

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"  
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA No. 3  
DR. VICTOR MANUEL ESPINOZA DE LOS REYES SÁNCHEZ**



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
MECANISMOS INMUNOSUPRESORES EN TUMORES DE  
PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.  
R-2016-785-015.**

**TESIS**

Que para obtener el título de Médico especialista en Ginecología Oncológica

Presenta

**Dr. Luis Alberto Solís Castillo.**

Asesores

**Dr. Víctor Hugo Villafaña Vázquez  
Dr. Alexander Pedroza González**

CIUDAD DE MÉXICO,

MARZO DEL 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Alumno de la tesis:** Dr. Luis Alberto Solís Castillo

Médico residente de la especialidad de rama oncología ginecológica  
Unidad Médica de Alta Especialidad  
Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3  
Centro Médico Nacional la Raza  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Dom: Seris y Antonio Valeriano SN Col La Raza México DF CP 02990  
Tel. 57245900 ext 23726  
Correo electrónico: solis\_med57@hotmail.com  
Matrícula IMSS: 99358309.

**Asesor titular e investigador principal:** Dr. Víctor Hugo Villafaña Vázquez

Adscrito al servicio de Oncología quirúrgica.

Unidad Médica de Alta Especialidad  
Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3  
Centro Médico Nacional la Raza  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Dom: Seris y Antonio Valeriano SN Col La Raza México DF CP 02990  
Tel. 57245900 ext 23726  
Correo electrónico: victor.villafaña@imss.gob.mx  
Matricula IMSS: 11791284.

**Asesor e investigador asociado:** Dr. Alexander Pedroza González

Profesor Titular "A" TC en la licenciatura de Médico Cirujano  
Laboratorio de Investigación en Inmunología  
Unidad de Morfología y Función y Unidad de Investigación en Biomedicina  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM  
Av. De los barrios S/N, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.  
Tel. 56231220  
Correo electrónico: alexander\_pg@yahoo.com.mx

**Lugar de la investigación:**

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

Domicilio: Calzada Vallejo 266 y 270 Colonia “La Raza” Delegación Azcapotzalco México Distrito Federal. CP 02990. Teléfono 57245900 Ext. 23726.

Laboratorio de Investigación en Inmunología

Unidad de Morfología y Función y Unidad de Investigación en Biomedicina

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

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

## FIRMAS DE AUTORIZACIÓN

---

**Dr. Víctor Hugo Villafaña Vázquez**

Asesor titular de la tesis e investigador principal

---

**Dr. Alexandre Pedroza González**

Asesor e investigador asociado de la tesis

---

**Dr. Juan Antonio García Bello**

Jefe de la División de Investigación en Salud

UMAE HGO No. 3 CMN “La Raza” IMSS

---

**Dr. Juan Carlos Hinojosa Cruz**

Director de la División de Enseñanza e Investigación en Salud

UMAE HGO No. 3 CMN “La Raza” IMSS

---

**Dr. Elias Ahumada Ramírez**

Director de la UMAE HGO No. 3 CMN “La Raza” IMSS

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que contribuyeron para la realización de esta tesis ya que con su apoyo incondicional y valiosa colaboración me han permitido terminar este proyecto. Les dedico todo el esfuerzo y esmero que entregué a esta tesis.

Gracias a mis padres, Marthita y José Luis por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia y el tiempo, porque fueron cómplices desde hace 7 años de este sueño, gracias por apoyarme siempre incondicionalmente.

A mis hermanas, Jaque y Karen por que juntos crecimos siempre con la visión de lograr una carrera profesional, hemos compartido triunfos y derrotas, gracias por estar siempre a mi lado.

Tío Martín, gracias por todo el apoyo que recibí para realizar este sueño, gracias por todos los consejos que me han hecho ser una mejor persona.

A mi casa, el IMSS y a todos mis maestros del servicio de Oncología del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3 del Centro Médico Nacional “La Raza” ya que con sus enseñanzas contribuyeron para la realización de la especialidad de rama Ginecología oncológica.

Dr. Alexander Pedroza González gracias por el apoyo y por su interés para que esta investigación nos ayude a conocer más acerca del sistema inmunológico y el microambiente tumoral de pacientes con cáncer de mama. Sin olvidar mención para sus colaboradores en el laboratorio, que sin su apoyo este proyecto no hubiera sido posible.

## DEDICATORIA

A mis asesores: Dr Pedroza y Dr Villafaña, por su inmenso apoyo para la realización de este trabajo y por su dedicación a la investigación en el ámbito de la inmunología y cáncer en las pacientes mexicanas derechohabientes del IMSS.

Este trabajo ha sido apoyado y financiado por el proyecto **PAPIIT IA204515/RA204515, UNAM.**

**CONTENIDO**

<b>APARTADOS</b>	<b>PÁGINA</b>
Resumen	8
Abstract	11
Introducción	14
Planteamiento del problema	15
Pregunta de investigación	17
Justificación	18
Objetivo	19
Hipótesis	20
Tipo de estudio y Diseño	21
Criterios de selección	22
Población, muestra y método de muestreo	23
Variables de estudio y descripción operacional	25
Material y métodos	26
Análisis estadístico	28
Aspectos éticos	32
Resultados	33
Discusión	40
Conclusiones	43
Referencias bibliográficas	44
Anexos	48

## RESUMEN

**Introducción:** El cáncer de mama es el de mayor incidencia y mortalidad en mujeres de México y el mundo. Los tratamientos actuales son muy agresivos para el paciente y su eficacia depende del estadio de la enfermedad, siendo curativos solamente en estadios tempranos de la enfermedad. Además no garantizan la eliminación total de las células tumorales, por lo cual la recurrencia de la enfermedad continúa siendo alta. En consecuencia, existe una urgente necesidad de tratamientos más efectivos sobre todo en estadios avanzados. La inmunoterapia es una opción atractiva debido a la especificidad y la memoria inmunológica que potencialmente podría disminuir la tasa de recurrencia. Sin embargo, la experiencia clínica de diferentes estrategias de tratamiento inmunológico como el uso de vacunas a base de células dendríticas ha mostrado limitados efectos terapéuticos. Se ha postulado que la falla en los tratamientos inmunológicos se puede deber en gran medida a la presencia de mecanismos de supresión inmunológica en el sitio de lesión. Esto debido a que se ha observado que los mecanismos de tolerancia inmunológica que normalmente protegen contra el desarrollo de enfermedades autoinmunes pueden ser utilizados por diversos tumores para evadir la respuesta inmune, obstaculizando con ello el desarrollo de una inmunidad anti-tumoral efectiva. Por lo anterior es importante identificar y caracterizar los diferentes mecanismos inmunosupresores que están presentes en el ambiente del tumor generando una deficiente inmunidad anti-tumoral y que pudieran intervenir con terapias inmunológicas. La caracterización de estos mecanismos permitirá identificar nuevos blancos terapéuticos para modular y bloquear dichos mecanismos inmunosupresores y que en combinación con terapias inmuno-estimulantes como son las vacunas de células dendríticas puedan permitir la inducción de una eficiente respuesta anti-tumoral.

**Objetivo:** Identificar los mecanismos inmunosupresores mediados por células que afectan el desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral en pacientes con cáncer de mama.

**Material y métodos:** Se realizaron ensayos ex vivo con células aisladas de tumores de pacientes con cáncer de mama para el análisis fenotípico y funcional de poblaciones de células con capacidad inmunosupresora como son células Tregs, pDCs, mDCs y MSCs. La principal técnica de análisis fue la citometría de flujo. Se realizaron cultivos celulares in vitro para los análisis funcionales. Los datos de citometría de flujo se analizaron mediante el programa Flowjo. Posteriormente se analizó la frecuencia comparativamente entre (sangre y tejido tumoral de mama) para la búsqueda de diferencias significativas de las diferentes poblaciones leucocitarias a determinar. Estos análisis se realizaron con el programa GraphPad utilizando la prueba t-student con datos pareados. Para cada grupo de datos se realizó una prueba de distribución y de acuerdo al resultado se aplicaron pruebas paramétricas o no paramétricas en el análisis.

**Recursos e infraestructura:** La obtención de datos y muestras clínicas se llevo a cabo en la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3, Centro Médico Nacional la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social. La unidad está especializada en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de pacientes con cáncer de mama y tumores ginecológicos por lo que cuenta con el equipo necesario para la toma de biopsias y la realización de cirugías para la extirpación de tumores de los cuales se obtuvieron las muestras clínicas. El procesamiento de las muestras y su análisis por citometría de flujo se realizó en el laboratorio 7 de inmunología de la Unidad de Morfología y Función y el laboratorio 4 de la FES Iztacala UNAM, que cuentan con el equipo necesario para citometría de flujo y cultivo celular.

**Resultados:** Se analizaron tumores y sueros de 81 mujeres con cáncer de mama, con una mediana de edad de 56 años. El carcinoma ductal infiltrante predominó (63.8%) de las pacientes. Los estadios clínicos tempranos que predominaron IA (31.3%) y IIA (33.7%). En por los menos (33.1%) de las pacientes encontramos afección a por lo menos 1 ganglio linfático axilar por células malignas en el reporte definitivo de patología. En la citometría de flujo las células Dendríticas (DCs): Mieloides (mDCs) y Plasmacitoides (pDCs) en la frecuencia de ambas poblaciones se observó un claro predominio de (pDCs) en sangre, mientras que en el tejido tumoral dicha proporción esta invertida con un predominio de (mDCs). En el análisis de linfocitos T la proporción de CD4 y CD8 es muy similar entre ambos compartimientos, en el tumor se observó una mayor frecuencia de células Tregs con una mediana de 8% y en la sangre periférica una mediana de 2.5% lo cual denota un microambiente inmunosupresor en el tejido tumoral. Las células mesenquimales estromales (MSCs) analizadas no se detectaron en sangre periférica, mientras que su frecuencia en el tejido tumoral fue de 1 % de las células totales obtenidas en las suspensiones celulares. Observamos que dependiendo de la afectación de los ganglios axilares la frecuencia de MSCs es significativamente diferente, siendo mayor en los pacientes con al menos un ganglio afectado en comparación de aquellos que no presentan afección ganglionar.

**Conclusión:** En las pacientes con cáncer de mama estadios clínicos tempranos el tejido tumoral tiene una importante proporción de células leucocitarias que reflejan la inmunogenicidad de los tumores primarios de cáncer de mama. Sin embargo, el infiltrado leucocitario contiene una frecuencia elevada de células Tregs y una mayor expresión de CTLA-4 en ambas poblaciones linfocitarias (CD4 y CD8), indicando claramente el estado de inmunosupresión local presente en el microambiente tumoral. La frecuencia de mDCS en el tejido tumoral tuvo una correlación positiva con las células Tregs sugiriendo que las mDCs pueden estar induciendo la generación de linfocitos Tregs en el microambiente de los tumores mamarios. La frecuencia de las DCs en el tejido tumoral y en la sangre pueden ser

factores pronósticos del desarrollo de cáncer de mama, pero requiere ser confirmado en futuros estudios que incluyan estadios tempranos y avanzados de la enfermedad.

