Macrófagos
- . Linfocitos T reguladores (Treg).
- . Células supresoras derivadas mieloides (MDSC)
- . Células dendríticas (DCs)
- . Linfocitos T cooperadores (Th)
- . Linfocitos T citotóxicos (CTLs)

Los **macrófagos** asociados a tumor (TAMs) llegan como monocitos desde el torrente sanguíneo atraídos por la quimiocina CCL2 secretada por las células tumorales y se diferencian según el entorno hacia un fenotipo antitumoral (M1) o protumoral (M2) en un continuo de estados análogos a los de los linfocitos Th (Lin et al., 2019) (Q. Liu et al., 2020). Los fenotipos del tipo M2 se inducen en respuesta al factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF), interleucinas 4, 10 y 13 (IL-4, IL-10 e IL-13), corticosteroides y prostaglandinas (PGs) y producen IL-10, prostaglandina E2 (PGE2), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y factor de crecimiento epitelial vascular (VEGF) entre otros (Mantovani et al., 2002). En conjunto, inducen y mantienen una respuesta promotora de tumor. Este ambiente es proangiogénico (VEGF), antiinflamatorio (IL-4, IL-23) y bloquea la activación de las células T citotóxicas bloqueando la señalización por receptor de células T (TCR) (por acción de la PGE2) y la diferenciación de células dendríticas (mediante la acción de IL-10) (Nie et al., 2017) . Este fenotipo de macrófago presenta una pérdida significativa de sus moléculas de MHC lo que conlleva una pérdida en su capacidad como célula presentadora de antígeno (Laoui et al., 2014). Por su parte, los macrófagos que presentan un fenotipo tipo M1, siguen presentando moléculas de MHC II pudiendo así activar los linfocitos CD4+ naive a un fenotipo Th1: productor de IFN- $\gamma$ . Estos macrófagos se inducen en respuesta a IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) principalmente y producen factores angiostáticos (quimiocinas CXCL9 y CXCL10), antitumorales (IFN- $\gamma$ ), especies reactivas de oxígeno (ROS) entre otros (Bogen et al., 2019);(Heusinkveld et al., 2011).

La expresión de MHC de que tipo?, IFN- $\gamma$ , CD8, Granzima B, CXCL9, CXCL10 y perforinas están asociadas a un mejor pronóstico, menor

incidencia de metástasis y mayor esperanza de vida a tres años (Gu-Trantien et al., 2013; McCaw et al., n.d.; Nagarsheth et al., 2017). En procesos de infección aguda, M1 puede pasar a M2 para restituir la homeostasis e integridad del tejido durante y tras la eliminación del causante de la respuesta inmune (Wynn et al., 2013). Las células tumorales emplean estrategias similares para evitar una respuesta inmune citotóxica. Mediante la secreción de factores solubles como M-CSF polarizan a los macrófagos hacia un fenotipo M2. Además la disponibilidad de oxígeno también es un factor del microambiente que afecta a la diferenciación de macrófagos. Así, TAMs con expresión de moléculas de MHC II en zonas normóxicas expresan marcadores de M1 y en zonas hipóxicas expresan marcadores de M2 (Biswas & Mantovani, 2010). De hecho el fenotipo en macrófagos puede variar según el área dentro de un mismo tumor, y no sólo eso, sino que en TAMs se encuentran genes asociados a M1 y M2 frecuentemente expresados en la misma célula, lo que habla de una coexistencia de ambos estados acorde con la diferenciación en un continuo de fenotipos (Azizi et al., 2018). Aunque dentro de los tumores se pueden observar distintos fenotipos de macrófagos, la respuesta final dependerá del balance entre IL-13, IL-4, Toll-like receptor (TLR), IL-1R o TNFR entre otros (Kratochvill et al., 2015).

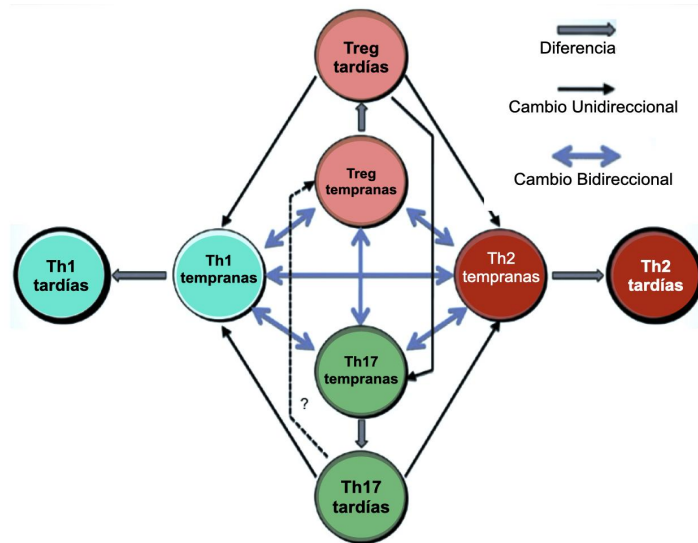
Por su parte, los linfocitos **Treg**, constituyen entre el 5-10% de las T CD4 + periféricas. Las Treg son células CD4+CD25+ que inhiben la actividad de las células presentadoras de antígenos y suprimen la toxicidad de las células natural killer (NKs) modulando la respuesta inmune con sus efectos supresivos (Nava-Castro et al., 2014). Este tipo celular se ha descrito como marcador de pronóstico inadecuado. DeLeeuw *et al.* realizaron una revisión crítica del papel de las Treg en diversos tipos de tumor (deLeeuw et al., 2012) y encontraron que suele ser marcador de mal pronóstico en tumores hepatocelulares y cervicales, de buen pronóstico en tumores colorrectales y que tienen un papel ambiguo en otros tipos como en cáncer de mama donde, de 8 artículos analizados, en dos mostraron ser marcadores de buen pronóstico, en uno fue un marcador neutral y en 5 fueron clasificados como marcadores de pronóstico negativo.

Las **MDSCs** son una población heterogénea con un fenotipo mielóide inmaduro. Se ven sobre-reguladas por factores solubles de una respuesta inmune promotora de tumor: PGE2, ROS, IL-10, VEGF y factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF) (Zhao et al., 2016). Una frecuencia alta de este tipo celular es responsable de la supresión de las respuestas de los linfocitos Tc y está asociada a resistencia a tratamiento (quimioresistencia) (Kalinski & Talmadge, 2017).

Las células dendríticas (**DCs**) son células profesionales presentadoras de antígenos que producen citocinas de diferenciación para linfocitos T y que se consideran como uno de los predictores más fuertes de supervivencia cuando se encuentran infiltrados en tumor (Melaiu et al., 2020).

Los linfocitos **Th**, como hemos discutido con anterioridad, se diferencian en diferentes fenotipos dependiendo del reto inmunológico. Los fenotipos finales, de manera análoga a los TAMs, se presentan estados continuos y no discretos. En ambos extremos del espectro de diferenciación tenemos las Th1 que se estimulan tras activación antígeno específica por MHC II de las células presentadoras de antígenos y que producen una respuesta antitumoral mediante la secreción de IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-23... que no sólo tienen propiedades antitumorales “per se” sino que además promueve y mantiene la respuesta de los Tc (Cintolo et al., 2012). En el otro extremo están las Th2 que se estimulan por IL-4, IL-4, IL-13 y M-CSF entre otros y sintetiza IL-4, IL-10, IL-13 que promueven y mantienen una respuesta protumoral (Dai et al., 2013). Las T vírgenes producen un 1% de IL-4 del que producen las Th2, lo que indica que, bajo condiciones de neutralización de IFN- $\gamma$  produce lo suficiente como para iniciar su diferenciación a Th2

En este sentido es importante remarcar que las células Th mantienen un grado moderado de plasticidad ya que algunas células T diferenciadas puede cambiar su fenotipo a otro Th en un ambiente de citocinas específico (Zhu & Paul, 2010). **Figura 1.4.2.**

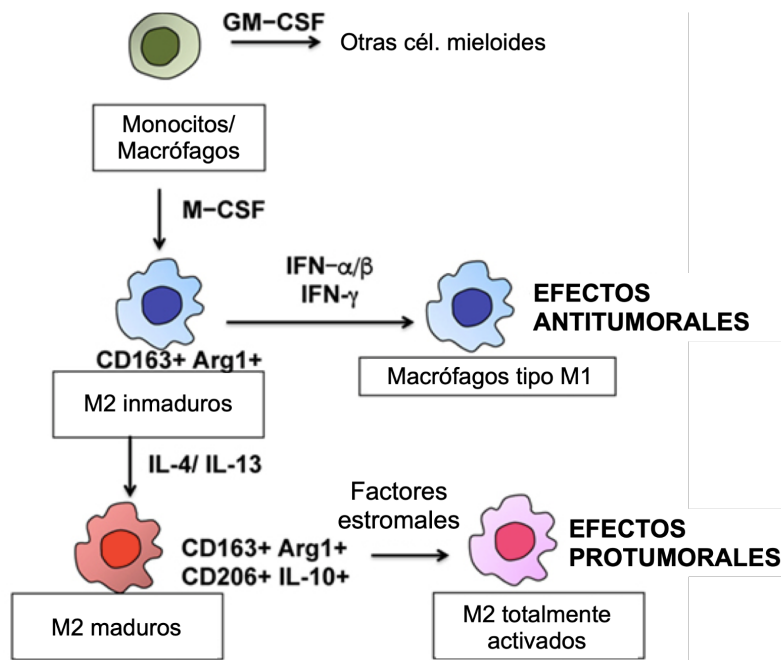


**Figura 1.4.2:** Posibles cambios de fenotipo en células T. Modificado de (Zhu & Paul, 2010).

### 1.5 Sistema inmune en TME de cáncer de mama

Perfiles moleculares de los tumores y de las células del TME muestran biomarcadores potenciales para el pronóstico clínico (Gentles et al., 2015). Gentles A. y colaboradores analizaron datos *in silico* y encontraron asociaciones entre la infiltración de diferentes tipos de células inmunes y supervivencia en el cáncer de mama. Describieron que, tumores con infiltración de macrófagos del tipo M2 tienen un pronóstico desfavorable, mientras que infiltraciones con Células Natural killers (NK) o con Th1 presentan pronósticos más favorables.

1.5.1 *Macrófagos en cáncer de mama.* Entre todas las células asociadas al TME, los TAMs son de gran influencia para la progresión tumoral. En los tejidos periféricos, el patrón de activación de los macrófagos depende del microambiente que los rodea (Obeid et al., 2013) (**Figura 1.5.1.1**). Los TAMs suelen tener un fenotipo predominante del tipo M2, lo que induce una respuesta Th2 promotora de tumor (Y.-C. Liu et al., 2014).



**Figura 1.5.1.1.** Polarización de macrófagos intratumoral. Modificado de (Fujimura et al., 2018).

En el cáncer de mama los macrófagos pueden representar >50% de la masa tumoral (Lewis & Pollard, 2006). Diversos estudios proponen a los TAMs como reguladores de tumores sólidos por su capacidad de potenciar angiogénesis, invasión y metástasis del tejido neoplásico (Qian & Pollard, 2010). En general, una mayor infiltración de macrófagos (una señalización elevada de TGF- $\beta$ , VEGF, etc), se asocia a una mayor progresión del cáncer de mama (Acerbi et al., 2015); (Yuan et al., 2014) y disminuye la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia total a 5 años (Yuan et al., 2014).

No se puede afirmar que la presencia o ausencia de un solo tipo de célula inmune sea determinante para el pronóstico del desarrollo de la

enfermedad. De hecho, está reportado, que el fenotipo Th2 en cáncer de mama regula la bioactividad de los TAMs promoviendo metástasis pulmonar (DeNardo et al., 2009). Por lo tanto, se trata del balance entre los subtipos presentes en el TME lo que determinará el resultado de la respuesta inmune en el tejido (DeNardo et al., 2010). Pero en términos generales podemos afirmar que cuando se minimiza la presencia de TAM en adenocarcinomas mamarios, la inmunidad antitumoral y la infiltración de linfocitos T citotóxicos se incrementan (DeNardo et al., 2011).

### *1.5.2 Linfocitos T en el cáncer de mama.*

Los linfocitos son orquestadores clave en la polarización de los TAMs (Biswas & Mantovani, 2010). Los linfocitos CD4+ naíf son células multipotenciales con la habilidad de diferenciarse en distintos subtipos efectores y reguladores: Th1, Th2, Th17, T CD8+, Treg o Th CD4+ foliculares (Tfh) (Kanduri et al., 2015). Se ha descrito que cada subtipo se diferencia tanto fenotípica como funcionalmente. De forma general, en el cáncer de mama, una infiltración predominante en tumor de linfocitos Tc (citotóxicos) se asocia con una mayor supervivencia (Ali et al., 2014) y con una mejor respuesta a la terapia (Seo et al., 2013). Una población de Th2, Treg predominante en el TME se asocia con una inhibición de la respuesta antitumoral (Teschendorff et al., 2010). Es decir, la tasa Th2/Th1 correlaciona con un incremento en el grado del tumor, metástasis de nódulos linfáticos y una esperanza de vida reducida en pacientes con cáncer de mama (Kohrt et al., 2005). Una mayor cantidad de linfocitos CD8+ o Th1 infiltrados en el TME polarizan los macrófagos hacia un fenotipo M1 mientras que los Th2 lo harán a un fenotipo tipo M2 promotor de tumor (Y.-C. Liu et al., 2014). Los linfocitos menos estudiados son los Th17 y se observan efectos variables dependiendo de las citocinas del entorno, y al tipo de tumor (Qi et al., 2013). Con respecto a los linfocitos Th-cooperadores foliculares (Tfh), se reporta una asociación entre su presencia en el tumor y un pronóstico favorable (Gu-Trantien et al., 2013). Analizando el subtipo tumoral en los tumores de mama, en los tumores sin receptores a estrógenos (ER-), la infiltración de Treg correlaciona con la

de Tc y se asocia con un buen pronóstico (West et al., 2013). La explicación sugerida es que, las Treg requieren de un contacto cercano a sus células blanco para ejercer la supresión inmunológica (Shevach, 2009). En la cohorte estudiada de tumores triple negativos de mama (TNBC) por West y col. menos del 20% de las Treg estaban en contacto directo con las Tc. Como se ilustra en la **Figura 1.5.2.1**, de las propiedades antitumor o protumor del TME dependerá del equilibrio de los fenotipos de sus componentes.

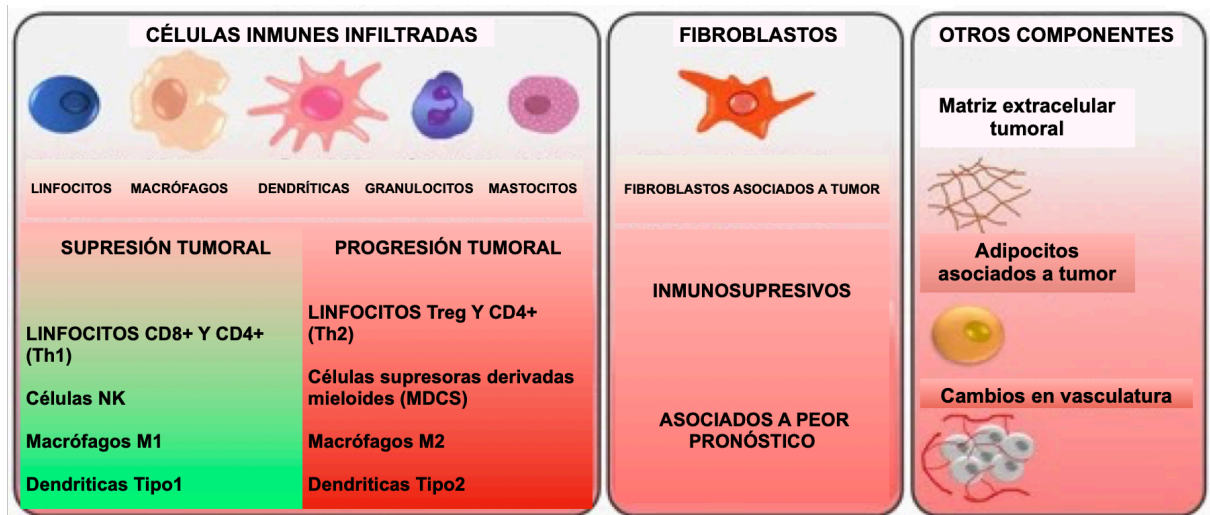


Figura 1.5.2.1: Pronóstico de evolución del tumor según las diferentes poblaciones inmunes en el TME (izquierda). Células del TME que no pertenecen al sistema inmune y que tienen relación con pronóstico (panel del medio: fibroblastos asociados a tumor relacionados con peor pronóstico y panel de la derecha: matriz extracelular, adipocitos asociados a tumor y vasos sanguíneos aberrantes también asociados a peor pronóstico)

## 1.6 Metilación del DNA en células inmunes

La metilación del DNA consiste en la adición de un grupo metilo en la posición del carbono 5 de sus citosinas y suele expresarse como metilación en CpG (dinucleótidos citosina y guanina unidos por un grupo fosfato). Esta modificación epigenética es crítica para establecer programas estables de silenciamiento génico (Ghoneim et al., 2017). Existen regiones ricas en CpG de aproximadamente 1kb de longitud que se denominan islas CpG (CGI). Estas islas se identificaron en promotores de genes por el grupo de McKeon en 1982, de hecho, más del 60% de los

promotores humanos contienen CGI (Li et al., 2014).

