

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA “ALBERTO CAZORLA
TALLERI”



POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS M1/M2, PORCENTAJE DE LINFOCITOS
Y DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y PERFIL DE CITOQUINAS TH1/TH2/TH17
EN SANGRE PERIFÉRICA Y EN BIOPSIAS DE PACIENTES PERUANAS
CON CÁNCER DE MAMA EN DIFERENTES ESTADIOS

Sandra Vanessa Jara Angeles

Tesis para optar por el título de Licenciado en Biología

Asesor: PhD. Iván Lozada Requena

Lima, Perú

2019

La presente tesis se realizó en el marco del proyecto “Círculo para la investigación de agentes infecciosos endémicos causantes de cáncer en Perú”, el cual se encuentra financiado por 204-2015-FONDECYT.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Dios por darme salud para completar esta etapa de mi carrera y por todo porque sin Él nada vale. A mis padres por el apoyo incondicional que siempre me brindan.

Al Departamento de Investigación del INEN por la donación de los materiales y muestras para realizar este trabajo. Al Dr. Aguilar por aceptarme en su laboratorio hace muchos años y por su guía y consejos constantes.

A mi asesor, el profesor Iván Lozada, por colaborar con los distintos aspectos de esta tesis. A mis amigos y a todos los miembros del laboratorio de Inmunología LID 108, en especial a Milagros que con su ayuda y carisma hizo esta experiencia aun más divertida.

ÍNDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Células inmunológicas implicadas en el cáncer de mama	5
1.2. Inmunoterapia	9
1.3. Estadios del cáncer de mama y la clasificación TNM (Tumor, Node, Metástasis)	10
II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
III. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo General	15
3.2. Objetivos específicos	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. Criterios de inclusión y exclusión de donantes	16
4.2. Obtención de muestras	16
4.3. Procesamiento de muestras	17
4.3.1. Procesamiento de Muestras de Sangre	18
4.3.2. Procesamiento de biopsias de tejido	18
4.4. Citometría de Flujo para poblaciones celulares de PBMC y SCMT	20
4.4.1. Determinación de linfocitos T, B y NK totales y LT CD4 y CD8 en sangre y tejido.	20
4.4.2. Determinación de macrófagos (M1/M2) en sangre y tejido.	24
4.4.3. Determinación de células dendríticas (CD) en sangre y tejido.	26
4.5. Medición de citoquinas Th1/Th2/Th17	28
4.6. Análisis de resultados	31
4.7. Aspectos éticos	31
V. RESULTADOS	32
5.1. Recopilación de los datos clínicos	32
5.2. Determinación de poblaciones linfocitarias	33
5.3. Determinación de poblaciones de macrófagos M1 y M2	38
5.4. Determinación de poblaciones de células dendríticas CDm y CDp	40
5.5. Análisis del perfil de citoquinas	42
VI. DISCUSIÓN	44
VII. CONCLUSIONES	50
VIII. RECOMENDACIONES	51
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

GLOSARIO

TNM = Tumor, node, metástasis

PBMC = Células mononucleares de sangre periférica

SCMT = Suspensión celular de muestra de tejido

M1/M2 = Macrófagos tipo 1 y 2

MT = Microambiente tumoral

CD (CDm, CDp) = Células dendríticas (mieloides, plasmacitoides)

TAM = Macrófagos asociados a tumor

OMS = Organización Mundial de la Salud

FNA = Aspiración con aguja fina

IHC = Inmunohistoquímica

RE = Receptor de estrógenos

RP = Receptor de progesterona

HER-2 = Receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2

Th = Linfocito T helper

NK = Natural Killer

TIL = Linfocitos infiltrantes de tumor

IL = Interleuquina

HBSS = Sales de Hanks

SBF = Suero bovino fetal

PBS = Buffer fosfato salino

CBA = Cytometric Bead Array

TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subtipos intrínsecos o moleculares del cáncer de mama.

Tabla 2. Grupos pronóstico/estadio anatómico del cáncer de mama.

Tabla 3. Panel de anticuerpos monoclonales usados para el marcaje de células inmunocompetentes en muestras de sangre y tejido.