Se confirmó la presencia de MSCs en los tumores primarios de cáncer de mama en pacientes mexicanas y su frecuencia está asociada con la afectación de los ganglios axilares.

Los datos obtenidos en la presente investigación permiten asentar las bases y justificar la realización de futuros estudios para confirmar la implicación de las células inmunitarias y MSCs en la patogenia de cáncer de mama y su valor diagnóstico y pronóstico.

**Palabras clave:** Cáncer de mama, Células dendríticas, Células dendríticas mieloides, Células dendríticas plasmacitoides, Linfocitos T, células Tregs, Células mesenquimales estromales.

## ABSTRACT

**Introduction:** Breast cancer is the most common cancer and leading cause of cancer mortality in women in Mexico and worldwide. Current treatments are very aggressive for patients and their effectiveness depends on the stage of the disease, being curative only in the early stages of the disease. Furthermore, they do not guarantee the total elimination of tumor cells, so the recurrence of the disease continues to be high. Consequently, there is an urgent need for more effective treatments, especially in advanced stages. Immunotherapy is an attractive alternative because of the specificity and immunological memory that could potentially decrease the rate of recurrence. However, clinical experience of different immunological approaches such as the use of dendritic cell-based vaccines has shown limited therapeutic effects. It has been postulated that failure in immunotherapeutic approaches may be due mainly to the presence of immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment. It has been observed that immunological tolerance mechanisms that normally protect against the development of autoimmune diseases can be used by various tumors to evade the immune response, thereby hindering the induction of effective antitumor immunity. Therefore it is important to identify and characterize the different immunosuppressive mechanisms that are present in the tumor environment generating a deficient anti-tumor immunity and that could intervene with immunological therapies. The characterization of these mechanisms will allow the identification of new therapeutic targets to modulate and block these immunosuppressive mechanisms and that in combination with immunostimulatory therapies such as dendritic cell vaccines may allow the induction of an efficient anti-tumor response.

**Objective:** To identify the cell-mediated immunosuppressive mechanisms that affect the development of an anti-tumor immune response in patients with breast cancer.

**Material and methods:** Ex vivo analysis were performed with cells isolated from tumors of breast cancer patients. Phenotypic and functional analysis of immunosuppressive cells such as Tregs, pDCs, mDCs and MSCs were carried out by flow cytometry. Cell cultures were performed for functional assays. Flow cytometry data were analyzed using the software Flowjo. Subsequently we compared the frequency between blood and breast tumor tissue of different leukocytes to find significant differences. These analyzes were performed using the GraphPad software using the t-student test with paired data. For each group of data a distribution test was performed and according to the result parametric or non-parametric tests were applied in the analysis.

**Resources and infrastructure:** The data collection and clinical samples were carried out in the High Specialty Medical Unit of the Hospital of Gynecology and Obstetrics No. 3, National Medical Center La Raza of the Mexican Institute of Social Security. The unit specializes in the diagnosis, treatment and follow-up of patients with breast cancer and gynecological tumors, so it has the necessary equipment for biopsies and surgery for the removal of tumors from which the samples were obtained. The clinical samples were processed and analyzed by flow cytometry in the laboratory 7 of immunology of the Unit of Morphology and Function and laboratory 4 of Biomedicine Investigations Unit at FES Iztacala UNAM, which have the necessary equipment for flow cytometry and cell culture.

**Results:** Tumors and peripheral blood from 81 women with breast cancer, with a median age of 56 years, were analyzed. Invasive ductal carcinoma was the predominant form observed in most patients (63.8%). Early clinical stages that predominated were IA (31.3%) and IIA (33.7%). In at least (33.1%) of the patients, there was at least 1 axillary lymph node affected by malignant cells in the definitive pathology report. In the flow cytometry analysis a clear predominance of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) was observed in peripheral blood, whereas in the tumor tissue this proportion is inverted with dominance of myeloid dendritic cells (mDCs). The proportion of CD4 and CD8 T cells was very similar between the two compartments, however in the tumor a higher frequency of Treg cells was observed with a median of 8% in comparison with 2.5% in peripheral blood, these proportions denotes an immunosuppressive microenvironment in tumor tissue. Mesenchymal stroma cells (MSCs) were not detected in peripheral blood, whereas their frequency in the tumor tissue was 1% of the total cells obtained in the cell suspensions. We observed that, depending of axillary node involvement, the frequency of MSCs was significantly different, being higher in patients with at least one affected lymph node compared to those without lymph nodes affected.

**Conclusions:** In breast cancer patients with early clinical stages the tumor tissues have a significant proportion of leukocyte cells that reflect the immunogenicity of primary tumors. However, the leukocyte infiltrate contains a high frequency of Tregs cells and increased expression of CTLA-4 in both lymphocyte populations (CD4 and CD8), clearly indicating the state of local immunosuppression present in the tumor microenvironment. The frequency of mDCs in tumor tissue had a positive correlation with Tregs cells suggesting that mDCs may be inducing generation of Tregs in the microenvironment of mammary tumors. The frequency of DCs in tumor tissue and blood may be prognostic factors for the development of breast cancer, but it needs to be confirmed in future studies that include early and advanced stages of the disease.

We confirmed the presence of MSCs in primary tumors of breast cancer in Mexican patients and their frequency is associated with axillary lymph node involvement.

The data obtained in the present investigation generated the bases and justify future studies to confirm the implication of the immune cells and MSCs in the pathogenesis of breast cancer and its diagnostic and prognostic value.

Key words: Breast cancer, Dendritic cells, Myeloid dendritic cells, Plasmacytoid dendritic cells, T lymphocytes, Tregs cells, Mesenchymal stroma cells.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que afecta a un gran número de personas a nivel mundial y constituye una de las principales causas de muerte. Entre las neoplasias más importantes se encuentra el cáncer de mama, el cual es el de mayor incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial. En nuestro país en años recientes el cáncer de mama ha sido la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos en la población mayor a 20 años, y en mujeres una de cada tres es hospitalizada por esta causa. En 2013 la incidencia más alta de neoplasias mamarias se presentó en las mujeres de 60 a 64 años (67 casos nuevos por cada 100 mil mujeres del mismo grupo de edad), seguidas por las del grupo de 50 a 59 años (53 casos nuevos) y de las de 45 a 49 años (46 casos nuevos) [1]. El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma ductal, que comienza en las células de los ductos galactóforos. El cáncer de mama también puede comenzar en las células de los lobulillos (carcinoma lobular) o en otros tejidos de la mama con menor frecuencia. El carcinoma inflamatorio es una variante poco frecuente de cáncer de mama muy agresiva que tiene una supervivencia a 5 años del 40% y afecta principalmente a mujeres jóvenes [2, 3].

El tratamiento para el cáncer de mama depende del tipo de cáncer y el grado de diseminación [4]. En general los tratamientos actuales son muy agresivos para el paciente y consisten en la remoción quirúrgica del tumor y de terapias adyuvantes como radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia. La eficacia de los tratamientos depende en gran medida de un diagnóstico temprano que permita la eliminación de pequeños tumores a través de métodos quirúrgicos o químicos. En países desarrollados el diagnóstico temprano en estadios I y II ha disminuido las tasas de mortalidad, en contraste con los países en vías de desarrollo en donde solo del 20 al 60 % de los pacientes son diagnosticados en dichas etapas [5]. Sin embargo aún en estadios tempranos el tratamiento no puede garantizar la total remoción de las células tumorales, lo que provoca una elevada tasa de reincidencia de la enfermedad. El riesgo de recaídas del cáncer de mama viene condicionado tanto por la extensión del tumor como por las características biológicas del mismo. El estado de afectación de los ganglios linfáticos es el factor pronóstico de mayor peso, existiendo una clara correlación entre el número de ganglios afectados y el riesgo de recaídas; 30% a 10 años cuando no hay ninguno ganglio afectado y más del 70% cuando hay más de 10. El cáncer recurrente puede aparecer en el mismo sitio (recurrencia local), en una zona cercana como la pared torácica y los ganglios infra o supraclaviculares (recurrencia regional) o en sitios distantes tales como el hígado, pulmón o cerebro (recurrencia distal) [6]. Desafortunadamente, el cáncer

recurrente resulta muy agresivo y de rápido desarrollo limitando en gran medida las opciones y eficacia de los tratamientos.

En consecuencia, existe una urgente necesidad de tratamientos alternos más efectivos. La inmunoterapia es una opción atractiva debido a la especificidad y la memoria inmunológica que potencialmente podría disminuir la tasa de recurrencia. Sin embargo se ha observado que los mecanismos de tolerancia inmunológica que normalmente protegen contra el desarrollo de enfermedades autoinmunes pueden ser utilizados por diversos tumores para evadir o suprimir la respuesta inmune local, obstaculizando con ello el desarrollo de una inmunidad anti-tumoral efectiva y limitando los efectos terapéuticos de diversas estrategias inmunológicas como el uso de vacunas a base de células dendríticas [7-9]. Ante tal panorama, para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento a base de inmunoterapia es de gran importancia la identificación y caracterización de los diferentes mecanismos inmunosupresores que están presentes en el micro-ambiente del tumor generando una deficiente inmunidad anti-tumoral y que pudieran intervenir con terapias inmunológicas.