La metilación del DNA en promotores está asociada al silenciamiento del promotor (Deaton et al., 2011) y es el mediador epigenético de efectos oncogénicos más estudiado (Flavahan et al., 2017). En mamíferos esta metilación está controlada por tres DNA metiltransferasas (Dnmt): DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. Siendo principalmente la DNMT1 la encargada de copiar el patrón de metilación tras la replicación del DNA durante la división celular (enzima de mantenimiento), mientras que las DNMT3 añaden metilaciones “de novo” (Jaenisch & Bird, 2003). Por otro lado, la desmetilación del DNA puede lograrse mediante dos vías (**Figura 1.6.1**): la desmetilación pasiva se da tras la replicación del DNA. La DNMT1 no actúa, dejando ausentes marcas de metilación en las hebras de DNA de nueva síntesis. La desmetilación activa se realiza mediante oxidación enzimática de las citosinas metiladas por las proteínas de translocación Ten-Eleven (TET’s); dioxigenasas dependientes de hierro y oxígeno (**Figura 1.6.2**). En humanos se han descrito tres TET: TET1, TET2, y TET3 (Kuiper & Vissers, 2014).

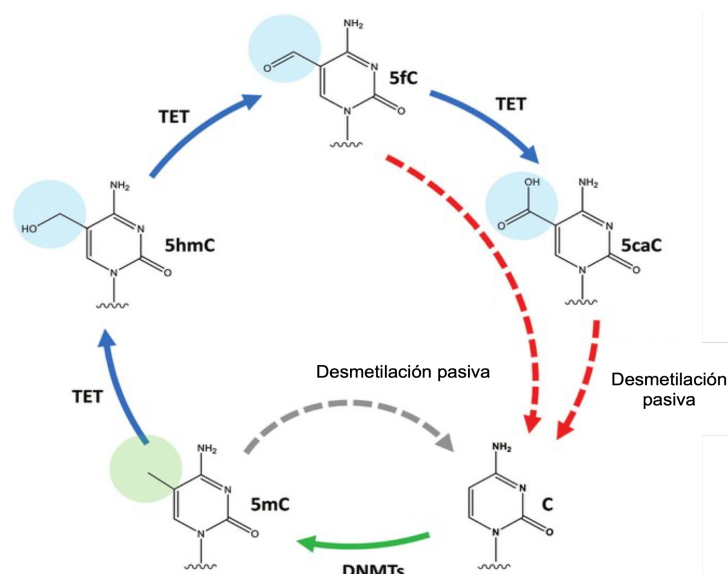


Figura 1.6.1: Transformaciones epigenéticas de metilación y desmetilación en mamíferos catalizadas por metiltransferasas y dioxigenasas respectivamente Modificado de (Ravichandran et al., 2018).



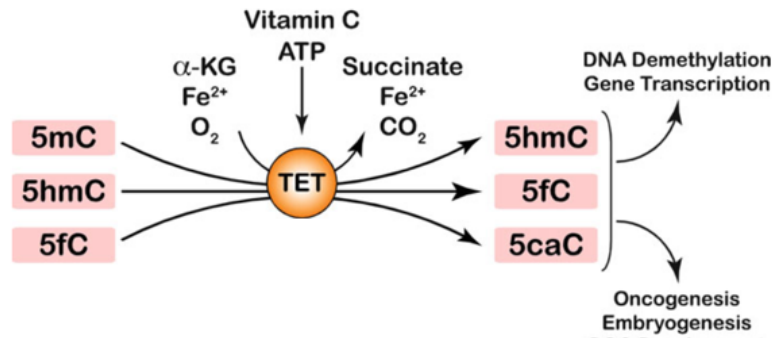


Figura 1.6.2: Reacciones enzimáticas de las TET para metilar DNA. Se pueden observar los distintos cofactores necesarios en las reacciones como Fe<sup>2+</sup> y oxígeno. Modificado de (X. Yin & Xu, 2016).

Análisis de ontología de genes que muestran metilación CGI específica de tipo celular reveló un enriquecimiento de genes involucrados en inmunidad y defensa e inmunidad mediada por citocinas/quimiocinas (Deaton et al., 2011). En células del sistema inmune de mamíferos, numerosos estudios han demostrado que las DNMTs son imprescindibles para el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas y diferenciación de los linajes linfocitario y mielocítico (Álvarez-Errico et al., 2015; Bröske et al., 2009; B. Sun et al., 2016). Con respecto a la polarización de las células del sistema inmune, se han observado distintos patrones de metilación en los diferentes subtipos de células CD4<sup>+</sup>. Los sitios hipersensibles a DNasa I (lugares accesibles de cromatina) en los fenotipos Th1 y Th2 son distintos, mostrando las Th1 una sustancial desmetilación global comparadas con Th2 y Th naíf (Schoenborn et al., 2007). De hecho, los genes de las citocinas clave para Th1 y Th2: IFN- $\gamma$  e IL-4 respectivamente, se someten a cambios en la metilación del DNA durante la diferenciación de los respectivos fenotipos (Deaton et al., 2011). Otro ejemplo claro de la asociación entre diferenciación de células del sistema inmune y cambios de patrones en metilación de promotores, se encuentra en la diferenciación de linfocitos Tc. Aquí se observa una pérdida de marcas de metilación en genes cuya expresión incrementa durante la diferenciación y se gana en los promotores de los genes cuya expresión disminuye (Henning et al., 2018). Así pues, el promotor de IFN- $\gamma$  en linfocitos Tc naíf se encuentra totalmente metilado y pasa a estar altamente desmetilado en las Tc efectoras. La transición de Tc efectoras a Tc exhaustas (anérgicas) viene acompañada por una

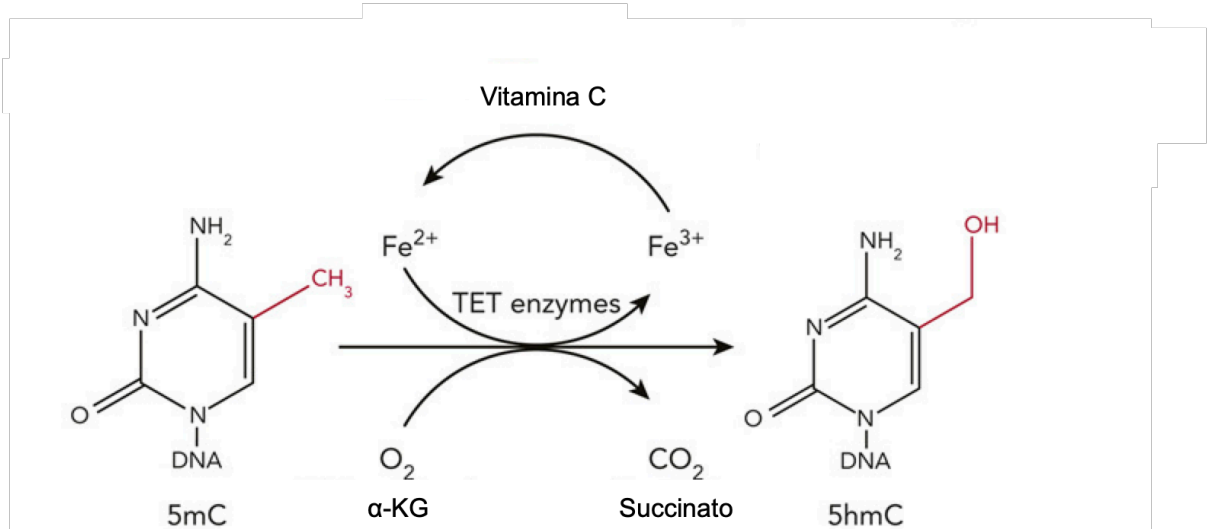
remetilación (por DNMT3A) de este promotor (Ghoneim et al., 2017).

*1.6.1 Metilación del DNA y estrés oxidativo.* El estrés oxidativo se ha descrito como un desbalance de entre prooxidantes y antioxidantes a favor de los primeros. Está involucrado en la fisiopatología de muchas enfermedades humanas, incluido en cáncer. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se han descrito involucradas en todas las etapas del proceso carcinogénico; pueden afectar a un número de procesos celulares críticos en el desarrollo del tumor como proliferación, senescencia, inflamación, metástasis... (Franco et al., 2008). En linfocitos, las ROS dañan la ruta ERK causando un fallo en la sobreexpresión de DNMT1 lo que provoca una desmetilación pasiva durante la activación de este tipo celular (Li et al., 2014). La desmetilación activa también se ve modificada por estrés oxidativo. En situación de hipoxia, que se observa mucho en el interior de tumores sólidos, se da un aumento de ROS, lo que disminuye uno de los cofactores de las TET: el ascorbato (**Figura 1.6.1.1**) Modificada de (Yue & Rao, 2020). Las TET hidroxilan las 5-mC a 5-hmC con  $\text{Fe}^{2+}$  y alfa-cetoglutarato como co-factores. Tras la reacción el  $\text{Fe}^{2+}$  pasa a  $\text{Fe}^{3+}$  y se necesita del ascorbato para la regeneración de la enzima. De este modo, las TET muestran una actividad disminuida bajo condiciones de estrés oxidativo (Niu et al., 2015). De hecho, la actividad de TET aumenta de manera dosis-dependiente con la cantidad de ascorbato disponible (Kuiper & Vissers, 2014). La generación de radicales hidroxilo no solo afecta de manera directa a las enzimas encargadas de la metilación/desmetilación del DNA sino que también pueden interferir en la habilidad del DNA como sustrato para unir las DNMT's generando una hipometilación global característica de los procesos tumorales (Franco et al., 2008).

Aunado a lo anterior, se han reportado genes antioxidantes (capaces de disminuir ROS) como la superóxido dismutasa mitocondrial SOD2, tienen el promotor hipermetilado en cáncer de mama, y que, la inhibición de las DNMTs incrementa la expresión, la cantidad de proteína y la actividad de

esta dismutasa (Hitchler et al., 2006).

Figura 1.6.1.1: Cofactores de la reacción catalizada por TET's: O<sub>2</sub>: Oxígeno, α-KG: alfa-keto glutarato, Fe<sup>2+</sup>: óxido ferroso, Fe<sup>3+</sup>: óxido férrico, 5mC: 5-metilcitosina, 5hmC: 5-hidroximetilcitosina. El ascorbato regenera el óxido ferroso necesario para la reacción.



Se ha postulado que mecanismos puramente epigenéticos tendrían el potencial para explicar todos los hallmarks del cáncer (Flavahan et al., 2017), y la importancia de los perfiles de metilación del DNA aberrantes se reconoce cada vez más (Heyn et al., 2016).

*1.6.2 Metilación en células inmunes en TME de cáncer de mama.* Los tumores de mama presentan perfiles de metilación de DNA distintos del tejido mamario sano y distintos para los diferentes subtipos de tumores; diversos estudios han reportado patrones de metilación diferencial entre tumores que expresan receptor de estrógenos (ER+) y los que no (ER-) (Rønneberg et al., 2011; Z. Sun et al., 2011). El perfil de metilación en DNA puede reflejar la composición del tipo celular del microambiente tumoral, en particular los TILs. El grupo de Dedeurwaerder, en un estudio de patrones de metilación en diversos tumores de mama, reportó patrones de metilación diferencial en muchos genes involucrados en inmunidad. Seleccionaron 32 genes (marcadores de pronóstico significativos) con una fuerte correlación negativa entre expresión y metilación. De estos, trece estaban relacionados con inmunidad, de los cuales ocho pertenecían a la

biología de los linfocitos T (Dedeurwaerder et al., 2011). Algunas estrategias para potenciar respuesta citotóxica por linfocitos T en cáncer de mama pasan por la inhibición de DNMT1, ya que esto sobre regula los genes de complejos de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I) , lo que promueve el reclutamiento de linfocitos Tc al microambiente tumoral. La inhibición en este caso de la DNMT1 altera el microambiente inmune (Luo et al., 2018).

*1.6.3 Metilación en células inmunes y micronutrientes.* Al contrario del genoma, el epigenoma del individuo es variable. Los 5 factores ambientales que afectan al epigenoma son: la nutrición, comportamiento, estrés, toxinas y actividad física (Faulk & Dolinoy, 2011). Numerosos micronutrientes han sido postulados como modificadores epigenéticos de células inmunes, con función equilibradora de ROS en cáncer (Cuenca-Micó & Aceves, 2020). Entre ellos varias Vitaminas como la Vit. D que inmunomodula monocitos, macrófagos, DCs, linfocitos T y B (Baeke et al., 2010) y restituye el equilibrio RedOx en células tumorales (Pluchino et al., 2015). La Vitamina C por su parte es un potente antioxidante capaz de suplir de hierro reducido necesario para la regulación epigenética (Gillberg et al., 2018);(Q. Chen et al., 2008). En un estudio clínico que evaluaba el efecto de inyecciones intravenosa de Vitamina C en pacientes con cáncer de mama observaron una reducción en plasma de marcadores inflamatorios (IL-1, IL-2...) (Mikirova et al., 2012). Otra vitamina, la vitamina E, se encuentra entre los mejores micronutrientes moduladores del sistema inmune protegiendo a los macrófagos residentes en tejido contra el daño oxidativo (Coquette et al., 1986).

Además de vitaminas, varios metales dietarios han mostrado su función en la metilación de células del sistema inmune; la deficiencia de cobre va acompañada por una reducción en la proliferación de células T y en la producción de interleucinas, lo cual relaciona con un incremento de la metilación (Ognik et al., 2019; Percival, 1998). Por su parte, el selenio es un potente antioxidante y niveles elevados en el organismo conlleva el aumento y actividad de las DNMTs (Jabłońska & Reszka, 2017; Rayman, 2012). Incluso el zinc ejerce efectos en el sistema inmune mediante

mecanismos RedOx y epigenéticos (Wessels et al., 2013).

Otros micronutrientes con efectos directos en la metilación son los folatos. (Mikkelsen & Apostolopoulos, 2019). Pero además de efectos sobre la marca epigenética, también tienen efectos directos sobre el desarrollo de las células inmunes; Pre-tratamientos con ácido fólico en cultivos celulares de monocitos humanos inhiben la ruta NF- $\kappa$ B, que es un factor importante en la regulación de citocinas proinflamatorias (Au-Yeung et al., 2006). La deficiencia de folato reduce la capacidad de las Tc de proliferar en respuesta a activación (Courtemanche et al., 2004). También los ácidos grasos provenientes de la dieta como el  $\alpha$ -lipoico o el  $\alpha$ -linoleico influyen en el comportamiento de numerosas proteínas involucradas en la activación de células inmunes (Yaqoob, 2003), además, las dietas altas en grasas saturadas muestran una disminución en los niveles de metilación en la respuesta inflamatoria (Jacobsen et al., 2012).

### 1.7 Yodo

El yodo es un elemento químico que pertenece a la familia de los halógenos. Al igual que todos los miembros de este grupo de elementos, forma un gran número de moléculas con otros elementos y puede presentar diversos estados de oxidación: -1, +1, +3, +5, +7. El yodo, en sus diferentes formas químicas, es captado y utilizado por prácticamente todos los seres vivos y es considerado un micronutriente en los cordados (Aceves et al., 2021). En el caso del yoduro (I<sup>-</sup>), es especialmente necesario para la formación de hormonas tiroideas. El yoduro es captado e introducido a los tirocitos mediante el transportador NIS (simportador de Yodo/sodio), donde se organifican dando lugar a las hormonas tiroideas (**Figura 1.7.1**) Figura modificada de (Spitzweg et al., 2000).

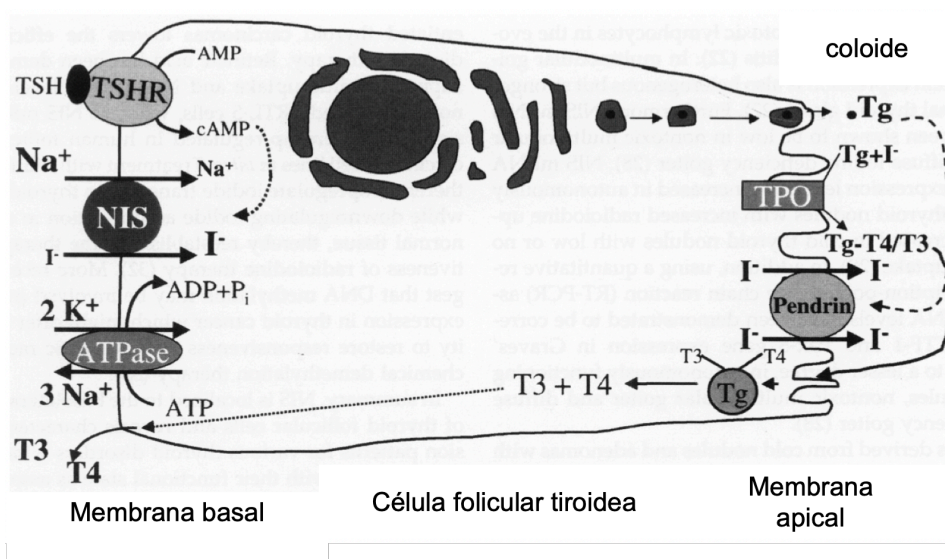


Figura 1.7.1: Ilustración esquemática de una célula folicular tiroidea que muestra los aspectos clave del transporte del yodo tiroideo y la síntesis de las hormonas tiroideas. TSHR (Receptor de tirotropina), NIS (simportador sodio/yodo), TPO (tiroperoxidasa), Tg (tiroglobulina), T3 (triyodotironina) y T4 (tiroxina).