Entre los mecanismos de inmunosupresión que se han descrito en cáncer de mama se encuentran los mediados por linfocitos T CD4+ de tipo Th2, linfocitos T CD4+FoxP3+ reguladores (Tregs), células dendríticas mieloides (mDCs por sus siglas en inglés) y plasmacitoides (pDCs). Los linfocitos Th2 producen interleucinas 4 y 13 (IL-4 e IL-13), que promueven el desarrollo tumoral al inducir la producción de factores de crecimiento que aceleran la proliferación de las células cancerosas [10]. La generación de linfocitos Th2 es inducida por mDCs que han sido condicionadas por el microambiente tumoral y se caracterizan por expresar OX40L, que es una de las moléculas directamente responsables de la polarización de los linfocitos T CD4+ hacia un perfil Th2 como lo demostramos en estudios previos [11]. Las mDCs son condicionadas en el microambiente tumoral por la presencia de TSLP (thymic stromal lymphopoietin), que es secretada por las células tumorales, y que provoca que las mDCs expresen elevados niveles de OX40L y no expresen IL-12 [11, 12]. Dicho mecanismo no solo se ha observado en cáncer de mama en humanos si no también en modelos animales [13] y en cáncer pancreático [14]. Adicionalmente se ha observado que las mDCs expuestas a TSLP adquieren la capacidad para inducir linfocitos Tregs, que potencialmente pueden inhibir la respuesta anti-tumoral [15]. Por otro lado, se ha observado que las pDCs que infiltran los tumores de mama tienen una alta capacidad para inducir y activar a linfocitos Tregs provocando su acumulación y activación en el sitio de lesión [16]. De hecho, la infiltración de ambas poblaciones

celulares en los tumores mamarios se ha asociado con un mal pronóstico de la enfermedad [16, 17]. La presencia de un elevado número de linfocitos Tregs en procesos tumorales promueve un microambiente inmunosupresor que inhibe la generación de una respuesta anti-tumoral [18-20].

Además de células de la respuesta inmunitaria y células cancerosas el microambiente tumoral está constituido por células estromales. Un componente importante del estroma tumoral son las células mesenquimales multi-potenciales denominadas MSCs por sus siglas en inglés (mesenchymal stem cells or mesenchymal stroma cells)[21]. Las MSCs que originalmente fueron reportadas en el estroma de la médula ósea tienen una fuerte atracción por el microambiente tumoral y contribuyen en el desarrollo tumoral[22-25]. Estas células son capaces de promover el crecimiento de tumores en modelos animales de cáncer de mama y de colon[26-29]. Sin embargo los mecanismos por los cuales inducen el desarrollo de tumores no se conoce y se ha sugerido que puede ser mediado en parte por sus propiedades angiogénicas e inmunoregulatoras que se han descrito in vitro para las células MSC derivadas de médula ósea[27, 30, 31]. Son células con el potencial de inducir un microambiente inmunosupresor caracterizado por células Th2, Tregs y linfocitos CD4 productores de IL-10 [32, 33], además de producir grandes cantidades de TGF- $\beta$  que favorece el desarrollo de células Tregs y la modulación de células pDCs y mDCs [34].

La caracterización de los mecanismos inmunosupresores presentes en el microambiente tumoral permitirá la identificación de las principales moléculas y células responsables de la inmunosupresión observada en dichos pacientes. A través de dicho conocimiento se podrán diseñar estrategias terapéuticas para modular la respuesta inmune local que eviten o inhiban los mecanismos inmunosupresores que interfieren con el desarrollo de una respuesta anti-tumoral.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de los avances en el diagnóstico temprano y en los tratamientos el cáncer de mama es el de mayor incidencia y mortalidad en mujeres mexicanas y a nivel mundial. Los tratamientos actuales pueden ser curativos en etapas muy tempranas de la enfermedad, sin embargo la tasa de recurrencia es elevada y su eficacia disminuye dramáticamente en estadios avanzados o recurrentes. Además, dichos tratamientos resultan muy agresivos para el paciente debido a la toxicidad y efectos adversos asociados a la quimioterapia y radioterapia. Así mismo los procedimientos quirúrgicos para la remoción de los tumores además de la limitante de no remover en su totalidad a las células cancerosas, también tienen consecuencias psicológicas importantes. Ante tal panorama es prioritario el desarrollo de terapias alternas que sean menos agresivas para las pacientes pero sobretodo que sean más eficientes en controlar el crecimiento tumoral y disminuir la mortalidad de la enfermedad o al menos incrementar de forma significativa la sobrevivencia de los pacientes y disminuir la tasa de reincidencia. En este contexto la inmunoterapia es una alternativa de tratamiento muy atractiva debido a las propiedades del sistema inmunitario, que en principio es el encargado de reconocer lo propio de lo extraño y potencialmente generar memoria contra los antígenos tumorales. La inducción de una respuesta inmunitaria anti-tumoral permitirá que el sistema inmune pueda reconocer los antígenos tumorales y con ello montar una respuesta en contra de todas las células tumorales que los expresen. Sin embargo para poder inducir una respuesta anti-tumoral efectiva en el sitio de lesión es necesario eliminar los mecanismos de inmunosupresión presentes en el micro-ambiente tumoral que potencialmente pueden inhibir o disminuir la respuesta inmune anti-tumoral como se ha observado en diferentes ensayos clínicos donde solo se ha estimulado al sistema inmunitario sin bloquear los mecanismos de inmunosupresión con resultados clínicos muy limitados.

En el presente proyecto pretendemos caracterizar poblaciones celulares asociadas con la inmunosupresión presente en cáncer de mama y con ello identificar a posibles blancos terapéuticos como son las moléculas inmunoregulatorias expresadas por células supresoras como las células Tregs o a los mecanismos inductores de dichas poblaciones celulares. Previamente en cáncer hepático identificamos dos posibles blancos terapéuticos CTLA-4 y GITR que al ser neutralizados inhiben el efecto supresor de las células Tregs. Así mismo, evaluaremos si las células estromales mesenquimales participan en la inducción de mecanismos inmunosupresores. El conocimiento obtenido podrá ser utilizado para el desarrollo de ensayos clínicos para el establecimiento de nuevos tratamientos inmunológicos en cáncer de mama.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son los mecanismos inmunosupresores mediados por células que afectan el desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral en pacientes con cáncer de mama?

## JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de nuevos tratamientos para el cáncer de mama que sean capaces de impactar la sobrevida de los pacientes y disminuir la recurrencia de la enfermedad son objetivos primordiales para disminuir la mortalidad asociada a dicha neoplasia. La caracterización de los mecanismos inmunosupresores presentes en el microambiente tumoral permitirá la identificación de las principales moléculas y células responsables de la inmunosupresión observada en dichos pacientes. A través de dicho conocimiento se podrán diseñar estrategias terapéuticas para modular la respuesta inmune local que eviten o inhiban los mecanismos inmunosupresores que interfieren con el desarrollo de una respuesta anti-tumoral. Ejemplo de este tipo de manipulación es el uso de anticuerpos anti-CTLA-4 (Ipilimumab) en melanoma, que incrementa la respuesta anti-tumoral en algunos pacientes. El desarrollo de una terapia inmunológica integral permitirá diseñar nuevos tratamientos alternos para los pacientes con cáncer de mama que ofrezcan una mayor sobrevida y una menor tasa de reincidencia de la enfermedad sin los efectos tóxicos y adversos asociados a los tratamientos actuales de quimioterapia y radioterapia.

La inmunoterapia es una opción atractiva para pacientes con cáncer de mama debido a la especificidad y la memoria inmunológica. Se ha postulado que la falla en los tratamientos inmunológicos se puede deber en gran medida a la presencia de mecanismos de supresión inmunológica en el sitio de lesión, por lo que en la presente investigación se buscará describir cuales son los posibles mecanismos inmunosupresores que están involucrados en el microambiente tumoral a través de la confirmación de células de Tregs, mDCs, pDCs y MSCs que afectan el desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral

## OBJETIVO

### General:

Caracterizar los mecanismos inmunosupresores mediados por células que afectan el desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral en pacientes con cáncer de mama.

### Particular

1. Determinar la frecuencia y fenotipo de células Tregs, pDCs, mDCs y MSCs y su posible correlación en tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama y comparar con su contraparte en sangre periférica en donde dichas células no están directamente afectadas por el proceso tumoral.

## **HIPÓTESIS**

Postulamos que las células MSCs y Tregs se encuentran infiltrando tumores humanos de mama y participan de forma activa junto con la DCs (pDCS y mDCS) en la supresión de la respuesta anti-tumoral. La frecuencia de dichas poblaciones celulares podría estar asociada con algunas características clínicas como el estadio o la afectación de los ganglios axilares, que constituye uno de los principales indicadores pronósticos en cáncer de mama.

## **TIPO DE ESTUDIO**

Transversal, prospectivo, descriptivo.

## **DISEÑO**

Serie de casos.

## CRITERIOS DE SELECCIÓN

### Criterios de inclusión de pacientes:

- Mujeres con cáncer de mama confirmado por estudio histopatológico sin restricción de edad.
- Las pacientes incluidas fueron de recién diagnóstico sin tratamiento previo para cáncer de mama.
- Los estadios de los tumores fueron primordialmente tempranos I y II que son los estadios que prevalecen en pacientes que no han recibido tratamiento de quimioterapia o radioterapia y que son candidatas a tratamiento quirúrgico. Considerando el tamaño de los tumores en cada estadio, la mayor cantidad de muestras se encontraron en estadio 2. La utilización de estadios I y II nos permitirá observar los cambios tempranos en la regulación de la respuesta inmune intra-tumoral para la posible identificación de blancos terapéuticos que permitan direccionar la respuesta y frenar el desarrollo tumoral.

### Criterios de exclusión

- Pacientes con enfermedades concomitantes que afecten la respuesta inmune.
- Pacientes bajo tratamiento con quimioterapia o radioterapia.

## **POBLACIÓN, MUESTRA Y MÉTODO DE MUESTREO**

### **Muestras clínicas:**

Muestras de sangre periférica y de tejido tumoral de 80 pacientes. De cada paciente se obtuvo el consentimiento informado por escrito antes de la donación de tejidos. El número de muestras mencionado se determinó considerando que es un estudio de ciencia básica enfocado en determinar los principales mecanismos inmuno-reguladores causantes del estado de inmunosupresión asociada a pacientes con cáncer de mama, también se consideró los recursos presupuestales y la capacidad de procesamiento de las muestras del personal de laboratorio de investigación.

Sangre periférica. Por punción venosa en el brazo se obtuvieron 10 ml de sangre en tubos con heparina. Una vez recolectada la sangre en el tubo se mezcló suavemente para homogenizar con la heparina y evitar la formación de trombos. Posteriormente se mantuvieron a 4 °C para ser transportada al laboratorio.

Tejido. Las muestras de tejido mamario se obtuvieron por medio de biopsias o de tejido extraído durante mastectomía terapéutica o cirugía conservadora de la mama. Se colectó una muestra de tejido tumoral y el tamaño de la muestra para tejido postoperatorio dependió de las dimensiones del tumor extraído pero en condiciones ideales se colectó tejido de 1-3 cm<sup>3</sup>. El tejido se colocó en un recipiente estéril con medio de cultivo RPMI1640 suplementado con penicilina y estreptomycinina y se mantuvo a 4 °C para su transportación al laboratorio.

### **Población:**

Pacientes atendidas en la UMAE HGO No. 3 del CMN "La Raza" IMSS en el servicio de Oncología quirúrgica con diagnóstico de cáncer de mama en el estudio transoperatorio.

### **Método de muestreo:**

No probabilístico. Se trató de una serie de casos.

## VARIABLE DE ESTUDIO

### DESCRIPCION OPERACIONAL DE LA VARIABLE

#### **Mecanismos inmunosupresores**

**Definición conceptual:** Entre los mecanismos de inmunosupresión que se han descrito en cáncer de mama se encuentran los mediados por linfocitos T CD4+ de tipo Th2, linfocitos T CD4+FoxP3+ reguladores (Tregs), células dendríticas mieloides (mDCs por sus siglas en inglés) y plasmacitoides (pDCs). La presencia de estas células promueven el desarrollo tumoral al inducir la producción de factores de crecimiento e interleucinas que aceleran la proliferación de las células cancerosas

**Definición operacional:** para fines de la presente investigación se consideró como mecanismos inmunosupresores en los tumores de pacientes con cáncer de mama la presencia de linfocitos T CD4+ de tipo Th2, linfocitos T CD4+FoxP3+ reguladores (Tregs), células dendríticas mieloides (mDCs por sus siglas en inglés) y plasmacitoides (pDCs)

**Tipo de variable:** cuantitativa

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se revisaron 80 muestras de tumor y sangre periférica de pacientes con cáncer de mama del 01 de marzo del año 2016 al 01 de marzo del 2017. Se incluyeron en el estudio solo aquellas enfermas que reunieron los criterios de selección.

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

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

### Procesamiento.

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

El tejido mamario se cortó en fragmentos pequeños que fueron digeridos con una mezcla de 0.5 mg/mL de colagenasa y 0.2 mg/mL de DNasa 1 en medio DMEM a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se disgregó el tejido y se removieron los fragmentos de tejido conectivo por filtración en mallas de nylon (70 micras). La suspensión celular se lavó 2 veces con PBS. Posteriormente las células muertas y eritrocitos fueron removidos por gradiente de centrifugación. Finalmente se determinó el número y viabilidad celular con azul de tripan. Las células obtenidas se utilizaron para citometría de flujo y cultivo celular.

Citometría de flujo. Las suspensiones celulares obtenidas de las muestras clínicas fueron analizadas por citometría de flujo. La identificación de células Tregs se realizó por medio de la expresión de CD3, CD4, FoxP3 y la ausencia de CD127. Las pDCs se identificaron como células CD3-/CD19-/CD20-/CD56-/CD14-/CD16-/HLD-DR+/CD123+, mientras que las mDCs CD3-/CD19-/CD20-/CD56-/CD14-/CD16-/HLD-DR+/CD11c. Las MSCs se identificaron como CD45-CD90+CD44+CD73+CD105+. Las células fueron tenidas con anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos durante 10 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Posteriormente se lavaron para remover el exceso de anticuerpos y se analizaron en un citómetro de flujo BD y los datos se analizaron con el software Flowjo. El panel de anticuerpos se ilustra en la tabla 1.

Tabla 1. Panel de anticuerpos para citometría de flujo

Fluoro-cromo	DCs	Tregs 1	Tregs 2	MSCs
FITC	CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 y CD56	GITR		CD24
Pe	ICOSL	CD127		CD105
PercP	HLA-DR	CD8	CD8	CD44
APC	CD11c	CTLA-4	FoxP3	CD90
APC-H7	CD45	CD4	CD4	
PeCy7	CD123	CD3	CD3	CD73
V450	CD45	FoxP3	CD45	CD45

## ANALISIS ESTADÍSTICO

Análisis de los resultados. Los datos de citometría de flujo se analizaron mediante el programa Flowjo. Posteriormente se analizó la frecuencia comparativamente entre los diferentes tejidos (sangre y tejido tumoral de mama) para la búsqueda de diferencias significativas de las diferentes poblaciones leucocitarias a determinar. Estos análisis se realizaron con el programa GraphPad utilizando la prueba t-student con datos pareados.

## **RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD.**

Nombre: Víctor Hugo  
 Apellido Paterno: Villafaña  
 Apellido Materno: Vázquez  
 Nivel Académico: Especialista en Oncología Quirúrgica  
 Especialidad: Oncología Quirúrgica  
 Institución: INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
 Adscripción: UMAE HGO 3 CMN la RAZA IMSS, servicio de Oncología quirúrgica  
 Pertenece al SNI: NO  
 Producto que generará: Redacción de manuscritos y tesis de especialidad  
 Información Relevante: El Dr. Villafaña trabaja en la Unidad Médica de Alta Especialidad en Ginecología y Obstetricia Núm. 3, Centro Médico Nacional La Raza relacionado con el diagnóstico y tratamiento de pacientes con cáncer de mama.  
 Actividades Específicas: Supervisará el reclutamiento de los pacientes, la toma de muestras de sangre y tejido mamario.  
 Domicilio: Seris y Antonio Valeriano SN col La raza México D.F. 029900  
 Correo: [victor.villafana@imss.gob.mx](mailto:victor.villafana@imss.gob.mx)

Nombre: Alexander  
 Apellido Paterno: Pedroza  
 Apellido Materno: González  
 Nivel Académico: Doctor en Ciencias en la especialidad de Patología Experimental  
 Especialidad: Inmunología  
 Institución: Universidad Nacional Autónoma de México.  
 Adscripción: Carrera de Médico Cirujano, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.  
 Pertenece al SNI: Si, Nivel I  
 Producto que generará: Redacción de manuscritos para publicación y tutor de estudiantes de licenciatura y maestría para obtención de grado.  
 Información Relevante: El Dr. Pedroza-Gonzalez ha trabajado en el área de inmunología del cáncer en humanos por más de 10 años, nueve de los cuales fueron en el extranjero (Texas, USA y Rotterdam, Holanda) y ha publicado 16 artículos en inmunología, 11 de los cuales en cáncer.  
 Actividades Específicas: Supervisará el procesamiento de las muestras y el análisis de resultados.  
 Domicilio: Av. De los barrios S/N, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.  
 Correo: [alexander\\_pg@yahoo.com.mx](mailto:alexander_pg@yahoo.com.mx)

Nombre: Luis Alberto  
 Apellido Paterno: Solís  
 Apellido Materno: Castillo  
 Nivel Académico: Especialista en Ginecología y obstetricia.  
 Especialidad: Ginecología y obstetricia  
 Institución: INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Adscripción: UMAE HGO 3 CMN la RAZA IMSS

Pertenece al SNI: NO

Producto que generará: Redacción de manuscritos y tesis de especialidad

Información Relevante: El Dr. Luis Alberto Solís Castillo es residente de tercer año en ginecología oncológica en la Unidad Médica de Alta Especialidad del Centro Médico Nacional La Raza y en la División de Enseñanza de dicho Centro. Tiene publicaciones en el tema de la salud perinatal y materna.

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

Domicilio: Seris y Antonio Valeriano SN col La raza México D.F. 029900

Correo: [solis\\_med57@hotmail.com](mailto:solis_med57@hotmail.com)

*Recursos:* La obtención de datos y muestras clínicas se llevó a cabo en la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3, Centro Médico Nacional la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social. La unidad está especializada en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de pacientes con cáncer de mama y tumores ginecológicos por lo que cuenta con el equipo necesario para la toma de biopsias y la realización de cirugías para la extirpación de tumores. Procedimientos a partir de los cuales se obtuvieron las muestras clínicas para el presente estudio. Además de contar con equipo de cómputo que será utilizado para la generación de las bases de datos clínicos. El procesamiento de las muestras y su análisis por citometría de flujo se realizaron en el laboratorio de inmunología de la Unidad de Morfología y Función de la FES Iztacala UNAM, que cuenta con el equipo necesario como centrifuga, micropipetas, microscopio óptico y de fluorescencia, cámaras de incubación, un micrótopo, un lector de ELISA y equipo para PCR. Así mismo, cuenta con un cuarto de cultivo equipado con una campana de bioseguridad tipo II, dos incubadoras de células con CO<sub>2</sub>, un microscopio invertido y materiales accesorios de cultivo celular como son micropipetas, medios de cultivo y material de cultivo desechable. La FES Iztacala tiene una unidad de citometría donde se localiza un citómetro de flujo BD FACSAria-Fusion con capacidad para analizar 9 parámetros diferentes y de separación de poblaciones celulares (cell sorting) que fue utilizado para el análisis de las muestras.

*Financiamiento:* El presente proyecto cuenta con financiamiento de la UNAM (**proyecto PAPIIT IA204515/RA204515: “Modulación de la respuesta inmune por células cancerosas y estromales derivadas de tumores humanos”**) por 2 años.

*Factibilidad:* El grupo de trabajo estuvo constituido por expertos en diferentes áreas que complementarán sus conocimientos permitiendo un adecuado desarrollo de la investigación que conlleva aspectos básicos y clínicos. La experiencia de los investigadores en el manejo y tratamiento de pacientes permitió una óptima recolección de muestras clínicas y elaboración de bases de datos clínicos que fueron utilizados en el proyecto en el tiempo establecido. La investigación clínica estuvo a cargo del cirujano oncólogo Dr. Víctor Hugo Villafaña Vázquez y el Dr. Luis Alberto Solís Castillo residente de tercer año de la especialidad de ginecología oncológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad

del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3, Centro Médico Nacional la Raza del IMSS. En tanto la investigación básica e inmunológica estuvo a cargo del Dr. Alexander Pedroza González de la FES Iztacala, quien tiene una amplia experiencia en el desarrollo y análisis de protocolos de investigación en inmunología del cáncer lo que garantiza un adecuado desarrollo y análisis de los experimentos planeados, dichos experimentos serán realizados por estudiantes de maestría y doctorado que han sido entrenados en las técnicas de laboratorio necesarias para el proyecto.

## ASPECTOS ÉTICOS

El estudio de las muestras clínicas es de tipo prospectivo y descriptivo ya que no se realizó ninguna intervención en las pacientes, y se condujo bajo el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y la declaración de Helsinki de 1975 y sus enmiendas, así como los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica. Las muestras de sangre fueron obtenidas al momento de puncionar para la toma de estudios convencionales o al canalizar la vena para ingreso a cirugía y solo se tomó un tubo extra con 10 mL de sangre. Las muestras de tejido mamario se obtuvieron durante los procesos de cirugía terapéutica indicada como parte del tratamiento y se tomó una pequeña porción del tejido extraído que normalmente es desechado. Es un estudio con riesgo menor al mínimo para la paciente ya que no se requirió de ningún procedimiento extra al cual son sometidas normalmente las pacientes. Los nombres de las pacientes serán manejados confidencialmente y no serán utilizados en ningún reporte o análisis de datos. Solo el médico tratante conocerá dicho dato y se asignará un código de identificación que será utilizado en la investigación. Se solicitó consentimiento informado para participar en este estudio. De las muestras biológicas de tejido se guardó un pequeño fragmento de 0.3 cm<sup>3</sup> por crio preservación para establecer un banco de tejido de referencia. El resguardo de las muestras se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM y el responsable del resguardo de las mismas será Dr. Alexander Pedroza González.