En los últimos años, la química de los compuestos orgánicos de yodo polivalente ha experimentado un desarrollo explosivo. Este creciente interés en los compuestos de yodo se debe principalmente a las útiles propiedades oxidantes de los reactivos de yodo orgánico polivalente, combinadas con su carácter benigno para el medio ambiente y su disponibilidad comercial (Zhdankin & Stang, 2008).

La captación del yodo molecular ( $I_2$ ) por su parte, sigue una cinética de Michaelis-Menten, sin requerimientos de energía (ATP o  $Na^+/K^+$  ATPasa) lo que sugiere un mecanismo de difusión facilitada de acuerdo con la definición de Lobban *et al.*, 1985. El transporte al interior celular se satura a  $5\mu M$  de  $I_2$  con una  $K_m=0.91\mu M$  lo que muestra un sistema de alta afinidad y capacidad de captación (**Figura 1.7.2.**). Así pues, la entrada de  $I_2$  al interior de las células no depende del simportador  $Na^+/I^-$  (NIS) ni de pendrina, siendo la retención final de aproximadamente el 10% del  $I_2$  captado (Arroyo-Helguera *et al.*, 2006). El tracto gastrointestinal puede captar  $I_2$  y  $I^-$ , pero la distribución de las dos especies en sangre, estómago,

piel y glándula tiroidea es diferente (García-Solís et al., 2005) (Figura 1.7.3)

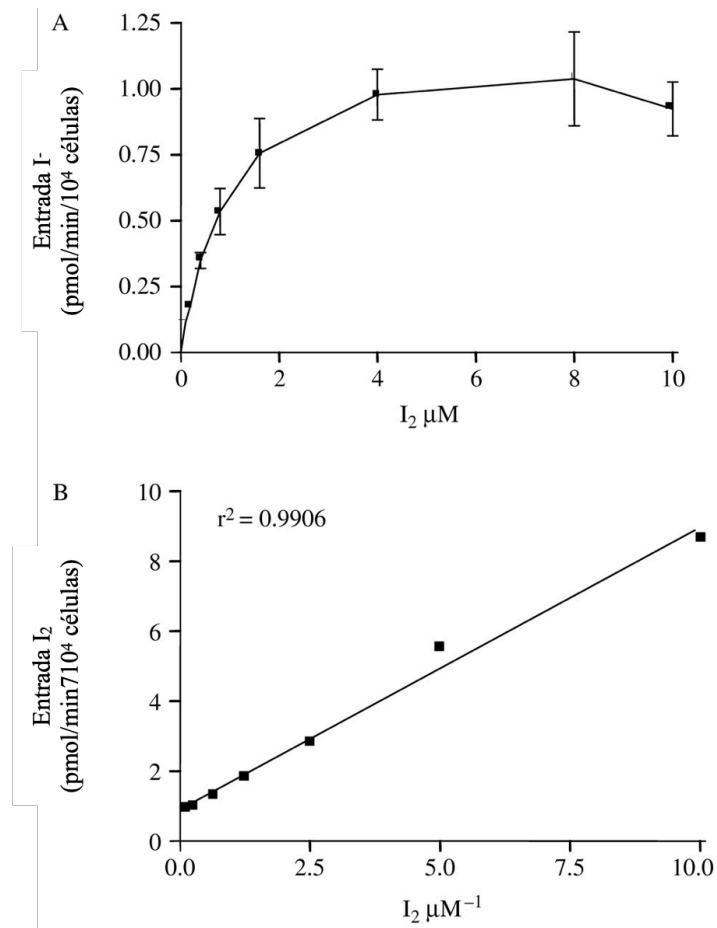


Figura 1.7.2: Cinética de la captación de I<sub>2</sub>. A, cinética de Michaelis-Menten expresada como media ± sd (n=3). Las células se incubaron con 0,005 μCi de <sup>125</sup>I<sub>2</sub> en 0,01–10 μM de I<sub>2</sub> sin marcar a 37 °C durante 5 min, B, gráfico recíproco doble de Lineweaver-Burke. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Cada punto es la media de pozos triplicados (Arroyo-Helguera et al., 2006).

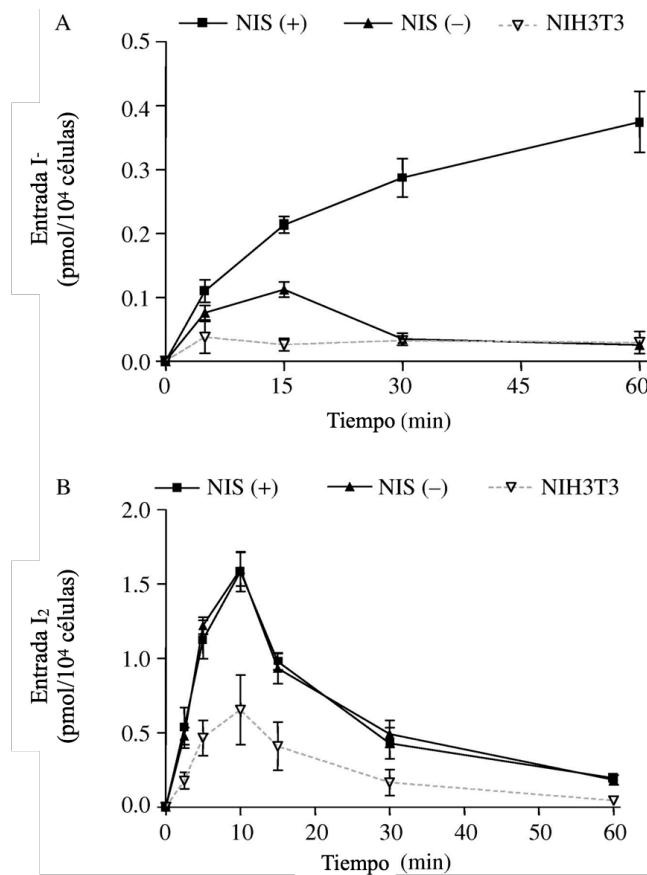


Figura 1.7.3: Evolución temporal de la acumulación de diferentes formas de yodo en células NIH3T3 y MCF-7, con o sin expresión de NIS. Las células NIS (+) se incubaron con RA 1  $\mu$ M durante 48 h para inducir la expresión. Todos los grupos se trataron con 1,25 mCi/mmol de  $^{125}\text{I}^-$  o  $^{125}\text{I}_2$ . El yodo radiactivo se determinó con un contador  $\gamma$ . **A**, captación de  $^{125}\text{I}^-$ . **B**, captación de  $^{125}\text{I}_2$ . Los valores se expresan como media  $\pm$  DS. (Arroyo-Helguera et al., 2006).

### 1.7.1 Yodo molecular como tratamiento antineoplásico

El  $\text{I}_2$  se ha utilizado desde siempre (mediante la ingesta de algas ricas en yodo) en la medicina tradicional china como tratamiento contra el padecimientos mamarios para “suavizar” tumores o reducir nodulaciones (García-Solís et al., 2005). Las glándulas mamarias son capaces de captar  $\text{I}_2$ , de hecho, las displasias mamarias asociadas a la deficiencia de yodo son corregidas por la ingesta de  $\text{I}_2$  y no por el yoduro (Aceves et al., 2005; Eskin et al., 1995)

Se han postulado dos hipótesis sobre los efectos del  $\text{I}_2$  en tumores: efectos directos e indirectos (**Figura 1.7.1.1**). Los efectos directos se ejercen por sus propiedades oxidantes/antioxidantes (**Figura 1.7.1.2**). A



concentraciones bajas o moderadas, el I<sub>2</sub> reduce la oxidación de lípidos compitiendo con ROS por algunos componentes celulares o directamente neutralizando radicales HO·. A altas concentraciones, el yodo actúa como un oxidante directo, disipando el potencial de membrana mitocondrial y promoviendo apoptosis mediada por mitocondria (Nava-Villalba et al., 2015).

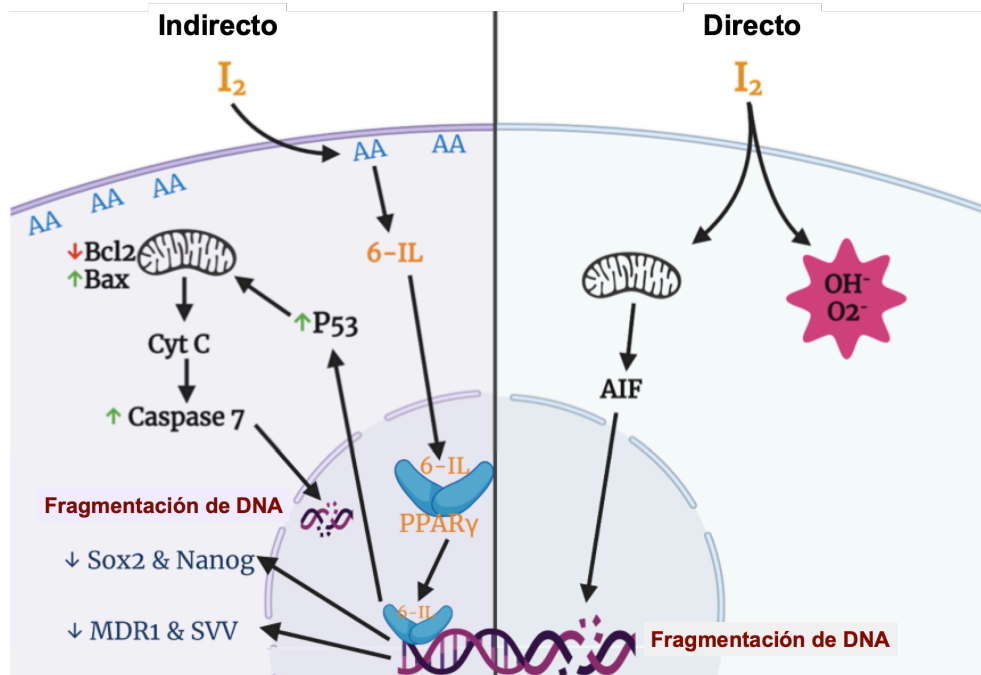


Figura 1.7.1.1 Mecanismos apoptóticos y de diferenciación del yodo molecular (I<sub>2</sub>). En la vía directa el yodo oxidado disipa el potencial de la membrana mitocondrial desencadenando la apoptosis mediada por mitocondrias. La vía indirecta incluye la yodación del ácido araquidónico (AA), la generación de 6-yodolactona (6-IL) y la activación de la producción receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPARγ). La activación de PPARγ podría inducir la vía apoptótica de p53-caspasa y/o la inhibición de marcadores relacionados con el mantenimiento de células troncales (Sox2, Nanog), quimiorresistencia (proteína de resistencia a múltiples fármacos 1; MDR1) y supervivencia (Survivin; SVV)(Aceves et al., 2021).

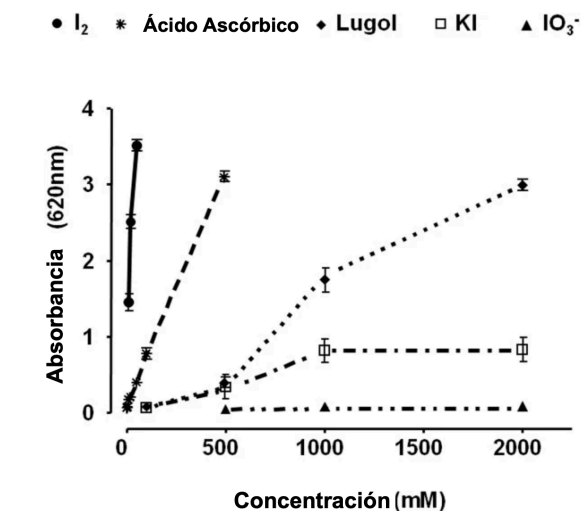


Figura 1.7.1.2. Poder antioxidante del yodo. La capacidad antioxidante de diferentes formas químicas de yodo se analizó con el ensayo de poder antioxidante/reductor férrico (FRAP). Lugol: solución de I<sub>2</sub>:KI (1:3). El ácido ascórbico se utilizó como control positivo. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD (n = 4). Modificado de (Alfaro et al., 2013).

Los efectos indirectos implican la formación de yodolípidos como la 6-yodolactona (6-IL) que ejerce efectos apoptóticos (Alfaro et al., 2013). Diversos estudios han analizado los efectos indirectos de la suplementación de I<sub>2</sub> en la formación de 6-IL. En líneas celulares de cáncer de mama se ha observado que el I<sub>2</sub> entra en las células y se une covalentemente a lípidos como el ácido araquidónico (AA) formando 6-IL (Arroyo-Helguera et al., 2006). Este aumento de 6-IL induce la activación de los receptores activados por proliferadores peroxisomales tipo gamma (PPAR $\gamma$ ), lo que genera efectos antitumorales por activación de las vías p53/ p21 (parada del crecimiento celular), Bax/caspasas y AIF/PARP-1 (apoptosis) (**Figura 1.7.1.1**). El silenciamiento de PPAR $\gamma$  bloquea los efectos antiproliferativos de la 6-IL (Nava-Villalba et al., 2015). La 6-IL es un ligando específico de PPAR $\gamma$  con casi seis veces mayor afinidad que el AA, que es su precursor. En tejido tumoral se observa hasta cinco veces más de AA y, tras el tratamiento con I<sub>2</sub>, se produce doce veces más de 6-IL que en tejido mamario normal, lo que va acompañado de una disminución en los marcadores de invasión y de un aumento en los inductores de apoptosis (Aceves et al., 2009). De hecho, en las células mamarias epiteliales normales se requiere de 4 veces más de I<sub>2</sub> para

inducir la apoptosis (Nuñez-Anita et al., 2009).

### *1.7.2 Estudios clínicos en cáncer de mama con suplementación con I<sub>2</sub>.*

Sólo se conocen dos estudios clínicos en el que se ha evaluado el efecto del I<sub>2</sub> en progresión del cáncer de mama, como tratamiento único antes de la resección del tumor en casos de cáncer temprano y como coadyuvante junto con tratamiento quimioterapéutico en los casos de cáncer tardío. Nuestro grupo de investigación desarrolló un protocolo doble ciego en el cual 23 mujeres con cáncer de mama en estadio II tomaron 5 mg/día de I<sub>2</sub> o placebo entre 3 y 6 semanas (desde que se les diagnostica el cáncer hasta la intervención quirúrgica para la resección tumoral). En el segundo estudio clínico, también doble ciego, 21 pacientes diagnosticadas con cáncer de mama en estadio III recibieron 5 mg/ día de I<sub>2</sub> o placebo como coadyuvante de la quimioterapia FEC/TE (5-fluorouracilo/epirubicina/ciclofosfamida o Taxotero/Epirubicina) de 4 a 6 ciclos con 21 días entre los ciclos (Moreno-Vega et al., 2019). Tras la resección tumoral se extrajo el RNA total y se realizaron dos conjuntos o pools de 4 muestras cada uno. Como control se utilizó un pool de dos muestras de tejido de glándula mamaria sana obtenidas de cirugías estéticas. Se secuenciaron los grupos y se obtuvieron 4 transcriptomas de expresión diferencial: sano/cáncer, cáncer/yodo, cáncer/fec y cáncer/fec+yodo.