## RESULTADOS

### Análisis de los resultados.

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

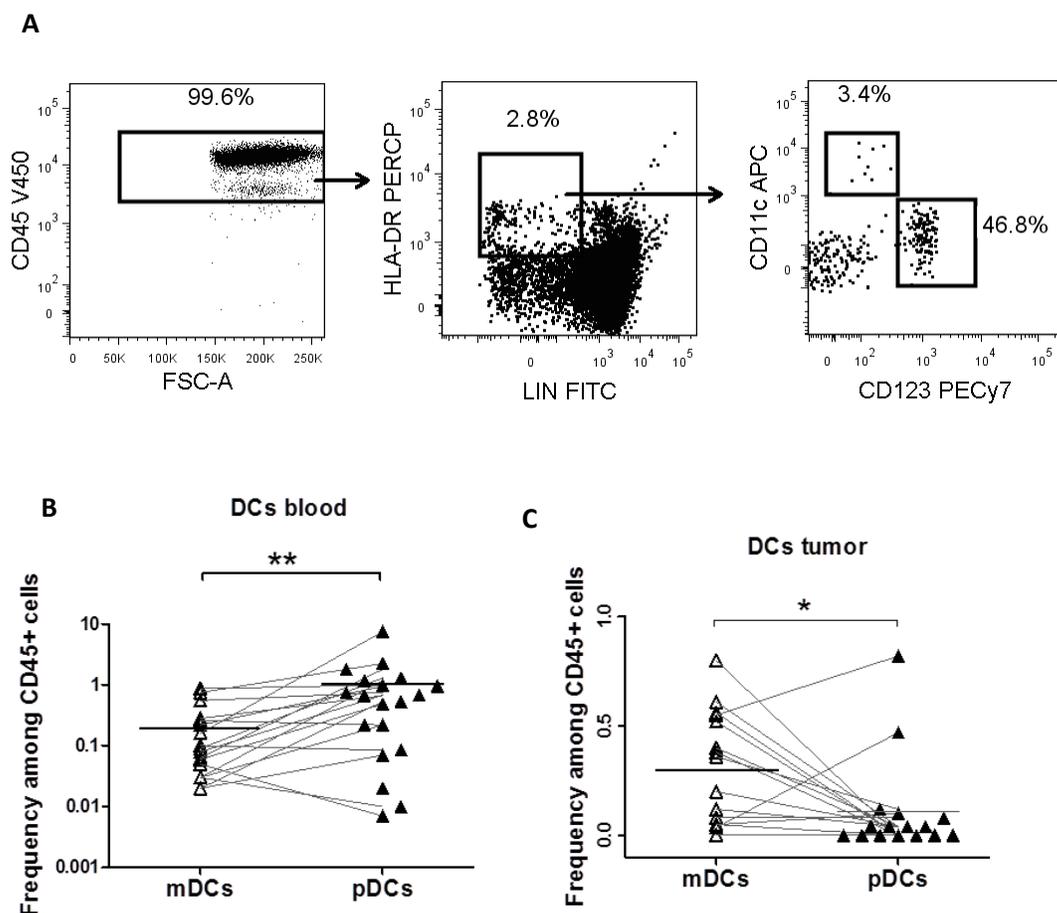
Tabla 1. Características clínicas de los pacientes

Columna1	Column2
<b>Sexo Femenino/Masculino</b>	81/0
<b>Edad</b>	21-83 (mediana de 56)
Carcinoma ductal infiltrante	53
Carcinoma lobulillar infiltrante	10
Adenocarcinoma ductal infiltrante	4
Carcinoma mixto (Ductal y Lobulillar)	3
Carcinoma medular Infiltrante	3
Carcinoma mucinoso	2
Carcinoma tubulo lobulillar	2
Adenocarcinoma lobular infiltrante	1
Carcinoma ductal in situ	1
Carcinoma micropapilar infiltrante	1
Carcinoma Infiltrante Tubulo Lobulillar	1
<b>Ganglios negativos/positivos</b>	47/30 (4 no determinados)
<b>Estadio patologico</b>	
Tis	2
IA	27
IIA	28
IIB	16
IIIA	8

## Resultados

### Células dendríticas.

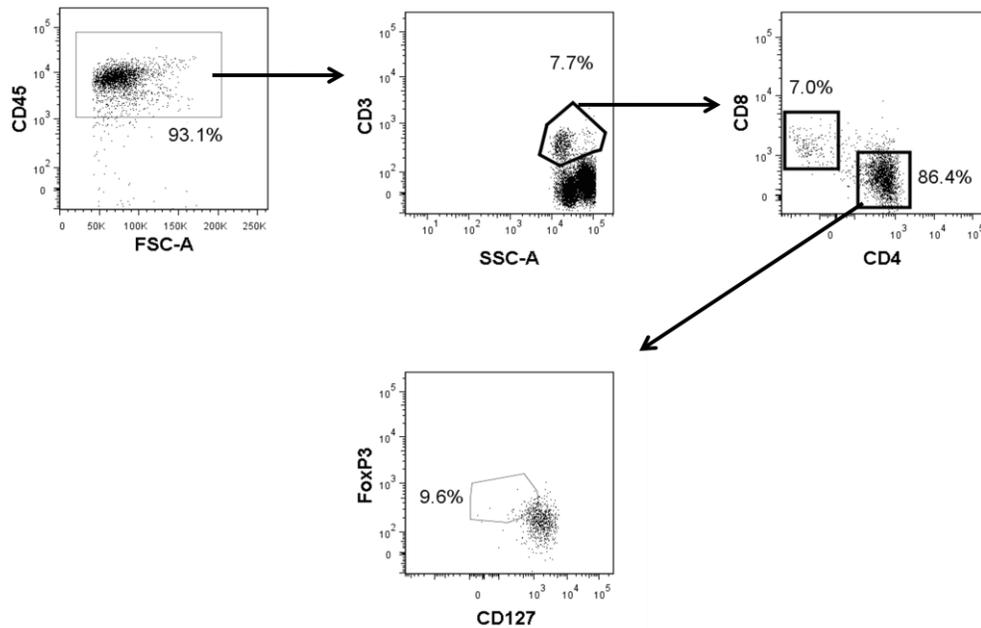
Una de las poblaciones más importantes en la inducción y regulación de una respuesta inmune son las células dendríticas (DCs). Las principales subpoblaciones de DCs son las DCs mieloides (mDCs) o convencionales, caracterizadas por la expresión de CD11c y HLA-DR; y las DCs plasmacitoides (pDCs) identificadas por la expresión de CD123 y HLA-DR y negativas para la expresión de marcadores de linajes como CD3, CD16, CD19 y CD56. Ambas poblaciones han sido identificadas en el infiltrado leucocitario en tumores de cáncer de mama, sin embargo su frecuencia es poco conocida. Por tal motivo decidimos analizar su frecuencia en el tejido tumoral. Para ellos se realizó un análisis por citometría de flujo en donde se identificó a las células por medio de marcadores de superficie como se ha descrito en la literatura. Para ello se seleccionó a las células CD45+ que fueran negativas para CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 y CD56 (Linage) y positivas para HLA-DR. Dentro de esta región de células se seleccionaron de acuerdo a la expresión de CD11c (mDCs) y de CD123 (pDCs) (figura 1A). Al analizar la frecuencia de ambas poblaciones en sangre y tejido tumoral, se observó que en la sangre de las pacientes hay un claro predominio de pDCs, mientras que en el tejido dicha proporción esta invertida con un predominio de mDCs (figura 1D-E).



**Figura 1. Frecuencia de células dendríticas en tejido tumoral y sangre.** Suspensiones celulares obtenidas de tejido tumoral y sangre fueron analizadas por citometría de flujo. A) Estrategia de análisis para identificar a pDCs (CD45+Lin-HLA-DR+CD123+) y mDCs (CD45+Lin-HLA-DR+CD11c+) en las muestras clínicas. Proporciones de mDCs y pDCs en sangre (D) y tejido tumoral (E).

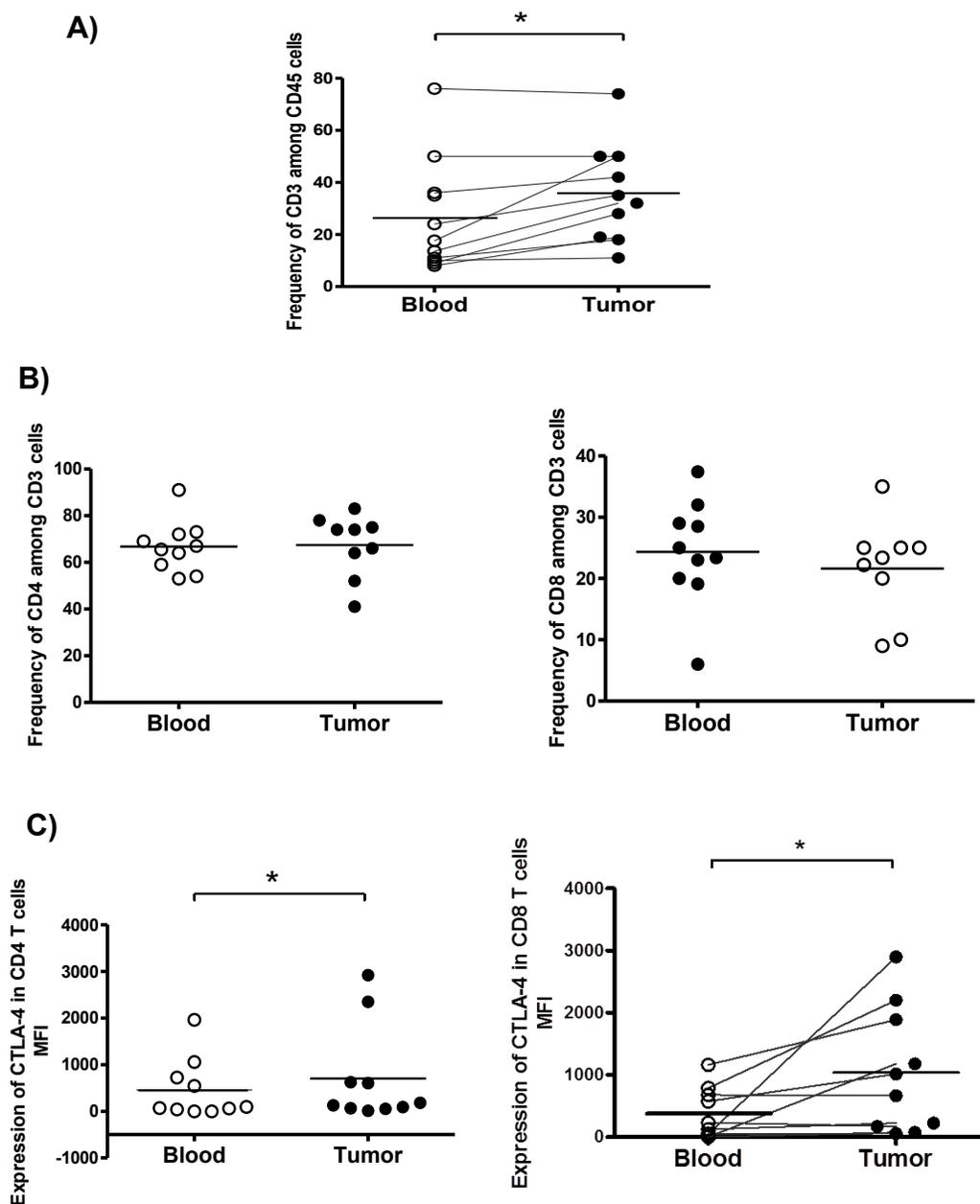
### Linfocitos T

En el infiltrado leucocitario una fracción importante corresponde a linfocitos T. Para determinar las proporciones de células T CD4 y CD8 y la de linfocitos T reguladores (Tregs) se siguió la estrategia de análisis mostrada en la figura 2, donde primero se selecciono a la fracción leucocitaria por la expresión de CD45, posteriormente se identifico a las células T por la expresión de CD3. En esta región de analizó la frecuencia de células CD4+ y CD8+. Finalmente dentro de la región de células CD3+CD4+se identificó la presencia de linfocitos Treg que fueron FoxP3+ y CD127-.



**Figura 2. Estrategia de análisis de las subpoblaciones de linfocitos T presentes en el tejido tumoral.** Las suspensiones celulares de sangre periférica y de tejido tumoral fueron teñidas con anticuerpos monoclonales y analizadas de acuerdo a la expresión de CD45, CD3, CD4, CD8, CD127 y FoxP3.

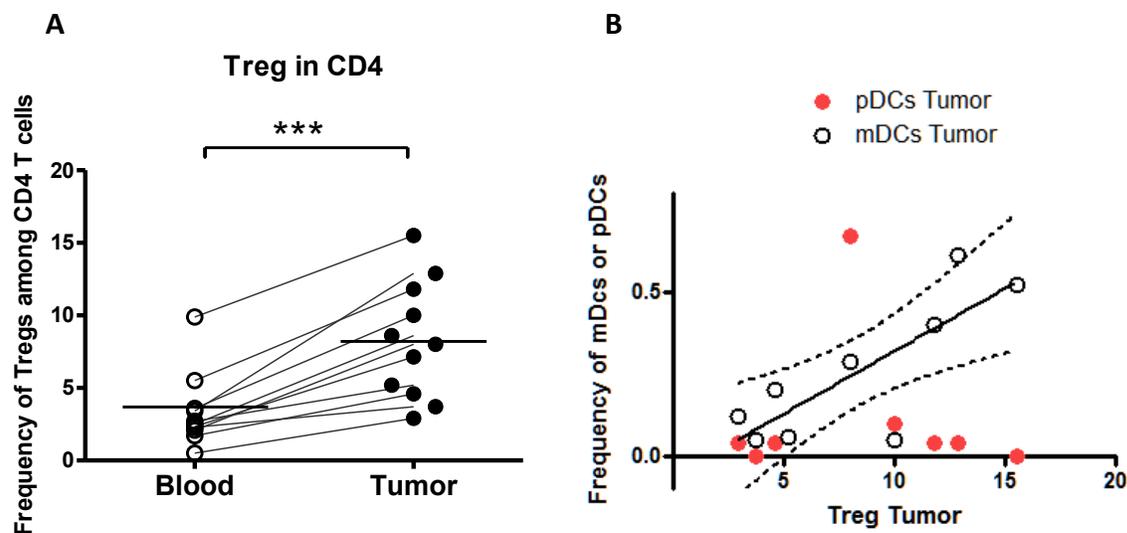
Como se observa en la figura 3A, hay una mayor proporción de linfocitos T CD3+ en la fracción leucocitaria infiltrante del tejido tumoral que la que se encuentra presente en sangre periférica. Sin embargo la proporción de CD4 y CD8 es muy similar entre ambos compartimientos (figura 3B). Cuando medimos la expresión de CTLA-4, que es una molécula de regulación negativa se observó una mayor expresión en los linfocitos tumorales tanto CD4 como CD8 (figura 3C).



**Figura 3. Frecuencia y fenotipo de linfocitos T tumorales.** Se determino la frecuencia de linfocitos T CD4 y CD8 en el tejido tumoral y sangre periférica por citometría de flujo. Frecuencia de linfocitos T CD3+ (A), CD3+CD4+ y CD3+CD8+ (B) en la fracción CD45 de sangre o tejido tumoral. Expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4 y CD8 de sangre y tumor (C).

Asimismo, en el tumor se observó una mayor frecuencia de células Tregs (con una mediana de 8%) que en la sangre periférica (con una mediana de 2.5%) (figura 4A), lo cual denota un microambiente inmunosupresor en el tejido tumoral.

Interesantemente se observó una correlación positiva entre la frecuencia de células Tregs y la de mDCs dentro del tejido tumoral (figura 4B). Contrariamente no hay correlación entre pDCs y Tregs.



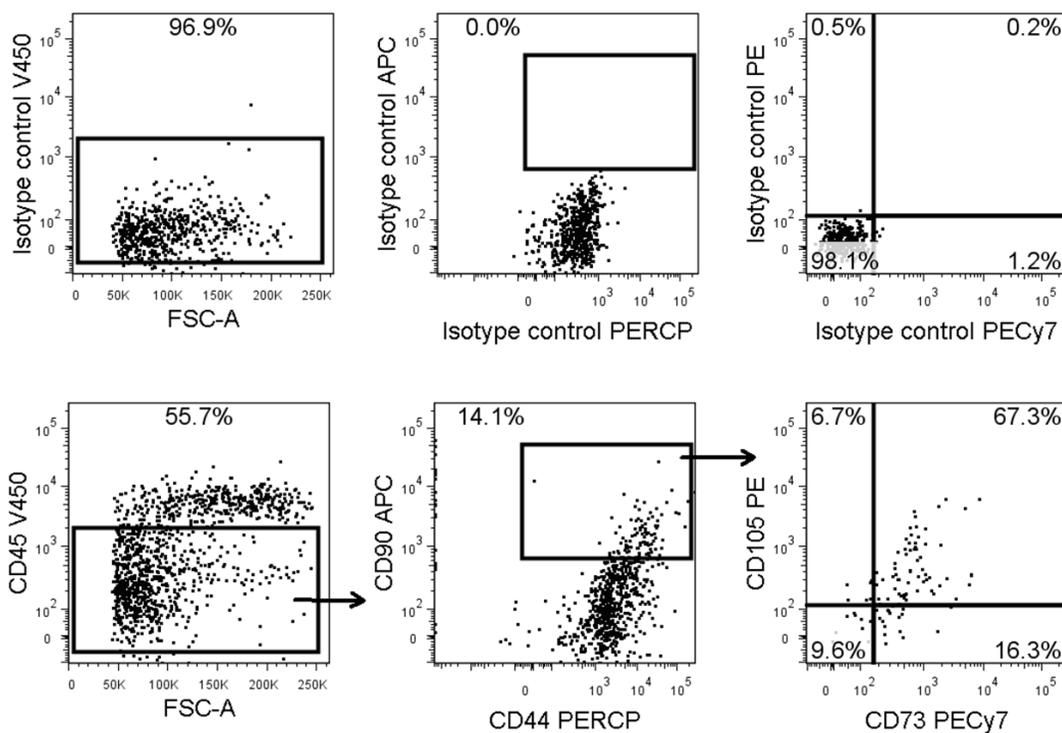
**Figura 4. Células Tregs y correlación con mDCs.** A) La proporción de células Tregs se determinó por citometría de flujo en suspensiones celulares derivadas de sangre o tejido tumoral. Las células Tregs fueron identificadas como CD45+CD3+CD4+FoxP3+CD127-. B) Correlación entre la frecuencia de células Treg y DCs.

#### Células mesenquimales estromales.

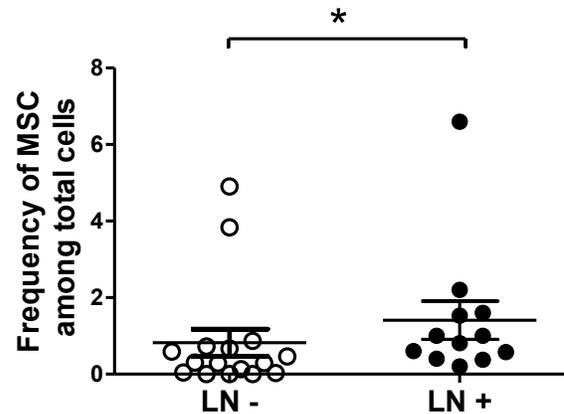
La presencia de MSCs ha sido documentada en modelos animales y en tumores mamarios humanos, sin embargo no se ha establecido su frecuencia en tejidos humanos. Por lo anterior decidimos estudiar a dicha población celular de tumores humanos de cáncer de mama y realizar su fenotipo utilizando los marcadores ampliamente aceptados en la literatura internacional como característicos de esta población celular.

Con el fenotipo establecido de CD45-CD90+CD44+CD73+CD105+ se realizó el análisis de suspensiones celulares derivadas de sangre periférica y tejido tumoral frescos para determinar la frecuencia de las MSCs (figura 5). En sangre periférica no se detectó la presencia de dichas células, mientras que su frecuencia en el tejido tumoral fue de 1 % de las células totales obtenidas en las suspensiones celulares.

Importantemente, observamos que dependiendo de la afectación de los ganglios axilares la frecuencia de MSCs es significativamente diferente, siendo mayor en los pacientes con al menos un ganglio afectado en comparación de aquellos que no presentan afección ganglionar (figura 6)



**Figura 5. Análisis fenotípico de MSCs en tumores frescos.** Muestras de tumores de mama frescos fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la frecuencia de las MSCs en el tejido tumoral. Las MSCs fueron identificadas como CD45-CD90+CD44+CD73+CD105+. Panel superior muestra a los controles de tinción (anticuerpos controles de isotipo)



**Figura 6. Frecuencia de MSCs y afección de ganglios axilares.** Análisis de la frecuencia de MSCs en el tejido tumoral dependiendo del estado de afectación de los ganglios linfáticos axilares.