El análisis de los tumores mostró numerosos indicadores antineoplásicos en las muestras de pacientes suplementadas por yodo:

1. Disminución en el tamaño tumoral
2. Ausencia de quimiorresistencia
3. Disminución en la expresión génica de la transición epitelio-mesénquima (EMT)
4. Mayor infiltración intratumoral de Tc (**Figura 1.7.2.1**)
5. Abundancia en estirpes celulares Th1 (**Figura 1.7.2.2**)

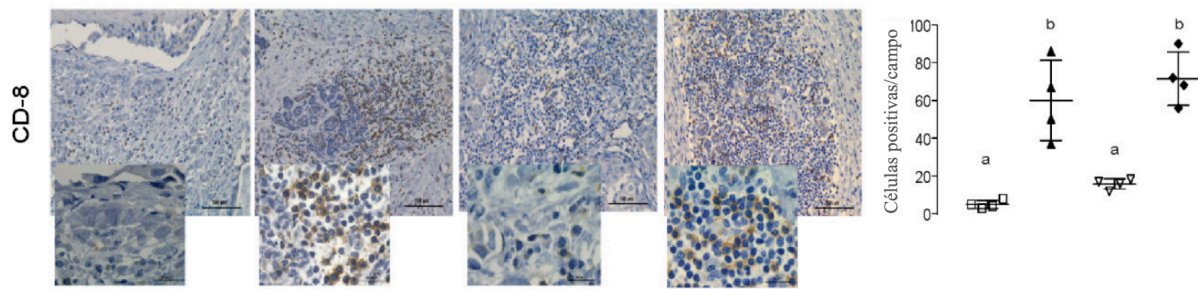


Figura 1.7.2.1: Imágenes micrográficas representativas de inmunohistoquímica H & E y CD8. Los gráficos de la derecha muestran el número de linfocitos, linfocitos CD8 + positivos por campo. Estos análisis se realizaron como el promedio de tres campos aleatorios (40x) y la cuantificación se realizó mediante ImageJ 1.47. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD. Cada punto representa una muestra individual y letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ( $P < 0,05$ ). Modificado de (Moreno-Vega et al., 2019). Falta información en la figura y no se entiende que es cada panel

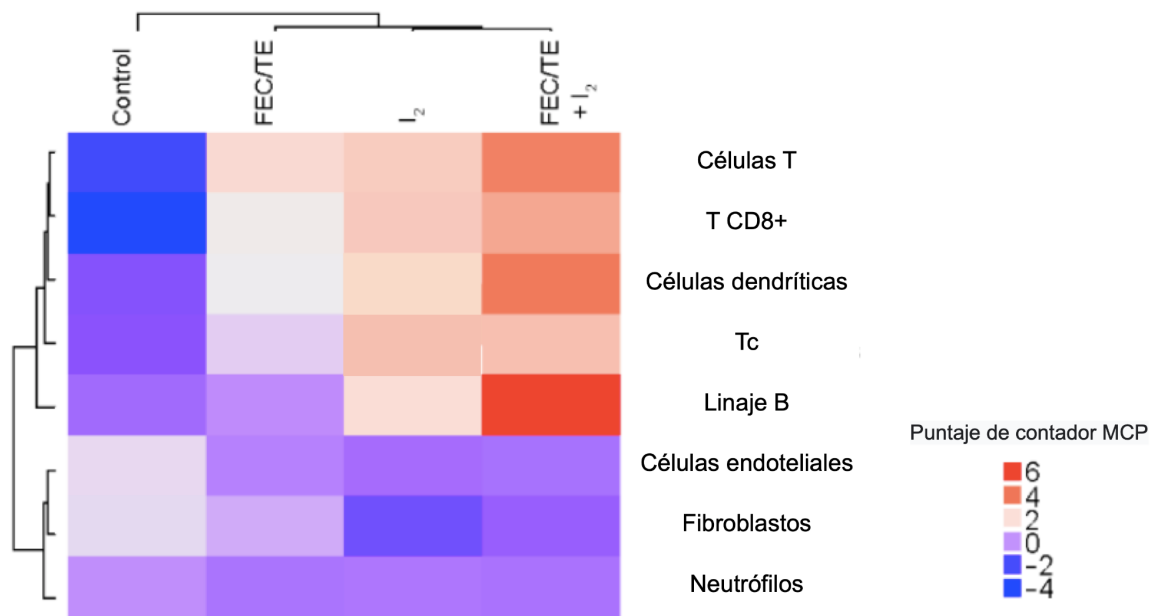


Figura 1.7.2.2: Firma inmunitaria tras el tratamiento con I2. La abundancia de diferentes poblaciones celulares se calculó mediante el método de contador MCP, basado en una matriz de expresión génica de los distintos grupos experimentales. Agrupamiento jerárquico de los grupos experimentales ( $n =$  pool de cuatro tumores individuales por grupo experimental). Se usaron dos pools por grupo para el cálculo de la expresión génica (Moreno-Vega et al., 2019).

Como parte complementaria de estos estudios, el presente trabajo analiza en estos mismos tumores la participación del sistema inmune y su posible regulación epigenética.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

La suplementación de yodo molecular genera un microambiente tumoral inmune más citotóxico. Uno de los mecanismos de actuación es la desmetilación/metilación en promotores de genes de IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  respectivamente.

### 2.2 Objetivos

#### 2.2.1 Objetivo general.

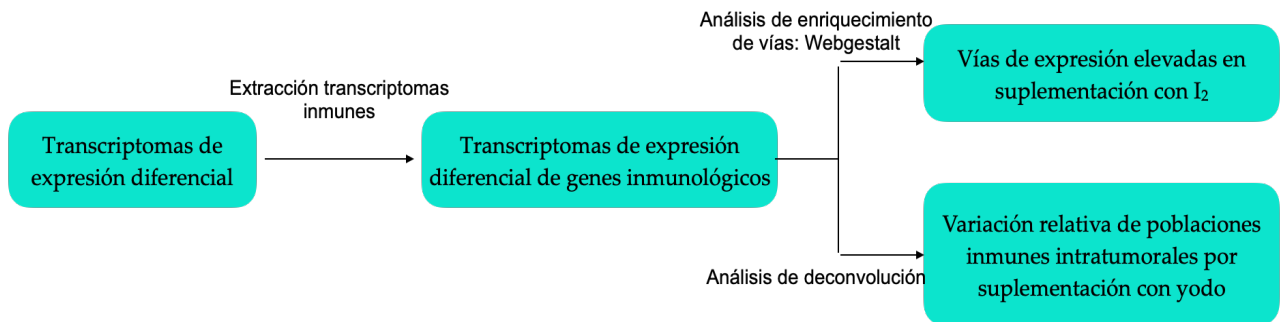
Determinar si la suplementación con I<sub>2</sub> modifica los patrones de metilación del DNA de los promotores de IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ , dando lugar a un microambiente con mayor capacidad antitumoral que explique, en parte, los efectos antineoplásicos del yodo.

#### 2.2.2 Objetivos específicos.

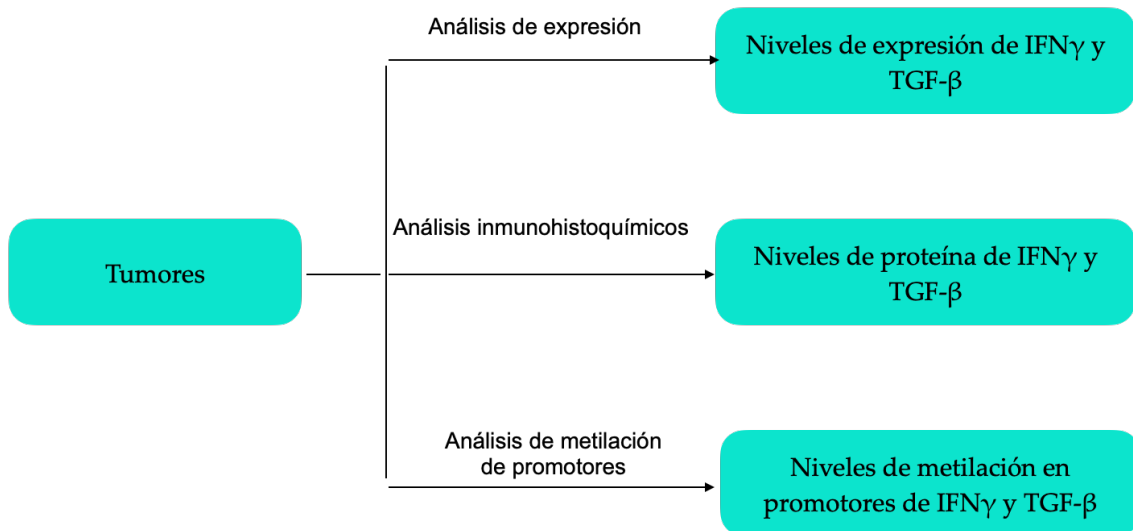
- a) Analizar el componente inmune de los transcriptomas de expresión diferencial tumorales para identificar vías activadas por la suplementación con I<sub>2</sub>.
- b) Detallar la composición inmune de los tumores mediante técnica de deconvolución en los transcriptomas
- c) Corroborar los datos obtenidos "*in silico*" mediante el análisis de expresión de moléculas clave de fenotipos inmunes: Th1, Th2, M1 y M2.
- d) Examinar a nivel molecular la expresión de marcadores inmunes antitumorales (T-Bet e IFN- $\gamma$ )
- e) Explorar cambios en patrones de metilación en islas CpG de los promotores de IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ .

## 2.2.3 Diagrama de flujo de estrategia experimental

### Análisis bioinformáticos



### Análisis en muestras de tumor



## III. METODOLOGÍA

### 3.1 Sitio de estudio

Todos los análisis se realizaron en el Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el Laboratorio Internacional para la Investigación del Genoma Humano (LIIGH-UNAM)

### 3.2 Muestras analizadas

Los tumores analizados en el presente estudio pertenecen a las pacientes del estudio piloto publicado en 2019 (Moreno-Vega et al, 2019). Los tumores pertenecen a cuatro grupos definidos por el estadio de la enfermedad y por tratamiento, tal y como se muestra en la Tabla 3.2.1

ESTADÍO II	ESTADÍO III
PLACEBO (P)	QUIMIOTERAPIA (Cht)
YODO (I <sub>2</sub> )	QUIMIO + YODO (Cht+I <sub>2</sub> )

### 3.3 Análisis de los transcriptomas

En [protocols.io](https://protocols.io) ([immunohistochemistry and transcriptomic analysis of iodine and breast cancer](#)) se pueden encontrar construcciones detalladas y todos los análisis de datos específicos, incluida la predicción del regulador ascendente y de la vía, así como todos los demás análisis relacionados con los datos transcriptómicos. Brevemente, el RNA total se extrajo con Qiazol y RNeasy (ambos de Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.). Se usaron dos grupos diferentes de cuatro muestras de tumores individuales. Como control normal, utilizamos un pool de dos muestras de glándulas mamarias normales de cirugías estéticas (reducción de volumen). Se usó RNAm enriquecido con poli-A para construir bibliotecas de RNAm-Seq trenzado siguiendo las instrucciones del fabricante (KAPA Biosystems). La secuenciación se llevó a cabo en el Centro de recursos compartidos de secuenciación del genoma de la Universidad de Duke (Durham, NC, EE. UU.). Las bibliotecas se secuenciaron en una plataforma Illumina HiSeq 2500, en la que se determinaron 101 bases en modo de extremo de par. La calidad de los datos se evaluó y se recortó con FastQC (versión número 0.11.7,

Cambridge, Reino Unido) y Trimmomatic (versión número V0.32, Mühlberg, Alemania), respectivamente. Las lecturas se asignaron al genoma humano (GRCh38) y los niveles de expresión se determinaron mediante el recuento de htseq.

El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando las pruebas exactas de Fisher y Benjamini-Hochberg (FDR). Los genes que cambiaron su expresión en al menos 2 veces o menos de 0,5 veces con un valor de FDR igual o inferior a 0,05 se consideraron biológicos y estadísticamente significativos. Las secuencias anotadas completas de la secuenciación de RNA están disponibles en el sitio web de los Archivos Europeos de Nucleótidos (<https://www.ebi.ac.uk/ena/erp110028>) (consultado en agosto de 2019).

#### *Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA)*

Se realizó con Webgestalt (2013, Houston, TX, EE. UU.) y GSEA con los siguientes parámetros: Organismo de interés: hsapiens; Método de interés: GSEA; Base de datos funcional: vía, Kegg; Seleccione el tipo de ID de gen: genesímbolo. La anotación de genes con función inmunológica se realizó con Gene Ontology Consortium ([wiki.geneontology.org/index.php/Immunology](http://wiki.geneontology.org/index.php/Immunology)) (consultado en junio de 2018). Se seleccionaron los 1325 genes inmunes más relevantes.

#### *Genes de diferenciación Th1 y Th2*

Los genes que se sabe que están involucrados en la diferenciación de células T CD4+ hacia células Th1 o Th2 se obtuvieron de conjuntos de datos públicos (KEGG hsa04658, R&D Systems Pathways) y se analizaron en nuestros conjuntos de genes de expresión diferencial.

#### *Análisis de deconvolución*

Los estudios de deconvolución se realizaron con EPIC (B. Chen et al., 2018) , que cuantifica con precisión los niveles relativos de diferentes tipos de células inmunitarias dentro de una mezcla compleja de expresión génica, y usamos GED-IT para predecir la composición del tipo celular de las muestras de tejido. También usamos ICTD para deconvolucionar e identificar células inmunitarias (Chang et al., n.d.).



### 3.4 RT-PCR en tiempo real

La expresión génica se cuantificó con el método de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR). El RNA total se obtuvo de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (reactivo TRIzol, Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, EE. UU.). El RNA mensajero (2 mg) se transcribió de forma inversa utilizando cebadores de oligo desoxitimidina. Cada PCR se realizó utilizando un par específico de oligonucleótidos detallados en la **tabla 3.3.1**. La reacción se realizó con 1  $\mu$ L de plantilla de cDNA y Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, MA), utilizando 40 ciclos de amplificación de tres pasos (94 °C durante 30 s, 55–62 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s). Se empleó un aparato Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) para realizar qPCR con un marcador para amplificación de ADN (SYBR Green, Fermentas, Burlington, ON, Canadá). La expresión génica se calculó mediante el método 2-DDCT y se normalizó por el gen de  $\beta$ -actina.

Tabla 3.4.1. Oligonucleótidos utilizados para expresión génica RT-PCR

GENES	REFERENCE	OLIGOS (FWD/RVS)	SIZE (BP)
IL-12RB	NM_001290023.2	CCCAGCAGCCCATGGA	92
		TCCTGGGCCACATTCATCTC	
T-BET	NM_013351.2	GCTGCCCCACTTTGAACATCAG	164
		GGAGGCTTGGGGGAGAGAGAAT	
IFN $\gamma$	NM_000619.3	GGCAAGGCTATGTGATTACAAGG	96
		CATCAAGTGAAATAAACACACAACCC	
TGF $\beta$	NM_00660.7	ATCGGTGCTGACGCCTGGCCC	197
		TGCTGTTGTACAGGGCGAGCA	
GATA-3	NM_002051.3	ACGTCTCACTCTCGAGGCAGCATG	564
		GAAGTCCTCCAGCGCGTCATGCAC	

### 3.5 Inmunohistoquímica

Los tejidos tumorales se cortaron en secciones de 4  $\mu$ m y se trataron con 3-aminopropil-trietoxisilano para su posterior tinción con hematoxilina y DBA o con anticuerpos específicos para T-BET e IFN $\gamma$ . La cuantificación de linfocitos o células de tinción positiva se realizó utilizando

el software ImageJ (Versión 1.41, NIH, Bethesda, MD, EE. UU.) de tres secciones diferentes de cada tumor a 40x y 63x. Se analizaron tres tumores por grupo experimental.

### 3.6 PCR específica de metilación

La extracción y purificación del DNA tumoral (Quick-DNA Miniprep Plus Kit, Zymo, CA, EE. UU. y DNA Clean & Concentrator-25, Zymo, CA, EE. UU.) se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el DNA se sometió a transformación con bisulfito de sodio (EZ-96 DNA Methylation MagPrep, Zymo, CA, EE. UU.). Se identificaron regiones promotoras con islas CpG (FASTA y Methprimer), y se generaron oligos diferenciales para IFN $\gamma$  y TGF $\beta$  para estas regiones M&U (Tabla 3.5.1 y 3.5.2). La amplificación se realizó con ambos oligos junto con el gen MLH-1 en PCR de punto final. Posteriormente se realizó una q-PCR anidada utilizando 4  $\mu$ L del producto de la primera amplificación. La expresión génica relativa se calculó mediante el método 2-DDCT y se normalizó por la expresión del gen MLH-1.

Tabla 3.6.1. Oligos para regiones metiladas del promotor de IFN $\gamma$  y TGF $\beta$  y para el gen constitutivo MLH-1 (tras conversión por bisulfito).