## DISCUSIÓN

La presencia de infiltrado leucocitario en tumores primarios de mama ha sido documentada ampliamente, desde el año 1997 se describió como un factor de buen pronóstico la presencia de leucocitos en el tejido tumoral en pacientes menores a 40 años [35]. Sin embargo, se ha observado que la presencia de leucocitos en el tejido tumoral representa una mezcla muy heterogénea de células de la respuesta inmunitaria y que dependiendo del tipo celular y de su estado de activación pueden tener un significado clínico diferente [36-38], por lo tanto no es suficiente con determinar la frecuencia de leucocitos totales como una medida diagnóstica o pronóstica de la enfermedad. De acuerdo a lo anterior es más importante el análisis de poblaciones específicas de leucocitos para determinar el estado inmunológico y su posible implicación en la patogenia de la enfermedad.

Una de las poblaciones leucocitarias con mayor repercusión en el desarrollo tumoral son las DCs, diversos estudios han descrito que estas células son condicionadas por el microambiente tumoral para inducir un estado de inmunosupresión local permisivo para el crecimiento de las células cancerosas. Las DCs están constituidas por múltiples subpoblaciones, siendo las más abundantes, las células dendríticas mieloides o convencionales y las DCs plasmacitoides. En el año 2007 el Dr. Pedroza y colaboradores describieron la participación de las mDCs en el desarrollo tumoral en un modelo de ratones

humanizados de cáncer de mama [10], cuatro años después el mismo grupo describió los mecanismos involucrados en dicho proceso en donde las mDCs infiltrantes del tumor se encuentran expuestas a una citocina llamada linfopoyetina tímica estromal (TSLP, por sus siglas en inglés “thymic stromal lymphopoietin”), que normalmente se produce en el timo, pero que es producida por las células tumorales. TSLP induce la expresión de la molécula de co-estimulación OX40L sobre las mDCs provocando con ello que los linfocitos T que entran en contacto con estas DCs se polaricen hacia un fenotipo Th2. Los linfocitos Th2 productores de IL-4 y IL-13 favorecen el desarrollo tumoral al inducir la producción de factores de crecimiento celular en otras células como los macrófagos [11]. Así mismo, las células Th2 inhiben la generación de una respuesta Th1, que es esencial para el control del crecimiento tumoral. De forma similar un grupo francés en el año 2015 describió que las pDCs estimuladas con GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos) producido en el tejido tumoral también inducen la generación de linfocitos Th2 en el microambiente tumoral en estadios avanzados [39]. En el presente estudio encontramos que ambas poblaciones de DCs están infiltrando el tejido tumoral en pacientes que están en estadios tempranos. La población predominante fueron las mDCs con una frecuencia de  $0.29 \pm 0.25\%$ , en tanto que las pDCs están en menor frecuencia  $0.1 \pm 0.2\%$ . Contrariamente, en sangre periférica encontramos un predominio de pDCs, lo cual resulta interesante debido a que un estudio previo reporta que la frecuencia de pDCs en sangre constituye un factor pronóstico de la enfermedad [40]. A mayor frecuencia existe una mayor supervivencia a 5 años, en tanto que en estadios avanzados la frecuencia de pDCs disminuye significativamente en sangre periférica. Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados debido a que en nuestros pacientes, que se encuentran en estadios tempranos, hay un marcado predominio de pDCs sobre las mDCs en la sangre excepto en tres pacientes (3/18, 16%). Resultaría interesante poder evaluar a los pacientes en el futuro y verificar si las frecuencias de pDCs cambian conjuntamente con la evolución clínica, especialmente en los tres pacientes con un predominio de mDCs en la sangre.

El análisis de los linfocitos T muestra que la frecuencia de células T CD4-CD8 es muy similar entre la sangre y el tejido tumoral. Sin embargo, la expresión de la molécula de regulación negativa CTLA-4 está más expresada en los linfocitos infiltrantes del tumor. Debido a que la expresión de CTLA-4 está asociada con la desactivación linfocitaria [41], hace suponer que los linfocitos tumorales están siendo inactivados favoreciendo un estado de tolerancia inmunológica local. Esto concuerda con una mayor frecuencia de linfocitos Tregs en el tejido tumoral. Estos datos son congruentes con estudios previos que describen un microambiente

inmunosupresor en cáncer de mama [42-44]. Al analizar si hay alguna correlación entre la frecuencia de DCs y Tregs, encontramos que las mDCs y Tregs presentan una correlación positiva dentro del tejido tumoral, mientras no existe correlación entre las frecuencias de Tregs y pDCs. Previamente ha sido reportado que las pDCs contribuyen al desarrollo tumoral al inducir y activar linfocitos Tregs dentro de los tumores en cáncer de mama en estadios avanzados [16, 17]. Estas observaciones pueden significar que en estadios avanzados las pDCs se encuentran en mayor proporción que en estadios tempranos y que contribuyen de manera importante en la inmunosupresión asociada a dichos tumores, en tanto en estadios tempranos las mDCs podrían estar desempeñando un papel más relevante que las pDCs dada la frecuencia y su correlación con las células Tregs observadas en nuestro estudio, donde la mayor parte de las pacientes están en estadios I y II. Estos datos justifican futuros estudios con cohortes de pacientes que incluyan tanto estadios tempranos como avanzados durante un periodo de tiempo mayor para poder evaluar aspectos clínicos como recurrencia y sobrevida, lo cual permitirá realizar un análisis más completo.

Finalmente, corroboramos la presencia de MSCs en los tumores primarios de cáncer de mama en pacientes mexicanas, puesto que los únicos reportes existentes fueron hechos en China y solo analizaron grupos pequeños de pacientes (n = 9 y 14) [45, 46]. En nuestro cohorte de pacientes las MSCs estuvieron presentes en 25 de 28 (89%) muestras analizadas de tejido tumoral y no se detectaron en sangre periférica. La frecuencia fue de 1 % (rango de 0-6.6 %) de las células totales obtenidas de cada muestra. No existen datos de la frecuencia de estas células en tejidos tumorales, de hecho los datos de frecuencia en médula ósea y en tejido adiposo son indirectos a través de la medición de unidades formadoras de colonias con frecuencias menores a las que encontramos en los tumores, 0.0029 % en médula ósea y 0.12 % en el tejido adiposo [47]. El fenotipo es el mismo a las MSCs derivadas de médula ósea siendo negativas para CD45 y expresan las moléculas CD90, CD44, CD73 y CD105. La presencia de MSCs en el tejido tumoral con relativamente elevadas frecuencias y presentes en más del 80 % de los tumores analizados sugiere que tienen una participación significativa en el establecimiento del microambiente tumoral. Importantemente se observa que la frecuencia de MSCs es significativamente diferente más elevada en los pacientes que tuvieron al menos un ganglio afectado en comparación de aquellos que no presentaron afecciones en ganglios. Esto podría sugerir que la presencia de MSCs favorece la migración de las células tumorales hacia otros tejidos como ha sido descrito en algunos modelos in vitro e in vivo [28, 48, 49]. De todas las poblaciones analizadas en este estudio la frecuencia de MSCs fue la

única que tuvo asociación con los parámetros clínicos, en específico con la afección de ganglios que actualmente es uno de los principales factores pronóstico de la enfermedad [6]. Para confirmar que la frecuencia de MSCs puede ser un factor pronóstico de la enfermedad se requiere de futuros análisis incluyendo pacientes en estadios avanzados y datos clínicos de sobrevida, reincidencia y metástasis. Por lo tanto nuestro estudio sienta las bases para futuras investigaciones que permitan corroborar los hallazgos encontrados y su relación con clínica y patogenia de la enfermedad.

## CONCLUSIÓN

La mayoría de los pacientes analizados en este estudio se encontraban en estadios tempranos (I y II) de la enfermedad puesto que las muestras las obtuvimos de pacientes candidatas al tratamiento quirúrgico curativo. La inclusión de estadios tempranos permitió detectar los eventos iniciales en el microambiente tumoral, sin embargo la falta de estadios avanzados fue una limitante para obtener conclusiones más determinantes acerca de la implicación de las poblaciones analizadas en el desarrollo de la enfermedad.

El tejido tumoral en etapas tempranas tiene una importante proporción de células leucocitarias infiltrantes que reflejan la inmunogenicidad de los tumores primarios de cáncer de mama. Sin embargo, el infiltrado leucocitario contiene una frecuencia elevada de células Tregs y una mayor expresión de CTLA-4 en ambas poblaciones linfocitarias (CD4 y CD8), indicando claramente el estado de inmunosupresión local presente en el microambiente tumoral.

En estadios tempranos existe un predominio de mDCs en el tejido tumoral, mientras que en sangre periférica son las pDCs las células dendríticas dominantes. La frecuencia de mDCs en el tejido tumoral tuvo una correlación positiva con las células Tregs sugiriendo que las mDCs pueden estar induciendo la generación de linfocitos Tregs en el microambiente de los tumores mamarios.

La frecuencia de las DCs en el tejido tumoral y en la sangre pueden ser factores pronósticos del desarrollo de cáncer de mama, pero requiere ser confirmado en futuros estudios que incluyan estadios tempranos y avanzados de la enfermedad.

Se confirmó la presencia de MSCs en los tumores primarios de cáncer de mama en pacientes mexicanas y su frecuencia está asociada con la afectación de los ganglios axilares.

Los datos obtenidos en la presente investigación permiten asentar las bases y justificar la realización de futuros estudios para confirmar la implicación de las células inmunitarias y MSCs en la patogenia de cáncer de mama y su valor diagnóstico y pronóstico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Mexico. 2013.*
2. Gonzalez-Angulo, A.M., et al., *Trends for inflammatory breast cancer: is survival improving?* *Oncologist*, 2007. **12**(8): p. 904-12.
3. Cristofanilli, M., et al., *Inflammatory breast cancer (IBC) and patterns of recurrence: understanding the biology of a unique disease.* *Cancer*, 2007. **110**(7): p. 1436-44.
4. Santa-Maria, C.A. and W.J. Gradishar, *Changing Treatment Paradigms in Metastatic Breast Cancer: Lessons Learned.* *JAMA Oncol*, 2015. **1**(4): p. 528-534.
5. Unger-Saldana, K., *Challenges to the early diagnosis and treatment of breast cancer in developing countries.* *World J Clin Oncol*, 2014. **5**(3): p. 465-77.
6. Lasso Varela, A., R. Cobos Campos, and A. Alia Ramos, *Recurrencias loco-regionales en pacientes con cáncer de mama invasivo que presentan 3 ganglios positivos o menos. ¿Está indicada la radioterapia?* *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia*, 2012. **39**(5): p. 203-209.
7. Spector, N.L. and K.L. Blackwell, *Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer.* *J Clin Oncol*, 2009. **27**(34): p. 5838-47.
8. Ravelli, A., et al., *Immune-related strategies driving immunotherapy in breast cancer treatment: a real clinical opportunity.* *Expert Rev Anticancer Ther*, 2015. **15**(6): p. 689-702.
9. Ernst, B. and K.S. Anderson, *Immunotherapy for the treatment of breast cancer.* *Curr Oncol Rep*, 2015. **17**(2): p. 5.
10. Aspod, C., et al., *Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development.* *J Exp Med*, 2007. **204**(5): p. 1037-47.
11. Pedroza-Gonzalez, A., et al., *Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation.* *J Exp Med*, 2011. **208**(3): p. 479-90.
12. Ito, T., et al., *TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand.* *J Exp Med*, 2005. **202**(9): p. 1213-23.
13. Olkhanud, P.B., et al., *Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression.* *J Immunol*, 2011. **186**(10): p. 5656-62.

14. De Monte, L., et al., *Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer*. J Exp Med, 2011. **208**(3): p. 469-78.
15. Hanabuchi, S., et al., *Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus*. J Immunol, 2010. **184**(6): p. 2999-3007.
16. Faget, J., et al., *ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells*. Cancer Res, 2012. **72**(23): p. 6130-41.
17. Faget, J., et al., *ICOS is associated with poor prognosis in breast cancer as it promotes the amplification of immunosuppressive CD4 T cells by plasmacytoid dendritic cells*. Oncoimmunology, 2013. **2**(3): p. e23185.
18. Pedroza-Gonzalez, A., et al., *Activated tumor-infiltrating CD4+ regulatory T cells restrain antitumor immunity in patients with primary or metastatic liver cancer*. Hepatology, 2013. **57**(1): p. 183-94.
19. Sisirak, V., et al., *Impaired IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression*. Cancer Res, 2012. **72**(20): p. 5188-97.
20. Srabovici, N., et al., *Interleukin 13 expression in the primary breast cancer tumour tissue*. Biochem Med (Zagreb), 2011. **21**(2): p. 131-8.
21. Hall, B., M. Andreeff, and F. Marini, *The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles*. Handb Exp Pharmacol, 2007(180): p. 263-83.
22. Direkze, N.C., et al., *Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts*. Cancer Res, 2004. **64**(23): p. 8492-5.
23. Kidd, S., et al., *Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30563.
24. Mishra, P.J., et al., *Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells*. Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4331-9.
25. Quante, M., et al., *Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth*. Cancer Cell, 2011. **19**(2): p. 257-72.
26. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
27. Hogan, N.M., et al., *Mesenchymal stem cells in the colorectal tumor microenvironment: recent progress and implications*. Int J Cancer, 2012. **131**(1): p. 1-7.

28. Karnoub, A.E., et al., *Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis*. *Nature*, 2007. **449**(7162): p. 557-63.
29. Shinagawa, K., et al., *Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(10): p. 2323-33.
30. Peddareddigari, V.G., D. Wang, and R.N. Dubois, *The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis*. *Cancer Microenviron*, 2010. **3**(1): p. 149-66.
31. Hernanda, P.Y., et al., *Tumor promotion through the mesenchymal stem cell compartment in human hepatocellular carcinoma*. *Carcinogenesis*, 2013. **34**(10): p. 2330-40.
32. Lujic, B., et al., *Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 2298.
33. McAndrews, K.M., et al., *Mesenchymal Stem Cells Induce Directional Migration of Invasive Breast Cancer Cells through TGF-beta*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 16941.
34. Patel, S.A., et al., *Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta*. *J Immunol*, 2010. **184**(10): p. 5885-94.
35. Menard, S., et al., *Lymphoid infiltration as a prognostic variable for early-onset breast carcinomas*. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(5): p. 817-9.
36. DeNardo, D.G., et al., *Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy*. *Cancer Discov*, 2011. **1**(1): p. 54-67.
37. Treilleux, I., et al., *Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(22): p. 7466-74.
38. Yuan, Z.Y., et al., *High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis*. *Onco Targets Ther*, 2014. **7**: p. 1475-80.
39. Ghirelli, C., et al., *Breast Cancer Cell-Derived GM-CSF Licenses Regulatory Th2 Induction by Plasmacytoid Predendritic Cells in Aggressive Disease Subtypes*. *Cancer Res*, 2015. **75**(14): p. 2775-87.
40. Kini Bailur, J., B. Gueckel, and G. Pawelec, *Prognostic impact of high levels of circulating plasmacytoid dendritic cells in breast cancer*. *J Transl Med*, 2016. **14**(1): p. 151.
41. Tai, X., et al., *Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells*. *Blood*, 2012. **119**(22): p. 5155-63.
42. Gobert, M., et al., *Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome*. *Cancer Res*, 2009. **69**(5): p. 2000-9.

43. Wang, Z.K., et al., *Regulatory T cells increase in breast cancer and in stage IV breast cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(6): p. 911-6.
44. Lee, S., et al., *Prognostic impact of FOXP3 expression in triple-negative breast cancer*. *Acta Oncol*, 2013. **52**(1): p. 73-81.
45. Zhang, C., et al., *Mesenchymal stem cells derived from breast cancer tissue promote the proliferation and migration of the MCF-7 cell line in vitro*. *Oncol Lett*, 2013. **6**(6): p. 1577-1582.
46. Yan, X.L., et al., *Mesenchymal stem cells from primary breast cancer tissue promote cancer proliferation and enhance mammosphere formation partially via EGF/EGFR/Akt pathway*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **132**(1): p. 153-64.
47. Dmitrieva, R.I., et al., *Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(2): p. 377-83.
48. Liu, C., et al., *Mesenchymal stem cells enhance the metastasis of 3D-cultured hepatocellular carcinoma cells*. *BMC Cancer*, 2016. **16**: p. 566.
49. Ke, C.C., et al., *In vivo fluorescence imaging reveals the promotion of mammary tumorigenesis by mesenchymal stromal cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e69658.

## ANEXOS

### Anexo 1. - Carta de consentimiento informado.



Carta de consentimiento informado para  
participación en protocolo de investigación



Título de la investigación: **Identificación y caracterización de células inmunosupresoras en tumores de pacientes con cáncer de mama**

Número de registro: pendiente

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

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

#### Posibles riesgos y molestias:

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

#### Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:

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

#### Participación o retiro:

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

#### Privacidad y confidencialidad:

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

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

Investigador Responsable:

Dr. Víctor Hugo Villafaña Vázquez

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

Tel. 57245900 ext 23726 Correo electrónico: victor.villafaña@imss.gob.mx

Colaboradores:

Dr. Luis Alberto Solís Castillo

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

Tel. 5545376243 Correo electrónico: solis\_med57@hotmail.com

Dr. Alexander Pedroza González

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

Tel. 56231220 Correo electrónico: alexander\_pg@hotmail.com

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

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

Fecha:

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del sujeto

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Nombre, dirección, relación y firma

\_\_\_\_\_  
Nombre, dirección, relación y firma

## Anexo 2.- Instrumento de recolección de datos

### Hoja de Captura de información.

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Número de identificación (Asignado por el investigador): \_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento: \_\_\_\_\_

Diagnostico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Grado del tumor: \_\_\_\_\_

Receptores	Positivo/negativo	% Células positivas	Intensidad
Estrógenos			
Progesterona			
Her-2 neu			
Ki-67			

Estadio: \_\_\_\_\_

TNM: \_\_\_\_\_

Tamaño del tumor(es) primario(s): \_\_\_\_\_

Sitios de metástasis: \_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tratamiento: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Fecha de cirugía: \_\_\_\_\_

Tipo de cirugía: \_\_\_\_\_

Muestras obtenidas y fecha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Sangre (volumen): \_\_\_\_\_

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

---



---



---

Tratamiento: \_\_\_\_\_

---



---

Fecha de cirugía: \_\_\_\_\_

Tipo de cirugía: \_\_\_\_\_

Muestras obtenidas y fecha: \_\_\_\_\_

---

Sangre (volumen): \_\_\_\_\_

Biopsia: \_\_\_\_\_

---

Tejido post-operatorio

Tejido normal (Características y tamaño): \_\_\_\_\_

---

Tejido tumoral (Características y tamaño): \_\_\_\_\_

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

Frecuencia (%) de leucocitos (CD45+):

	Sangre	Tejido normal	Tumor
Linfocitos CD3+CD4+			
Linfocitos CD3+CD8+			
Células Tr-1			
RDCs			
MSCs			
Células Tregs			

### Anexo 3.- Cronograma de actividades.

El estudio se planea desarrollar en 2 años. A continuación se desglosa los objetivos y las metas anuales:

Año	Objetivo/Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>1</b> <b>01-10-2015-</b> <b>01-10-2016</b>	Estandarizar las condiciones experimentales para el procesamiento de muestras clínicas. Determinar la frecuencia y fenotipo de células Tregs mDCs, pDCs y MSCs en sangre y tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama y su posible correlación.	■			■								
<b>2</b> <b>01-10-2016</b> <b>31-03-2017</b>	Determinar la frecuencia y fenotipo de células Tregs mDCs, pDCs y MSCs en sangre y tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama y su posible correlación Escritura de tesis y publicación	■					■						



**Dirección de Prestaciones Médicas**  
 Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
 Coordinación de Investigación en Salud



15 de febrero del 2016

Ref. 09-B5-61-2800/201600/ 0470

Dr. VILLAFANA VAZQUEZ VICTOR HUGO  
 DIVISION DE GINECO-OBSTETRICIA  
 D.F. Norte

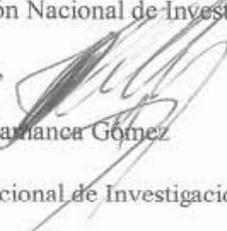
Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Identificación y caracterización de mecanismos inmunosupresores en tumores de pacientes con cáncer de mama.** , fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales del Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS, se ha emitido el dictamen de **APROBADO**, con número de registro: R-2016-785-015.

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

Atentamente,

  
 Dr. Fabio Salamanca Gómez  
 Presidente  
 Comisión Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

 JMA/ iah. F-CNIC-2015-154

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos Av. Camilitán s/n Col. Doctores México 06720 56276900 ext. 31210 cardia@cnic.gob.mx