GENES	REFERENCE	OLIGOS (FWD/RVS)	SIZE (BP)
IFN $\gamma$	Methprimer	TTTGATTAATATAGTGAAATTCGT	194
		TCACCCAAACTAAAATACAATAACG	
TGF $\beta$		GTTTTTTGTGTTTTATTTTCGG	142
		AAACAAAATACTACCTCCTAACGAC	
MLH-1	GenBank Accession #: U83845	GGAGTGAAGGAGGTACGGGTAATG	182
		AAAAACGATAAAACCCTATACCTAATCTATC	

Tabla 3.6.2. Oligos para regiones desmetiladas del promotor de IFN $\gamma$  y TGF $\beta$  (tras conversión por bisulfito)

GENES	REFERENCE	OLIGOS (FWD/RVS)	SIZE (BP)
IFN $\gamma$	Methprimer	TTGATTAATATAGTGAAATTTTGT	190
		ACCCAAACTAAAATACAATAACACA	
TGF $\beta$		TTTTTTTGIGTTTTATTTTTTGG	141
		AAACAAAATACTACCTCCTAACAAC	

### 3.7 Análisis estadístico

El análisis de expresión diferencial para RNA-Seq se realizó mediante las pruebas exactas de Fisher y Benjamini-Hochberg (FDR). Los genes que cambiaron su expresión en al menos 2 veces o menos de 0,5 veces con un valor de FDR igual o inferior a 0,05 se consideraron biológicos y estadísticamente significativos. Las expresiones génicas individuales y las cantidades de amplicones metilados/no metilados se analizaron con la prueba t de Student entre las muestras de tratamiento y de control. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Análisis de los transcriptomas

El análisis de vías enriquecidas exclusivas de la suplementación con yodo se realizó mediante el estudio de vías enriquecidas de los transcriptomas inmunes de los 4 grupos por Webgestalt y se seleccionaron las vías que se activaban exclusivamente en el grupo de cáncer temprano que habían recibido yodo y en el grupo de cáncer tardío que habían recibido Cht+I<sub>2</sub>. Las rutas activas exclusivamente por el tratamiento de quimioterapia no se consideraron. Las rutas activas y sus genes más significativos se muestran en la **figura 4.1.1**:

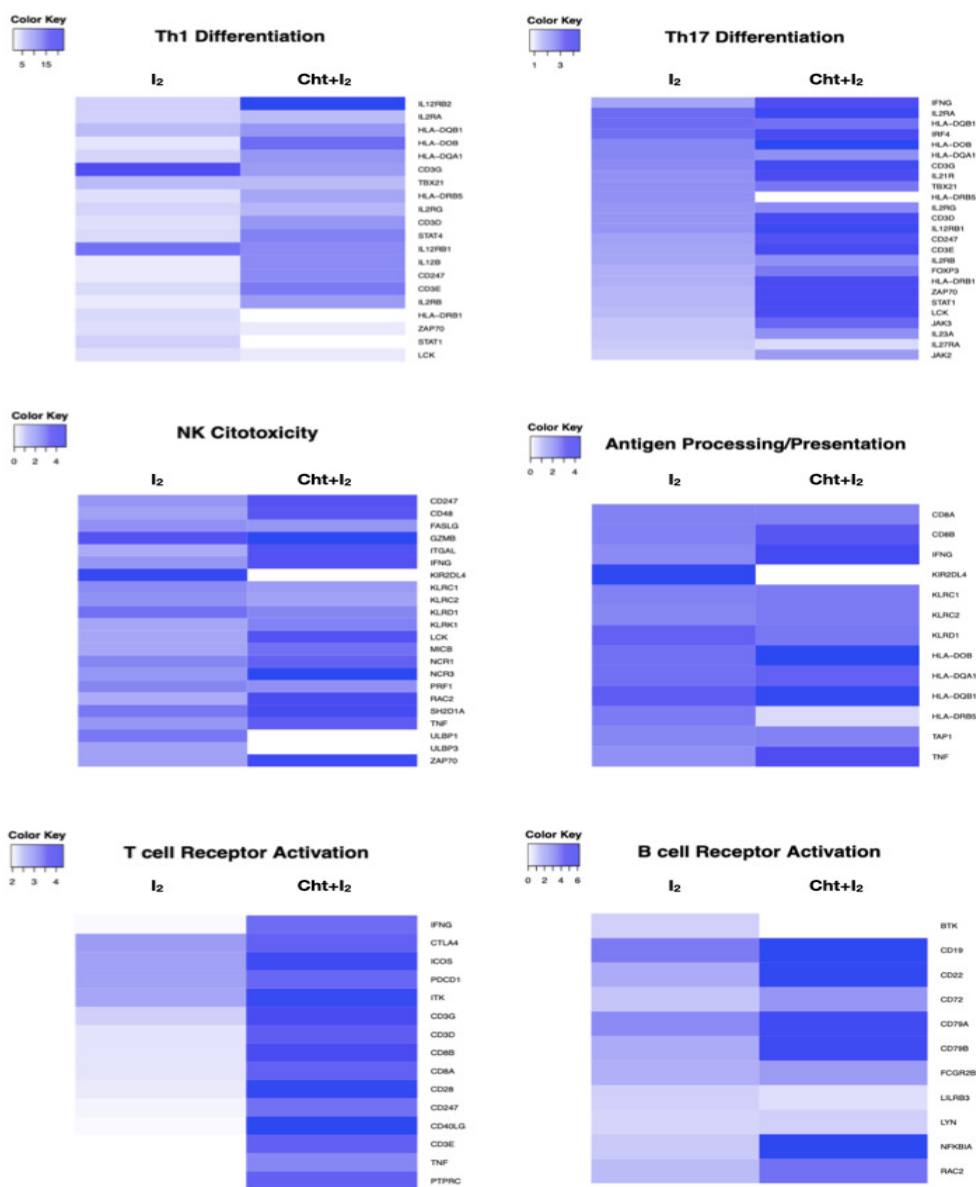


Figura 4.1.1 Rutas activas exclusivamente en los grupos que recibieron suplementación de yodo.

Como se puede observar, en las vías sobrerreguladas por yodo, la combinación de la quimioterapia con el yodo (parte derecha de cada gráfica) potencia más la activación de estas vías; los mismos genes inmunes activados por yodo tienen mayor expresión en el tratamiento combinado (Cht+I<sub>2</sub>).

El análisis de los genes clave para la diferenciación a Th1, Th2 y Treg, se presentan en la **figura 4.1.2**. Se consideró la diferenciación hacia Th1 los mensajeros: STAT1, T-bet, e interferón gamma (Ifn- $\gamma$ ), mientras que en la polarización a Th2 a GATA3 e IL-4. Las Treg se representan por FOXP3 como factor de transcripción y TGF- $\beta$  como el factor soluble que las dirige a su fenotipo final. Los resultados de expresión diferencial de genes se muestran en la **tabla 4.1.1**.

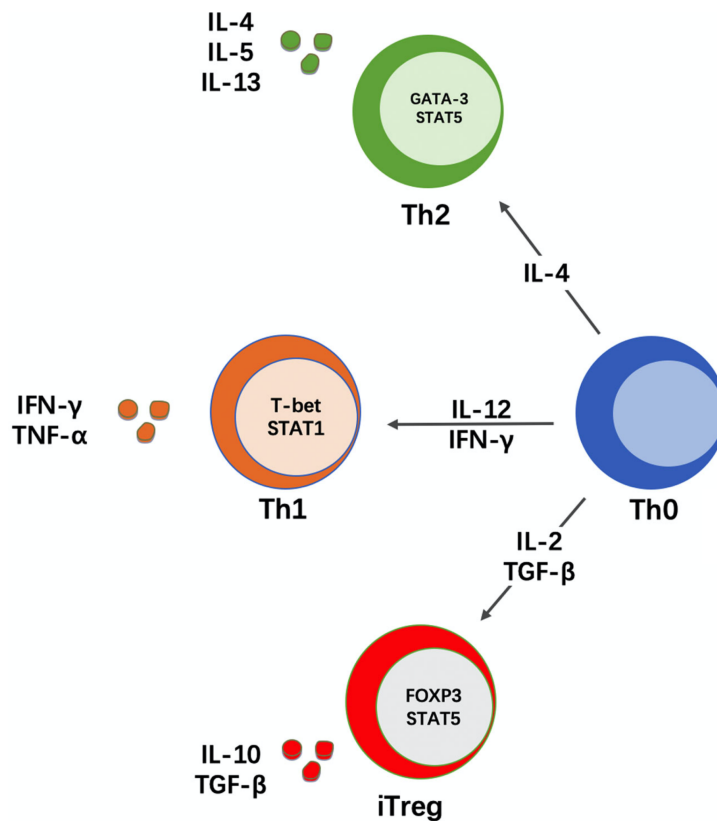


Figura 4.1.2 Moléculas solubles y factores de transcripción determinantes para la diferenciación de los fenotipos funcionales finales (Th1: antitumoral) y Th2, Treg (protumorales)

Tabla 4.1.1 Expresión diferencial en tumores de moléculas solubles y factores de transcripción determinantes para la diferenciación de los fenotipos funcionales finales (Th1: antitumoral), Th2 y Treg (protumorales).

GEN	Placebo / I2	Cht / Cht + I2
STAT1	1.73	1.36
T-BET	2.30	2.70
IFN- $\gamma$	4.00	3.32
GATA3	-2.45	-1.20
IL-4	SC	SC
FOXP3	1.80	2.60
TGF- $\beta$	-1.77	-1.16

Las cifras positivas muestran activación transcripcional del gen (se expresa en veces de más de activación comparada con los grupos sin yodo). Las cifras negativas muestran un silenciamiento de esos genes por suplemento de yodo.

Como se observa en la tabla, todos los genes clave de actividad de Th1 se encuentran sobreexpresados en los transcriptomas de tumores tratados con yodo (combinados con Cht y sólo). En relación a Th2 y Treg, se observa que la firma génica de GATA3, componente clave para la diferenciación a Th2, está disminuida al igual que el factor molecular TGF- $\beta$ . Se examinó de manera especial el gen de IFN- $\gamma$ , que mostró sus niveles de transcripción sobre regulados de manera significativa. IFN- $\gamma$  se ha postulado como la molécula efectora más importante de la respuesta citotóxica antitumoral y directora de la polarización de macrófagos hacia fenotipo M1,

La **Figura 4.1.3** muestra análisis de deconvolución mediante dos software distintos. En la deconvolución mediante EPIC se observa en los tumores con grupos de suplementación con yodo muestran un aumento relativo de Macrófagos M0 (grupo I2) y linfocitos B (Cht/ Cht+I2). Los resultados de deconvolución por ICTD: En el caso del grupo de tratamiento combinado nos arroja resultados muy similares a los vistos con EPIC, pero el aumento en el grupo de yodo lo atribuye a un aumento en la fracción de DCs. El

grupo control son dos pools de dos muestras de tejido mamario sano. El resto de grupos representan dos pool de 4 muestras individuales cada uno.

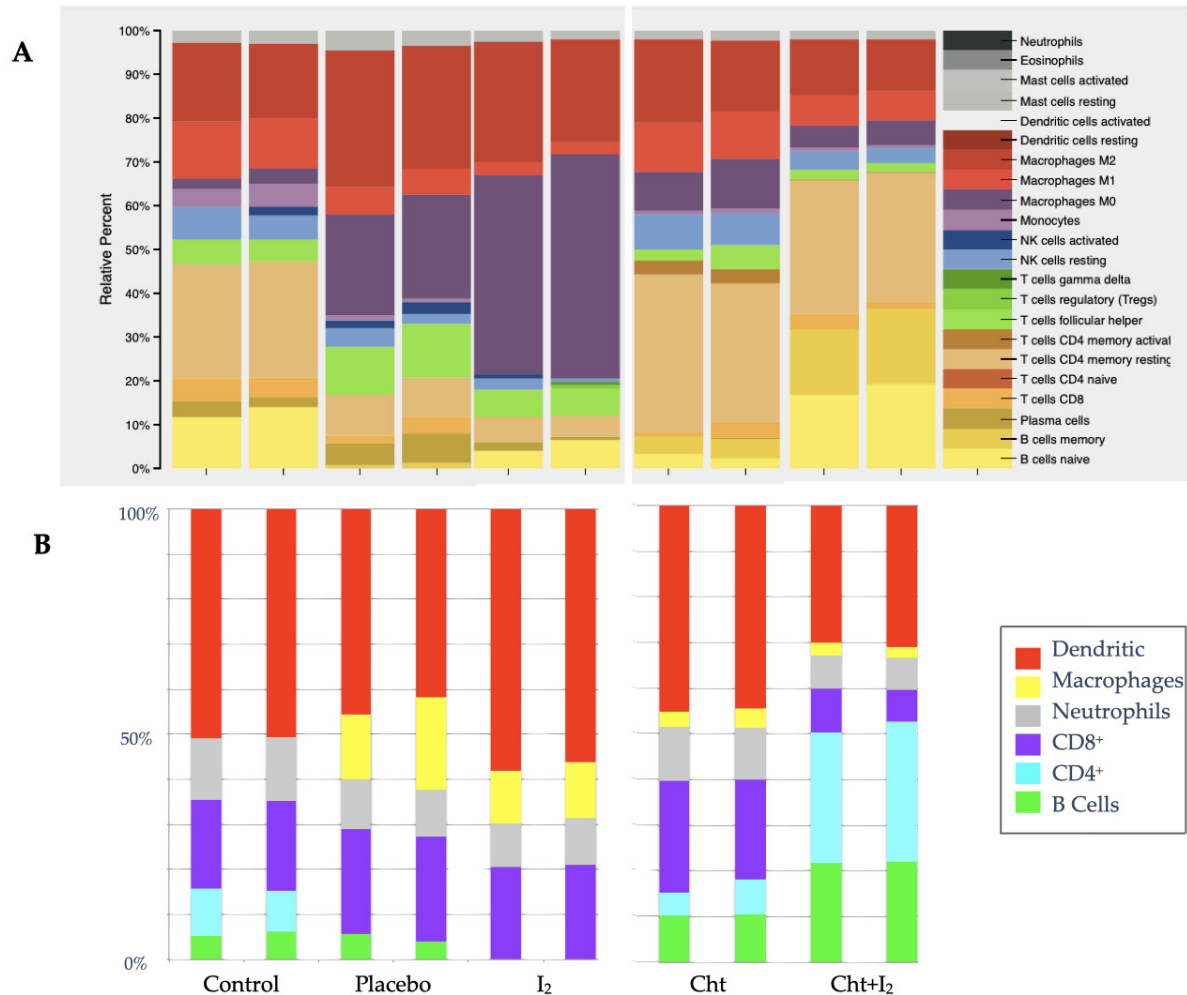


Figura 4.1.3: Resultado del análisis de deconvolución de los diferentes grupos experimentales en nuestras muestras de tumores y tejido mamario sano (control). A) Deconvolución por EPIC y B) Resultados de deconvolución por ICTD

## 4.2 Expresión génica de marcadores inmunes

Para corroborar los datos de los transcriptomas se analizó en muestras individuales la expresión de dos marcadores inmunes pro tumorales (GATA3 y TGF- $\beta$ ) y tres genes antitumorales (T-BET, IL-12R $\beta$ 1 y IFN- $\gamma$ ) (**Figura 4.2.1**). Se observó que los individuos tratados con yodo muestran una expresión diferencial de estos marcadores inmunes:

aumenta la expresión de T-BET e IFN- $\gamma$  y disminuye la expresión de GATA3 y TGF- $\beta$  (Cuenca-Micó et al., 2021).

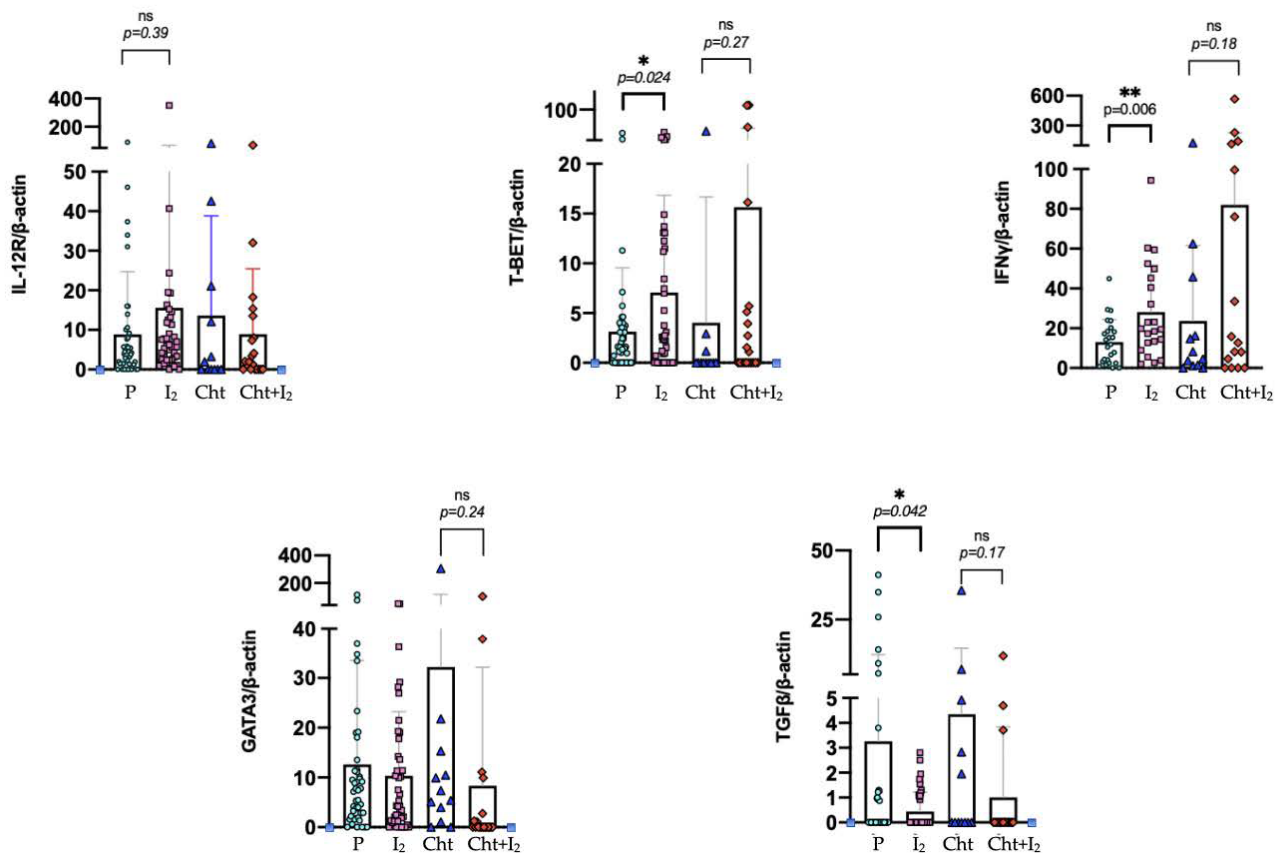


Figura 4.2.1 Expresión individual de los marcadores antitumorales (IL-12RB, T-BET e IFN- $\gamma$ ) y de progresión tumoral GATA3 y TGF- $\beta$ .

### 4.3 Pruebas inmunohistoquímicas

Para confirmar los niveles de expresión génica a nivel de RNAm con la cantidad de proteína asociada, se realizaron pruebas inmunohistoquímicas (IHQs) de dos componentes claves en la activación del sistema inmune intratumoral y su mantenimiento. Se analizaron las proteínas de respuesta Th1: T-BET e IFN $\gamma$  en tumores de pacientes en estadio II (**figura 4.3.1**). Estos análisis mostraron un aumento de ambas proteínas en los tumores de pacientes suplementadas con I<sub>2</sub>.



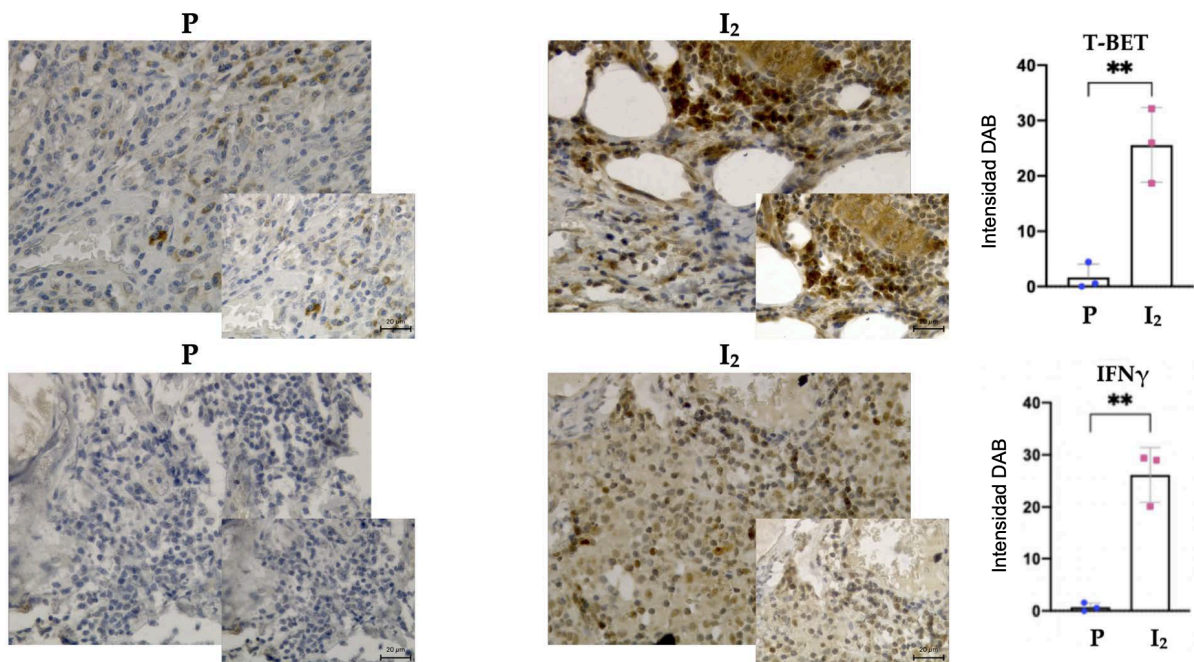


Figura 4.3.1 Expresión proteica de T-BET e IFN $\gamma$  en muestras individuales de tejido tumoral de pacientes en etapa temprana (P; Placebo, I<sub>2</sub>; yodo). Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos de inmunohímica independientes de tres muestras individuales. Prueba t de Student \*\*  $p < 0,05$ . ( 40x y 63x).

#### 4.4 Cambios en la metilación de promotores

El objetivo de esta parte del estudio fue analizar si la suplementación con yodo generaba cambios en los patrones de metilación en los genes, con cambios de expresión estadísticamente significativos. Se analizaron los patrones de metilación de los promotores de IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ . Para analizar diferencias se generan oligonucleótidos que sólo se unen si el promotor muestra metilación y otros que sólo se unirán a promotores desmetilados. Se observó (**Figura 4.4.1**) que en el grupo de yodo se detecta mayor cantidad del promotor de IFN- $\gamma$  desmetilado (tanto en estadio II como en III, pero sin diferencias significativas ( $p=0.051$ )). A su vez, TGF- $\beta$  mostró una disminución notoria en sus niveles de promotor metilado; se observa cómo las pacientes que combinaron quimioterapia con yodo apenas muestran el promotor de este gen desmetilado (comparado con el grupo que sólo recibió la quimioterapia  $p=0.049$ ).

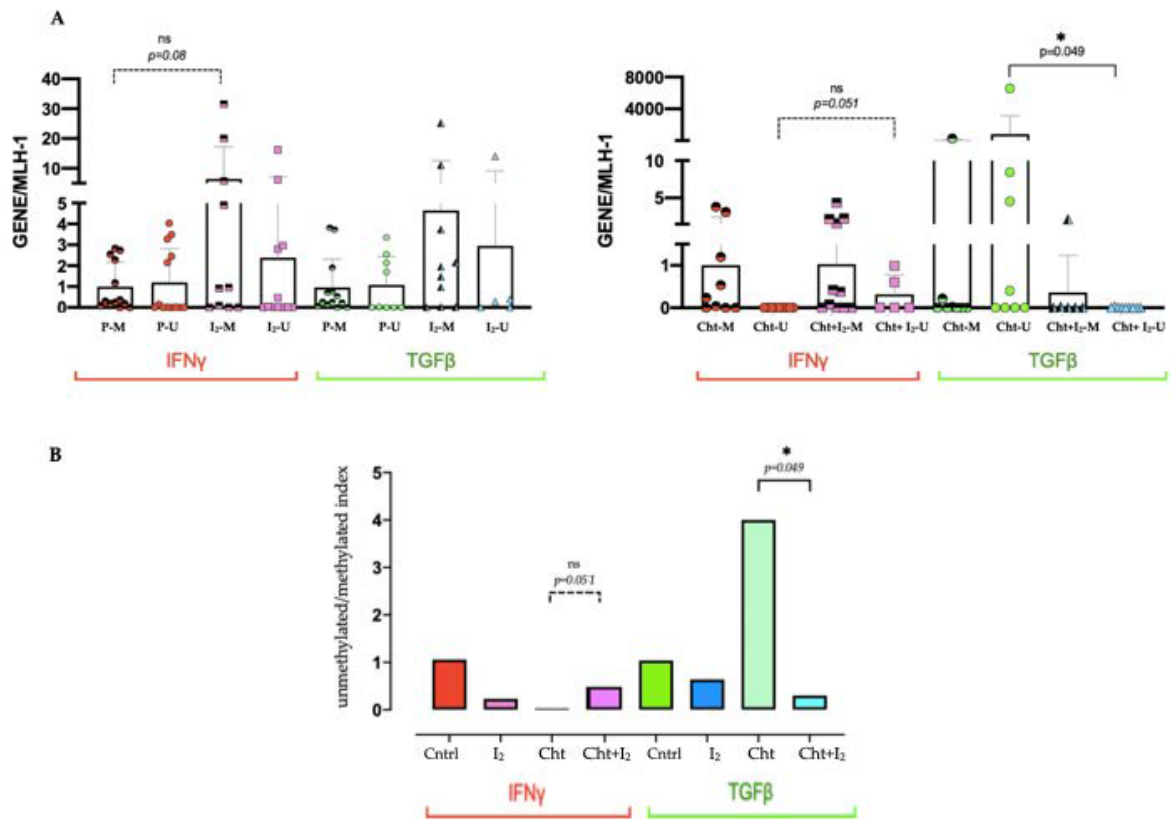


Figura 4.4.1 Patrón de metilación de los promotores de los genes IFN $\gamma$  y TGF $\beta$ . (A) Amplificación de los promotores (qPCR) de formas no metiladas (U) o metiladas (M) en muestras individuales. La cuantificación se normaliza mediante la expresión del gen constitutivo MLH-1. Panel izquierdo estadio II y panel derecho estadio III. (B) Índice no metilado/metilado (división de medios) de cada gen. Control, control; I $_2$ , yodo; Cht, quimioterapia; Cht+I $_2$ , Quimioterapia más yodo. Prueba t de Student \*  $p < 0,05$ .

En conclusión, los hallazgos preliminares de este estudio indican que el I $_2$ , cuando se usa junto con la quimioterapia convencional, induce la activación inmunitaria intratumoral y redirige la respuesta a la vía Th1. La activación de CTL, así como la disminución de marcadores inmunes pro tumorales, se produce (entre otros mecanismos) a través de cambios epigenéticos en los promotores de genes clave de respuesta inmune.

## VI. DISCUSIÓN

Evitar la destrucción y la inflamación que promueve el tumor en el microambiente tumoral son características del inicio del cáncer, y el componente inmunitario desempeña un papel clave en la progresión y la metástasis (Tower et al., 2019). El reconocimiento de la importancia crítica del componente microambiental ha resultado en un cambio en las estrategias terapéuticas, poniendo mayor énfasis en los tratamientos que incluyen su modulación. Si bien las terapias de bloqueo de CTLA-4 y PD-1 y las células CAR-T son actualmente las formas más efectivas para reactivar el sistema inmunitario antitumoral, otros componentes, algunos de origen natural, pueden reactivar el sistema inmunitario anti tumoral y mejorar las terapias convencionales (Arroyo-Helguera et al., 2006).

El yodo molecular es un micronutriente que muestra propiedades antineoplásicas en estudios preclínicos y clínicos de cáncer de mama (Zambrano-Estrada et al., 2018)(Alfaro et al., 2013; Arroyo-Helguera et al., 2006).

Los mecanismos de acción incluyen acciones antioxidantes directas como la neutralización de ROS y la modulación de la funcionalidad mitocondrial, así como acciones indirectas mediante la activación de receptores PPAR $\gamma$ , desencadenan la apoptosis y la rediferenciación celular (Aceves et al., 2009; Chaudhari et al., 2009; Moreno-Vega et al., 2019; Nunez-Anita et al., 2011; Shrivastava et al., 2006).

En un análisis previo de este estudio se demostró que el suplemento de I<sub>2</sub> más quimioterapia generó la mejor respuesta antitumoral (menor tamaño del tumor y cancelación de la quimiorresistencia) y aumentó la supervivencia libre de enfermedad del 63 al 92% en cinco años en pacientes que recibieron el suplemento de I<sub>2</sub> antes y después de la cirugía (Moreno-Vega et al., 2019). El análisis transcriptómico mostró que el I<sub>2</sub> promovía la respuesta antitumoral (Th1), aumentando la presencia y actividad citotóxica de células NK y CD8 + intratumorales.

En el presente trabajo, el análisis específico del perfil inmunológico mostró que el I<sub>2</sub> generalmente activa tanto la vía inmune anti-oncogénica como oncogénica (Th1, Th17), y que la presencia de quimioterapia potencia el efecto antitumoral de I<sub>2</sub>, como la escala de respuesta en estos tumores (Cht+I<sub>2</sub>) fue más del doble. Las células B infiltrantes de tumores (TIL-B) en el cáncer de mama se han asociado previamente con mejores resultados clínicos (Denkert et al, 2010;

Mahmoud et al, 2015). El análisis de deconvolución mostró que el I<sub>2</sub> aumenta la cantidad de M0 (o células dendríticas) y linfocitos B, corroborando la preponderancia de la respuesta antitumoral. Los linfocitos M0 mantienen la expresión de sus moléculas de MHC II en su superficie permitiéndolos activar linfocitos T. Los dos subtipos de células B aumentadas eran células B vírgenes y células B de memoria.

Las respuestas de las células B y la producción de citocinas están reguladas por su microambiente inmunitario.

El IFN- $\gamma$  es producido por Th1, células T asesinas naturales (NKT) y células asesinas naturales (NK). Su producción es inducida por IL-12 e IL-18 e inhibida por IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$  (Schroder et al, 2004). Esta regulación refleja su fuerte asociación con las respuestas de tipo 1 impulsadas por células polarizadas Th1, que producen grandes cantidades de IFN- $\gamma$  (Bradley et al, 1996). IFN- $\gamma$  puede inducir la proliferación de células B (Johnson-Leger et al, 1997). Esto sugiere una fina adaptación de la respuesta inmune humoral por IFN- $\gamma$ . Las células B vírgenes activadas inhiben la expansión de las células TH17 a través de la vía PD-1/PD-L1 y promueven la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes en células TH1 mediante la secreción de IL-27/IL-6. (X.-Z. Wu et al., 2018), mientras que las células B de memoria pueden montar una respuesta rápida de anticuerpos, controlando eficazmente el crecimiento tumoral (Largeot et al., 2019). Los linfocitos y los macrófagos son células altamente plásticas que pueden cambiar su fenotipo en respuesta a su microambiente. Por ejemplo, los macrófagos pueden cambiar reversiblemente su fenotipo funcional a través de una multitud de patrones en respuesta a cambios en el entorno de citoquinas. Los macrófagos muestran patrones funcionales distintivos después del tratamiento con IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 o IL-10 y se muestran patrones funcionales adicionales dependiendo de si la citoquina está presente sola o con otras citoquinas y si las citoquinas se agregan antes o después. concomitantemente con el estímulo activador (LPS). (Stout et al., 2005). En el caso de linfocitos, la flexibilidad o la estabilidad de las células T se representan como una serie de transiciones menos estables hacia estados más estables, que incluyen los mecanismos de metilación del ADN, modificaciones de las histonas y la presencia de los micro ARN (ácido ribonucleico). (van den Ham & de Boer, 2008; Hernández et al, 2018).

El aumento de la síntesis de IFN $\gamma$  se ha asociado con un mejor pronóstico tanto por la inhibición de la polarización inmunitaria oncogénica Th2 y M2 como por la disminución de la capacidad angiogénica (Beatty & Paterson, 2001). Nuestros resultados no solo muestran un aumento en la expresión de RNAm y el contenido de proteínas de IFN $\gamma$ , sino también la activación de la vía Th1 a

través de la expresión de T-BET, que es el principal regulador de IFN $\gamma$ . T-BET (codificado por TBX21) es un miembro específico de células inmunitarias de la familia de factores de transcripción T-box. Se expresa en una variedad de células inmunitarias, incluidas las células dendríticas, NK, CD4 + y CD8 +, células B y un subtipo de Treg. Las células T-BET+ funcionan como linfocitos antitumorales al aumentar la producción de citoquinas como IFN $\gamma$  (Das et al., 2015).

Estudios previos han demostrado que la presencia de células linfoides T-BET+ intratumorales se correlaciona con un buen pronóstico en todos los cánceres de mama (Mori et al., 2019). Descubrimos que la combinación de Cht+I2 no solo promueve los patrones de expresión de Th1 en tumores en etapa avanzada, sino que también induce el silenciamiento de jugadores clave de Th2 como GATA3. Este factor de transcripción juega un papel fundamental en el desarrollo de las células T en el timo. Además, GATA3 controla la diferenciación de las células T CD4 vírgenes e induce la remodelación de los loci de la cromatina de las citocinas Th2 y es un represor activo de la expresión de IFN $\gamma$  (Yamashita et al., 2004). Los mecanismos por los cuales I2 induce este efecto de transdiferenciación en el microambiente tumoral han recibido escasa atención. Sin embargo, está bien descrito que los componentes de modulación inmune están regulados por mecanismos epigenéticos, en los que podrían intervenir factores naturales derivados de la dieta (Calle-Fabregat et al., 2020; Mirza et al., 2018). De hecho, en la progresión del cáncer, muchos de los cambios en los patrones de expresión están regulados a nivel epigenético por la metilación/desmetilación en los promotores de genes (Gerhauser, 2012).

Recientemente, el ácido ascórbico ha recibido gran atención ya que este micronutriente participa como cofactor de las enzimas TET (ten once translocaciones) implicadas en la desmetilación de histonas y DNA y, por tanto, en la regulación epigenética de la expresión génica (Shenoy et al., 2017). Las proteínas TET convierten la 5-metilcitosina (5mC) en 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y finalmente en 5-carboxitosina (5caC). Luego, 5fC y 5caC son reemplazados por citosina por la maquinaria de reparación de escisión de bases (X. Wu & Zhang, 2017). El ácido ascórbico aumenta la producción de 5hmC dependiente de TET e induce la desmetilación de citosina en mamíferos (R. Yin et al., 2013). Además, en un modelo de ratón con linfoma, el epigenoma intratumoral reveló un aumento global de 5hmC después del tratamiento con ácido ascórbico en presencia de PD1, lo que sugiere un efecto directo del ácido ascórbico sobre las células T CD8+ y su función citotóxica. El I2 ejerce efectos antioxidantes de la misma manera que lo hace el ácido ascórbico, mediante la producción de electrones, y en las reacciones férricas

que miden su capacidad, el I<sub>2</sub> es 10 veces más potente que el ácido ascórbico (Luchtel et al., 2020). Hasta donde sabemos, actualmente no hay estudios que examinen el papel de I<sub>2</sub> en la funcionalidad de los TET.

## VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En conclusión, los hallazgos preliminares de este estudio indican que el I<sub>2</sub>, cuando se usa junto con la quimioterapia convencional, induce la activación inmunitaria intratumoral y redirige la respuesta a la vía Th1. La activación de CTL, así como la disminución de marcadores inmunes pro tumorales, se produce (entre otros mecanismos) a través de cambios epigenéticos en los promotores de genes clave de respuesta inmune. Estos resultados moleculares se relacionan directamente con lo que ya se conocía a nivel clínico: el suplemento de I<sub>2</sub> más quimioterapia disminuía el tamaño del tumor, cancelaba la quimiorresistencia y aumentaba la supervivencia libre de enfermedad del 63 al 92% en cinco años (Moreno-Vega et al., 2019).

Además, el presente trabajo se relaciona de una manera hermosa con otros estudios donde marcadores inmunes como IFN $\gamma$  (Tartour et al., 1998), IL-4 (Chang et al., 2015) o TGF- $\beta$  (Gwak et al., 2015) se asocian (directa o inversamente proporcional) con supervivencia y tiempo libre de enfermedad en varios tipos de cánceres sólidos. Mostrando que la suplementación de I<sub>2</sub>, un micronutriente esencial, modifica los fenotipos de células inmunes intratumorales, que generan marcadores solubles de mejor pronóstico que se traducen en mayor periodo libre de enfermedad.

En cuanto a las perspectivas, a nivel epigenético se pueden analizar mejor las diferencias entre grupos secuenciando el genoma para hallar las marcas de metilación diferenciales. Además, se estudiaron marcadores de activación de CD8+ como PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3 a nivel de expresión diferencial. Todos estos marcadores, que se necesitan intratumorales para el éxito de las inmunoterapias se encuentran sobreexpresados en los grupos de pacientes suplementadas, con lo que lo próximo sería investigar la suplementación de I<sub>2</sub> junto con tratamientos de inmunoterapia y ver si, el cambio intratumoral que se produce es suficiente como para coadyuvar al tratamiento y mejorar así la tasa de éxito



## VI. LITERATURA CITADA

- Acerbi, I., Cassereau, L., Dean, I., Shi, Q., Au, A., Park, C., Chen, Y. Y., Liphardt, J., Hwang, E. S., & Weaver, V. M. (2015). Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 7(10), 1120–1134.
- Aceves, C., Anguiano, B., & Delgado, G. (2005). Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland? *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10(2), 189–196.
- Aceves, C., García-Solís, P., Arroyo-Helguera, O., Vega-Riveroll, L., Delgado, G., & Anguiano, B. (2009). Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer: participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Molecular Cancer*, 8, 33.
- Aceves, C., Mendieta, I., Anguiano, B., & Delgado-González, E. (2021). Molecular Iodine Has Extrathyroidal Effects as an Antioxidant, Differentiator, and Immunomodulator. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3). <https://doi.org/10.3390/ijms22031228>
- Alfaro, Y., Delgado, G., Cárabez, A., Anguiano, B., & Aceves, C. (2013). Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition, and cardioprotection. *Molecular Cancer*, 12, 45.
- Ali, H. R., Provenzano, E., Dawson, S.-J., Blows, F. M., Liu, B., Shah, M., Earl, H. M., Poole, C. J., Hiller, L., Dunn, J. A., Bowden, S. J., Twelves, C., Bartlett, J. M. S., Mahmoud, S. M. A., Rakha, E., Ellis, I. O., Liu, S., Gao, D., Nielsen, T. O., ... Caldas, C. (2014). Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 25(8), 1536–1543.
- Álvarez-Errico, D., Vento-Tormo, R., Sieweke, M., & Ballestar, E. (2015). Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function. *Nature Reviews. Immunology*, 15(1), 7–17.
- Arroyo-Helguera, O., Anguiano, B., Delgado, G., & Aceves, C. (2006). Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocrine-Related Cancer*, 13(4), 1147–1158.
- Au-Yeung, K. K. W., Yip, J. C. W., Siow, Y. L., & Karmin, O. (2006). Folic acid inhibits homocysteine-induced superoxide anion production and nuclear factor kappa B activation

in macrophages This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled Young Investigator's Forum. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* (Vol. 84, Issue 1, pp. 141–147). <https://doi.org/10.1139/y05-136>

Azizi, E., Carr, A. J., Plitas, G., Cornish, A. E., Konopacki, C., Prabhakaran, S., Nainys, J., Wu, K., Kiseliovas, V., Setty, M., Choi, K., Fromme, R. M., Dao, P., McKenney, P. T., Wasti, R. C., Kadaveru, K., Mazutis, L., Rudensky, A. Y., & Pe'er, D. (2018). Single-Cell Map of Diverse Immune Phenotypes in the Breast Tumor Microenvironment. *Cell*, *174*(5), 1293–1308.e36.

Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2010). Vitamin D: modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology*, *10*(4), 482–496.

Beatty, G. L., & Paterson, Y. (2001). IFN- $\gamma$ -Dependent Inhibition of Tumor Angiogenesis by Tumor-Infiltrating CD4 T Cells Requires Tumor Responsiveness to IFN- $\gamma$ . In *The Journal of Immunology* (Vol. 166, Issue 4, pp. 2276–2282). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2276>

Bingle, L., Brown, N. J., & Lewis, C. E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. In *The Journal of Pathology* (Vol. 196, Issue 3, pp. 254–265). <https://doi.org/10.1002/path.1027>

Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., Coussens, L. M., Gaborivich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C. C., Vonderheide, R. H., Pittet, M. J., Jain, R. K., Zou, W., Howcroft, T. K., Woodhouse, E. C., Weinberg, R. A., & Krummel, M. F. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine*, *24*(5), 541–550.

Biragyn, A., & Longo, D. L. (2012). Neoplastic “Black Ops”: Cancer’s subversive tactics in overcoming host defenses. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 22, Issue 1, pp. 50–59). <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.005>

Bissell, M. J., & Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 1, Issue 1, pp. 46–54). <https://doi.org/10.1038/35094059>

Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, *11*(10), 889–896.

Bogen, B., Fauskanger, M., Haabeth, O. A., & Tveita, A. (2019). CD4 T cells indirectly kill tumor



cells via induction of cytotoxic macrophages in mouse models. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 68(11), 1865–1873.

- Bradley, L. M., Dalton, D. K., & Croft, M. (1996). A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *The Journal of Immunology*, 157(4), 1350-1358.
- Bray, F., Ferlay, J., Laversanne, M., Brewster, D. H., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., Piñeros, M., Steliarova-Foucher, E., Swaminathan, R., Antoni, S., Soerjomataram, I., & Forman, D. (2015). Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration. In *International Journal of Cancer* (Vol. 137, Issue 9, pp. 2060–2071). <https://doi.org/10.1002/ijc.29670>
- Bröske, A.-M., Vockentanz, L., Kharazi, S., Huska, M. R., Mancini, E., Scheller, M., Kuhl, C., Enns, A., Prinz, M., Jaenisch, R., Nerlov, C., Leutz, A., Andrade-Navarro, M. A., Jacobsen, S. E. W., & Rosenbauer, F. (2009). DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nature Genetics*, 41(11), 1207–1215.
- Burnet, F. M. (n.d.). The Concept of Immunological Surveillance. In *Progress in Tumor Research* (pp. 1–27). <https://doi.org/10.1159/000386035>
- Calle-Fabregat, C. de la, de la Calle-Fabregat, C., Morante-Palacios, O., & Ballestar, E. (2020). Understanding the Relevance of DNA Methylation Changes in Immune Differentiation and Disease. In *Genes* (Vol. 11, Issue 1, p. 110). <https://doi.org/10.3390/genes11010110>
- Chang, Y., Xu, L., An, H., Fu, Q., Chen, L., Lin, Z., & Xu, J. (2015). Expression of IL-4 and IL-13 predicts recurrence and survival in localized clear-cell renal cell carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(2), 1594.
- Chang, W., Wan, C., Lu, X., Tu, S.-W., Sun, Y., Zhang, X., Zang, Y., Zhang, A., Huang, K., Liu, Y., Lu, X., Cao, S., & Zhang, C. (n.d.). *ICTD: A semi-supervised cell type identification and deconvolution method for multi-omics data*. <https://doi.org/10.1101/426593>
- Chaudhari, M., Jayaraj, R., Bhaskar, A. S. B., & Lakshmana Rao, P. V. (2009). Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells. In *Toxicology* (Vol. 262, Issue 2, pp. 153–161). <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.06.002>
- Chen, B., Khodadoust, M. S., Liu, C. L., Newman, A. M., & Alizadeh, A. A. (2018). Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT. *Methods in Molecular Biology*, 1711,

243–259.

- Chen, D. S., & Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, *541*(7637), 321–330.
- Chen, Q., Espey, M. G., Sun, A. Y., Pooput, C., Kirk, K. L., Krishna, M. C., Khosh, D. B., Drisko, J., & Levine, M. (2008). Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(32), 11105–11109.
- Cintolo, J. A., Datta, J., Mathew, S. J., & Czerniecki, B. J. (2012). Dendritic cell-based vaccines: barriers and opportunities. *Future Oncology*, *8*(10), 1273–1299.
- Clark, C. E., Hingorani, S. R., Mick, R., Combs, C., Tuveson, D. A., & Vonderheide, R. H. (2007). Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer research*, *67*(19), 9518–9527.
- Coquette, A., Vray, B., & Vanderpas, J. (1986). Role of vitamin E in the protection of the resident macrophage membrane against oxidative damage. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, *94*(5), S29–S34.
- Courtemanche, C., Elson-Schwab, I., Mashiyama, S. T., Kerry, N., & Ames, B. N. (2004). Folate deficiency inhibits the proliferation of primary human CD8+ T lymphocytes in vitro. *Journal of Immunology*, *173*(5), 3186–3192.
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, *420*(6917), 860–867.
- Cuenca-Micó, O., & Aceves, C. (2020). Micronutrients and Breast Cancer Progression: A Systematic Review. *Nutrients*, *12*(12). <https://doi.org/10.3390/nu12123613>
- Cuenca-Micó, O., Delgado-González, E., Anguiano, B., Vaca-Paniagua, F., Medina-Rivera, A., Rodríguez-Dorantes, M., & Aceves, C. (2021). Effects of Molecular Iodine/Chemotherapy in the Immune Component of Breast Cancer Tumoral Microenvironment. *Biomolecules*, *11*(10). <https://doi.org/10.3390/biom11101501>
- Dai, M., Wei, H., Yip, Y. Y., Feng, Q., He, K., Popov, V., Hellstrom, I., & Hellstrom, K. E. (2013). Long-lasting complete regression of established mouse tumors by counteracting Th2 inflammation. *Journal of Immunotherapy*, *36*(4), 248–257.
- Das, A., Sinha, M., Datta, S., Abas, M., Chaffee, S., Sen, C. K., & Roy, S. (2015). Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. In *The American Journal of*

- Pathology* (Vol. 185, Issue 10, pp. 2596–2606). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.06.001>
- Deaton, A. M., Webb, S., Kerr, A. R. W., Illingworth, R. S., Guy, J., Andrews, R., & Bird, A. (2011). Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system. *Genome Research*, *21*(7), 1074–1086.
- Dedeurwaerder, S., Desmedt, C., Calonne, E., Singhal, S. K., Haibe-Kains, B., Defrance, M., Michiels, S., Volkmar, M., Deplus, R., Luciani, J., Lallemand, F., Larsimont, D., Toussaint, J., Haussy, S., Rothé, F., Rouas, G., Metzger, O., Majjaj, S., Saini, K., ... Fuks, F. (2011). DNA methylation profiling reveals a predominant immune component in breast cancers. *EMBO Molecular Medicine*, *3*(12), 726–741.
- deLeeuw, R. J., Kost, S. E., Kakal, J. A., & Nelson, B. H. (2012). The Prognostic Value of FoxP3 Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Cancer: A Critical Review of the Literature. In *Clinical Cancer Research* (Vol. 18, Issue 11, pp. 3022–3029). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-11-3216>
- DeNardo, D. G., Andreu, P., & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Reviews*, *29*(2), 309–316.
- DeNardo, D. G., Barreto, J. B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., & Coussens, L. M. (2009). CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*, *16*(2), 91–102.
- DeNardo, D. G., Brennan, D. J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S. L., Madden, S. F., Gallagher, W. M., Wadhvani, N., Keil, S. D., Junaid, S. A., Rugo, H. S., Hwang, E. S., Jirstrom, K., West, B. L., & Coussens, L. M. (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discovery*, *1*(1), 54–67.
- Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Muller, B. M., Komor, M., ... & von Minckwitz, G. (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, *28*(1), 105-113.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, *3*(11), 991–998.

- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, *21*(2), 137–148.
- Eskin, B. A., Grotkowski, C. E., Connolly, C. P., & Ghent, W. R. (1995). Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biological Trace Element Research*, *49*(1), 9–19.
- Faulk, C., & Dolinoy, D. C. (2011). Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society*, *6*(7), 791–797.
- Flavahan, W. A., Gaskell, E., & Bernstein, B. E. (2017). Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science*, *357*(6348). <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>
- Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A. G., & Panayiotidis, M. I. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters*, *266*(1), 6–11.
- Franco, P. I. R., Rodrigues, A. P., de Menezes, L. B., & Miguel, M. P. (2020). Tumor microenvironment components: Allies of cancer progression. *Pathology-Research and Practice*, *216*(1), 152729.
- Fujimura, T., Kambayashi, Y., Fujisawa, Y., Hidaka, T., & Aiba, S. (2018). Tumor-Associated Macrophages: Therapeutic Targets for Skin Cancer. *Frontiers in Oncology*, *8*, 3.
- García-Solís, P., Alfaro, Y., Anguiano, B., Delgado, G., Guzman, R. C., Nandi, S., Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., & Aceves, C. (2005). Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I<sub>2</sub>) but not by iodide (I<sup>-</sup>) treatment Evidence that I<sub>2</sub> prevents cancer promotion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *236*(1-2), 49–57.
- Gelao, L., Criscitiello, C., Fumagalli, L., Locatelli, M., Manunta, S., Esposito, A., Minchella, I., Goldhirsch, A., & Curigliano, G. (2013). Tumour dormancy and clinical implications in breast cancer. *Ecancermedicalscience*, *7*, 320.
- Gentles, A. J., Newman, A. M., Liu, C. L., Bratman, S. V., Feng, W., Kim, D., Nair, V. S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C. D., Diehn, M., West, R. B., Plevritis, S. K., & Alizadeh, A. A. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nature Medicine*, *21*(8), 938–945.
- Gerhauser, C. (2012). Cancer Chemoprevention and Nutri-Epigenetics: State of the Art and

Future Challenges. In *Natural Products in Cancer Prevention and Therapy* (pp. 73–132).

[https://doi.org/10.1007/128\\_2012\\_360](https://doi.org/10.1007/128_2012_360)

- Ghoneim, H. E., Fan, Y., Moustaki, A., Abdelsamed, H. A., Dash, P., Dogra, P., Carter, R., Awad, W., Neale, G., Thomas, P. G., & Youngblood, B. (2017). De Novo Epigenetic Programs Inhibit PD-1 Blockade-Mediated T Cell Rejuvenation. *Cell*, *170*(1), 142–157.e19.
- Gillberg, L., Ørskov, A. D., Liu, M., Harsløf, L. B. S., Jones, P. A., & Grønbaek, K. (2018). Vitamin C - A new player in regulation of the cancer epigenome. *Seminars in Cancer Biology*, *51*, 59–67.
- 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. K., Michiels, S., Rothé, F., Salgado, R., Duvillier, H., Ignatiadis, M., Desmedt, C., ... Willard-Gallo, K. (2013). CD4<sup>+</sup> follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(7), 2873–2892.
- Gwak, J. M., Jang, M. H., Kim, D. I., Seo, A. N., & Park, S. Y. (2015). Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. *PloS one*, *10*(4), e0125728.
- Harbeck, N. (2020). Breast cancer is a systemic disease optimally treated by a multidisciplinary team [Review of *Breast cancer is a systemic disease optimally treated by a multidisciplinary team*]. *Nature Reviews. Disease Primers*, *6*(1), 30.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, *5*(1), 66.
- Hassan, G., Afify, S. M., Kitano, S., Seno, A., Ishii, H., Shang, Y., Matsusaki, M., & Seno, M. (2020). Cancer Stem Cell Microenvironment Models with Biomaterial Scaffolds In Vitro. In *Processes* (Vol. 9, Issue 1, p. 45). <https://doi.org/10.3390/pr9010045>
- Henning, A. N., Roychoudhuri, R., & Restifo, N. P. (2018). Epigenetic control of CD8 T cell differentiation. *Nature Reviews. Immunology*, *18*(5), 340–356.
- Hernández, J. S. B., & Formigo, G. M. S. (2018). Epigenetic mechanisms in plasticity and flexibility of the CD4 T cells. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, *34*(1), 42-50.

- Heusinkveld, M., de Vos van Steenwijk, P. J., Goedemans, R., Ramwadhoebe, T. H., Gorter, A., Welters, M. J. P., van Hall, T., & van der Burg, S. H. (2011). M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *Journal of Immunology*, *187*(3), 1157–1165.
- Heyn, H., Vidal, E., Ferreira, H. J., Vizoso, M., Sayols, S., Gomez, A., Moran, S., Boque-Sastre, R., Guil, S., Martinez-Cardus, A., Lin, C. Y., Royo, R., Sanchez-Mut, J. V., Martinez, R., Gut, M., Torrents, D., Orozco, M., Gut, I., Young, R. A., & Esteller, M. (2016). Epigenomic analysis detects aberrant super-enhancer DNA methylation in human cancer. *Genome Biology*, *17*, 11.
- Hitchler, M. J., Wikainapakul, K., Yu, L., Powers, K., Attatippaholkun, W., & Domann, F. E. (2006). Epigenetic regulation of manganese superoxide dismutase expression in human breast cancer cells. *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society*, *1*(4), 163–171.
- Jabłońska, E., & Reszka, E. (2017). Selenium and Epigenetics in Cancer: Focus on DNA Methylation. *Advances in Cancer Research*, *136*, 193–234.
- Jacobsen, S. C., Brøns, C., Bork-Jensen, J., Ribel-Madsen, R., Yang, B., Lara, E., Hall, E., Calvanese, V., Nilsson, E., Jørgensen, S. W., Mandrup, S., Ling, C., Fernandez, A. F., Fraga, M. F., Poulsen, P., & Vaag, A. (2012). Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. *Diabetologia*, *55*(12), 3341–3349.
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, *33 Suppl*, 245–254.
- Johnson-Leger, C., Hasbold, J., Holman, M., & Klaus, G. G. (1997). The effects of IFN-gamma on CD40-mediated activation of B cells from X-linked immunodeficient or normal mice. *The Journal of Immunology*, *159*(3), 1150-1159.
- Kalinski, P., & Talmadge, J. E. (2017). Tumor Immuno-Environment in Cancer Progression and Therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1036*, 1–18.
- Kanduri, K., Tripathi, S., Larjo, A., Mannerström, H., Ullah, U., Lund, R., Hawkins, R. D., Ren, B., Lähdesmäki, H., & Lahesmaa, R. (2015). Identification of global regulators of T-helper cell lineage specification. *Genome Medicine*, *7*, 122.

- Kenny, P. A., Lee, G. Y., & Bissell, M. J. (2007). Targeting the tumor microenvironment. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, *12*, 3468–3474.
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, *121*(1), 1–14.
- Kohrt, H. E., Nouri, N., Nowels, K., Johnson, D., Holmes, S., & Lee, P. P. (2005). Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Medicine*, *2*(9), e284.
- Kratochvill, F., Neale, G., Haverkamp, J. M., Van de Velde, L.-A., Smith, A. M., Kawauchi, D., McEvoy, J., Roussel, M. F., Dyer, M. A., Qualls, J. E., & Murray, P. J. (2015). TNF Counterbalances the Emergence of M2 Tumor Macrophages. *Cell Reports*, *12*(11), 1902–1914.
- Kuiper, C., & Vissers, M. C. M. (2014). Ascorbate as a co-factor for fe- and 2-oxoglutarate dependent dioxygenases: physiological activity in tumor growth and progression. *Frontiers in Oncology*, *4*, 359.
- Laoui, D., Van Overmeire, E., Di Conza, G., Aldeni, C., Keirsse, J., Morias, Y., Movahedi, K., Houbracken, I., Schouppe, E., Elkrim, Y., Karroum, O., Jordan, B., Carmeliet, P., Gysemans, C., De Baetselier, P., Mazzone, M., & Van Ginderachter, J. A. (2014). Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Research*, *74*(1), 24–30.
- Largeot, A., Pagano, G., Gonder, S., Moussay, E., & Paggetti, J. (2019). The B-Side of Cancer Immunity: The Underrated Tune. In *Cells* (Vol. 8, Issue 5, p. 449). <https://doi.org/10.3390/cells8050449>
- Lesterhuis, W. J., Haanen, J. B. A. G., & Punt, C. J. A. (2011). Cancer immunotherapy--revisited. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *10*(8), 591–600.
- Lewis, C. E., & Pollard, J. W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research*, *66*(2), 605–612.
- Lin, Y., Xu, J., & Lan, H. (2019). Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1), 76.
- Liu, Q., Song, J., Pan, Y., Shi, D., Yang, C., Wang, S., & Xiong, B. (2020). Wnt5a/CaMKII/ERK/CCL2 axis is required for tumor-associated macrophages to promote

colorectal cancer progression. *International Journal of Biological Sciences*, 16(6), 1023–1034.

- Liu, Y.-C., Zou, X.-B., Chai, Y.-F., & Yao, Y.-M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 520–529.
- Li, Y., Gorelik, G., Strickland, F. M., & Richardson, B. C. (2014). Oxidative stress, T cell DNA methylation, and lupus. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 66(6), 1574–1582.
- Luchtel, R. A., Bhagat, T., Pradhan, K., Jacobs, W. R., Levine, M., Verma, A., & Shenoy, N. (2020). High-dose ascorbic acid synergizes with anti-PD1 in a lymphoma mouse model. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 117, Issue 3, pp. 1666–1677). <https://doi.org/10.1073/pnas.1908158117>
- Luo, N., Nixon, M. J., Gonzalez-Ericsson, P. I., Sanchez, V., Opalenik, S. R., Li, H., Zahnow, C. A., Nickels, M. L., Liu, F., Tantawy, M. N., Sanders, M. E., Manning, H. C., & Balko, J. M. (2018). DNA methyltransferase inhibition upregulates MHC-I to potentiate cytotoxic T lymphocyte responses in breast cancer. *Nature Communications*, 9(1), 248.
- Mahmoud, S. M. A., Lee, A. H. S., Paish, E. C., Macmillan, R. D., Ellis, I. O., & Green, A. R. (2012). The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast cancer research and treatment*, 132(2), 545-553.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, 23(11), 549–555.
- McCaw, T. R., Li, M., Starenki, D., Cooper, S. J., Meza-Perez, S., Arend, R. C., LoBuglio, A. F., Buchsbaum, D. J., Forero, A., & Randall, T. D. (n.d.). *The expression of class II major histocompatibility molecules on breast tumors delays T cell exhaustion, expands the T cell repertoire and slows tumor growth*. <https://doi.org/10.1101/294124>
- Melaiu, O., Chierici, M., Lucarini, V., Jurman, G., Conti, L. A., De Vito, R., Boldrini, R., Cifaldi, L., Castellano, A., Furlanello, C., Barnaba, V., Locatelli, F., & Fruci, D. (2020). Cellular and gene signatures of tumor-infiltrating dendritic cells and natural-killer cells predict prognosis of neuroblastoma. *Nature Communications*, 11(1), 5992.
- Mikirova, N., Casciari, J., Rogers, A., & Taylor, P. (2012). Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients. *Journal of Translational Medicine*, 10, 189.



- Mikkelsen, K., & Apostolopoulos, V. (2019). Vitamin B12, Folic Acid, and the Immune System. In *Nutrition and Immunity* (pp. 103–114). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16073-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16073-9_6)
- Mirza, S., Shah, K., Patel, S., Jain, N., & Rawal, R. (2018). Natural Compounds as Epigenetic Regulators of Human Dendritic Cell-mediated Immune Function. *Journal of Immunotherapy*, *41*(4), 169–180.
- Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer*, *11*, 151–164.
- Moreno-Vega, A., Vega-Riveroll, L., Ayala, T., Peralta, G., Torres-Martel, J. M., Rojas, J., Mondragón, P., Domínguez, A., De Obaldía, R., Avecilla-Guerrero, C., Anguiano, B., Delgado-González, E., Zambrano-Estrada, X., Cuenca-Micó, O., De La Puente Flores, O., Varela-Echavarría, A., & Aceves, C. (2019). Adjuvant Effect of Molecular Iodine in Conventional Chemotherapy for Breast Cancer. Randomized Pilot Study. *Nutrients*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/nu11071623>
- Mori, H., Kubo, M., Kai, M., Yamada, M., Kurata, K., Kawaji, H., Kaneshiro, K., Osako, T., Nishimura, R., Arima, N., Okido, M., Kishimoto, J., Oda, Y., & Nakamura, M. (2019). T-bet lymphocytes infiltration as an independent better prognostic indicator for triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *176*(3), 569–577.
- Nagarsheth, N., Wicha, M. S., & Zou, W. (2017). Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, *17*(9), 559–572.
- Nava-Castro, K. E., Palacios-Arreola, M. I., Ostoa-Saloma, P., Muñoz-Hernández, S., Cerbón, M. A., Gomez-Icazbalceta, G., Muñoz-Cruz, S., Aguilar-Díaz, H., Pavón, L., Castro-Romero, J. I., & Morales-Montor, J. (2014). The Immunoendocrine Network in Breast Cancer. In *Advances in Neuroimmune Biology* (Vol. 5, Issue 2, pp. 109–131). <https://doi.org/10.3233/nib-140097>
- Nava-Villalba, M., Nuñez-Anita, R. E., Bontempo, A., & Aceves, C. (2015). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone. *Molecular Cancer*, *14*, 168.
- Nie, W., Yu, T., Sang, Y., & Gao, X. (2017). Tumor-promoting effect of IL-23 in mammary cancer mediated by infiltration of M2 macrophages and neutrophils in tumor

- microenvironment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 1400–1406.
- Niu, Y., DesMarais, T. L., Tong, Z., Yao, Y., & Costa, M. (2015). Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation. *Free Radical Biology & Medicine*, 82, 22–28.
- Núñez-Anita, R. E., Arroyo-Helguera, O., Cajero-Juárez, M., López-Bojorquez, L., & Aceves, C. (2009). A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 89(1-2), 34–42.
- Nunez-Anita, R. E., Cajero-Juarez, M., & Aceves, C. (2011). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Role of Isoform Gamma in the Antineoplastic Effect of Iodine in Mammary Cancer. In *Current Cancer Drug Targets* (Vol. 11, Issue 7, pp. 775–786). <https://doi.org/10.2174/156800911796798931>
- Obeid, E., Nanda, R., Fu, Y.-X., & Olopade, O. I. (2013). The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *International Journal of Oncology*, 43(1), 5–12.
- Ognik, K., Cholewińska, E., Juśkiewicz, J., Zduńczyk, Z., Tutaj, K., & Szlązak, R. (2019). The effect of copper nanoparticles and copper (II) salt on redox reactions and epigenetic changes in a rat model. In *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Vol. 103, Issue 2, pp. 675–686). <https://doi.org/10.1111/jpn.13025>
- Percival, S. S. (1998). Copper and immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5 Suppl), 1064S – 1068S.
- Pluchino, L. A., Liu, A. K.-Y., & Wang, H.-C. R. (2015). Reactive oxygen species-mediated breast cell carcinogenesis enhanced by multiple carcinogens and intervened by dietary ergosterol and mimosine. *Free Radical Biology & Medicine*, 80, 12–26.
- Qian, B.-Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1), 39–51.
- Qi, W., Huang, X., & Wang, J. (2013). Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment. *Cellular Immunology*, 285(1-2), 18–22.
- Ravichandran, M., Jurkowska, R. Z., & Jurkowski, T. P. (2018). Target specificity of mammalian DNA methylation and demethylation machinery. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 16(9),

1419–1435.

- Rayman, M. P. (2012). Selenium and human health. In *The Lancet* (Vol. 379, Issue 9822, pp. 1256–1268). [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)61452-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)61452-9)
- Rønneberg, J. A., Fleischer, T., Solvang, H. K., Nordgard, S. H., Edvardsen, H., Potapenko, I., Nebdal, D., Daviaud, C., Gut, I., Bukholm, I., Naume, B., Børresen-Dale, A.-L., Tost, J., & Kristensen, V. (2011). Methylation profiling with a panel of cancer related genes: Association with estrogen receptor, TP53 mutation status and expression subtypes in sporadic breast cancer. In *Molecular Oncology* (Vol. 5, Issue 1, pp. 61–76). <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.004>
- Schoenborn, J. R., Dorschner, M. O., Sekimata, M., Santer, D. M., Shnyreva, M., Fitzpatrick, D. R., Stamatoyannopoulos, J. A., & Wilson, C. B. (2007). Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma. *Nature Immunology*, 8(7), 732–742.
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. In *Science* (Vol. 331, Issue 6024, pp. 1565–1570). <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, 75(2), 163-189.
- Seo, A. N., Lee, H. J., Kim, E. J., Kim, H. J., Jang, M. H., Lee, H. E., Kim, Y. J., Kim, J. H., & Park, S. Y. (2013). Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 109(10), 2705–2713.
- Shenoy, N., Bhagat, T., Nieves, E., Stenson, M., Lawson, J., Choudhary, G. S., Habermann, T., Nowakowski, G., Singh, R., Wu, X., Verma, A., & Witzig, T. E. (2017). Upregulation of TET activity with ascorbic acid induces epigenetic modulation of lymphoma cells. In *Blood Cancer Journal* (Vol. 7, Issue 7, pp. e587–e587). <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.65>
- Shevach, E. M. (2009). Mechanisms of Foxp3 T Regulatory Cell-Mediated Suppression. In *Immunity* (Vol. 30, Issue 5, pp. 636–645). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.010>
- Shrivastava, A., Tiwari, M., Sinha, R. A., Kumar, A., Balapure, A. K., Bajpai, V. K., Sharma, R., Mitra, K., Tandon, A., & Godbole, M. M. (2006). Molecular iodine induces caspase-

- independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19762–19771.
- Spitzweg, C., Heufelder, A. E., & Morris, J. C. (2000). Thyroid iodine transport. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 10(4), 321–330.
- Stout, R. D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S. K., & Suttles, J. (2005). Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. In *The Journal of Immunology* (Vol. 175, Issue 1, pp. 342–349). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.1.342>
- Sun, B., Hu, L., Luo, Z.-Y., Chen, X.-P., Zhou, H.-H., & Zhang, W. (2016). DNA methylation perspectives in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clinical Immunology*, 164, 21–27.
- Sun, Z., Asmann, Y. W., Kalari, K. R., Bot, B., Eckel-Passow, J. E., Baker, T. R., Carr, J. M., Khrebtukova, I., Luo, S., Zhang, L., Schroth, G. P., Perez, E. A., & Thompson, E. A. (2011). Integrated analysis of gene expression, CpG island methylation, and gene copy number in breast cancer cells by deep sequencing. *PLoS One*, 6(2), e17490.
- Tartour, E., Gey, A., Fridman, W. H., Sastre-Garau, X., Lombard Surin, I., & Mosseri, V. (1998). Prognostic value of intratumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 90(4), 287–294.
- Teschendorff, A. E., Gomez, S., Arenas, A., El-Ashry, D., Schmidt, M., Gehrman, M., & Caldas, C. (2010). Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules. *BMC Cancer*, 10, 604.
- Tower, Tower, Ruppert, & Britt. (2019). The Immune Microenvironment of Breast Cancer Progression. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 9, p. 1375). <https://doi.org/10.3390/cancers11091375>
- van den Ham, H.-J., & de Boer, R. J. (2008). From the two-dimensional Th1 and Th2 phenotypes to high-dimensional models for gene regulation. In *International Immunology* (Vol. 20, Issue 10, pp. 1269–1277). <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn093>
- Wawruszak, A., Halasa, M., Okon, E., Kukula-Koch, W., & Stepulak, A. (2021). Valproic Acid and Breast Cancer: State of the Art in 2021. *Cancers*, 13(14).

<https://doi.org/10.3390/cancers13143409>

- Weigelt, B., & Bissell, M. J. (2008). Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 18, Issue 5, pp. 311–321). <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2008.03.013>
- Wessels, I., Haase, H., Engelhardt, G., Rink, L., & Uciechowski, P. (2013). Zinc deficiency induces production of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  in promyeloid cells via epigenetic and redox-dependent mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*(1), 289–297.
- West, N. R., Kost, S. E., Martin, S. D., Milne, K., Deleeuw, R. J., Nelson, B. H., & Watson, P. H. (2013). Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *British Journal of Cancer*, *108*(1), 155–162.
- Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, *18*(9), 517–534.
- Wu, X.-Z., Shi, X.-Y., Zhai, K., Yi, F.-S., Wang, Z., Wang, W., Pei, X.-B., Xu, L.-L., Wang, Z., & Shi, H.-Z. (2018). Activated naïve B cells promote development of malignant pleural effusion by differential regulation of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>17 response. In *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* (Vol. 315, Issue 3, pp. L443–L455). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00120.2018>
- Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, *496*(7446), 445–455.
- Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Miyamoto, T., Sugaya, K., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Kimura, M., Taniguchi, M., DeGregori, J., & Nakayama, T. (2004). Essential Role of GATA3 for the Maintenance of Type 2 Helper T (Th2) Cytokine Production and Chromatin Remodeling at the Th2 Cytokine Gene Loci. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 279, Issue 26, pp. 26983–26990). <https://doi.org/10.1074/jbc.m403688200>
- Yaqoob, P. (2003). Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. In *Trends in Immunology* (Vol. 24, Issue 12, pp. 639–645). <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.10.002>
- Yin, R., Mao, S.-Q., Zhao, B., Chong, Z., Yang, Y., Zhao, C., Zhang, D., Huang, H., Gao, J., Li, Z., Jiao, Y., Li, C., Liu, S., Wu, D., Gu, W., Yang, Y.-G., Xu, G.-L., & Wang, H. (2013).

- Ascorbic Acid Enhances Tet-Mediated 5-Methylcytosine Oxidation and Promotes DNA Demethylation in Mammals. In *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 135, Issue 28, pp. 10396–10403). <https://doi.org/10.1021/ja4028346>
- Yin, X., & Xu, Y. (2016). Structure and Function of TET Enzymes. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 275–302). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_12)
- Yuan, Z.-Y., Luo, R.-Z., Peng, R.-J., Wang, S.-S., & Xue, C. (2014). High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *OncoTargets and Therapy*, 7, 1475–1480.
- Yue, X., & Rao, A. (2020). TET family dioxygenases and the TET activator vitamin C in immune responses and cancer. *Blood*, 136(12), 1394–1401.
- Zambrano-Estrada, X., Landaverde-Quiroz, B., Dueñas-Bocanegra, A. A., De Paz-Campos, M. A., Hernández-Alberto, G., Solorio-Perusquia, B., Trejo-Mandujano, M., Pérez-Guerrero, L., Delgado-González, E., Anguiano, B., & Aceves, C. (2018). Molecular iodine/doxorubicin neoadjuvant treatment impair invasive capacity and attenuate side effect in canine mammary cancer. In *BMC Veterinary Research* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1411-6>
- Zhao, Y., Wu, T., Shao, S., Shi, B., & Zhao, Y. (2016). Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*, 5(2), e1004983.
- Zhdankin, V. V., & Stang, P. J. (2008). Chemistry of polyvalent iodine. *Chemical Reviews*, 108(12), 5299–5358.
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research*, 20(1), 4–12.