Tabla 4. Distribución de muestras incluidas en el estudio.

Tabla 5. Resumen de la data clínica de las pacientes provenientes del INEN.

Tabla 6. Distribución de muestras de sobrenadante obtenido de células provenientes de sangre y tejido para el estudio del perfil de citoquinas.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos de cáncer a nivel mundial, en ambos sexos y todas las edades.

Figura 2. Tubo vacutainer con muestra de sangre.

Figura 3. Microtubo con muestra de biopsia en medio de transporte.

Figura 4. Esquema para el procesamiento de la muestra de tejido (biopsia).

Figura 5. Determinación de linfocitos T, B y NK en sangre.

Figura 6. Determinación de linfocitos T, B y NK en tejido.

Figura 7. Determinación de linfocitos T CD4 y CD8 en sangre.

Figura 8. Determinación de linfocitos T CD4 y CD8 en tejido.

Figura 9. Determinación de macrófagos M1 en sangre.

Figura 10. Determinación de macrófagos M1 en tejido.

Figura 11. Determinación de macrófagos M2 en sangre.

Figura 12. Determinación de macrófagos M2 en tejido.

Figura 13. Determinación de células dendríticas CDm y CDp en sangre.

Figura 14. Determinación de células dendríticas CDm y CDp en tejido.

Figura 15. Determinación de citoquinas Th1/Th2/Th17.

Figura 16. Porcentajes poblacionales de LT, LB y NK entre pacientes sin cáncer y los distintos estadios de pacientes con carcinoma mamario, en muestras de sangre y/o tejido.

Figura 17. Porcentajes poblacionales de LT CD4 y CD8 entre pacientes sin cáncer y los distintos estadios de pacientes con carcinoma mamario, en muestras de sangre y/o tejido.

Figura 18. Relación de LT CD4/CD8 entre pacientes sin cáncer y los distintos estadios de pacientes con carcinoma mamario, en muestras de sangre y/o tejido.

Figura 19. Comparación de porcentajes poblacionales de LT CD4 y CD8 por grupos y por tipo de muestra.

Figura 20. Porcentajes poblacionales de M1 y M2 entre pacientes sin cáncer y los distintos estadios de pacientes con carcinoma mamario, en muestras de sangre y/o tejido.

Figura 21. Comparación de porcentajes poblacionales de macrófagos M1 y M2 por grupos y por tipo de muestra.

Figura 22. Porcentajes poblacionales de CDm y CDp entre pacientes sin cáncer y los distintos estadios de pacientes con carcinoma mamario, en muestras de sangre y/o tejido.

Figura 23. Comparación de porcentajes poblacionales de células dendríticas CDm y CDp por grupos y por tipo de muestra.

Figura 24. Comparación del perfil de citoquinas Th1/Th2/Th17.

RESUMEN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más prevalente en la población femenina a nivel global y en el Perú. Hay muchos factores que pueden determinar la gravedad del cáncer, pero desde el punto de vista inmunológico, el microambiente tumoral (MT) puede definir la progresión de la enfermedad y sus componentes celulares y proteicos pueden resultar en excelentes predictores del curso del cáncer. Entre las células inmunocompetentes con roles importantes en cáncer están los macrófagos asociados a tumores (TAM), que están implicados en el comportamiento y el desarrollo del cáncer, constituyendo hasta el 50% del componente celular en el MT. Esta población celular, junto con otras células del sistema inmune, responden de una manera polarizante en presencia de un tumor, generando efectos anti-tumorales o pro-tumorales. Las respuestas asociadas a un perfil Th1 son esenciales para combatir el cáncer, mientras que un perfil Th2 puede ser de mal pronóstico. Asimismo, se ha descrito que el perfil de citoquinas en el MT es capaz de modular positiva o negativamente la respuesta inmune del huésped. Todos estos elementos inmunocompetentes deben haber transitado por la circulación sanguínea previamente y aunque es posible que cambien sus propiedades inmunomoduladoras al llegar al MT, su evaluación en sangre podría dar información importante que podría usarse como indicador del estado del paciente. En el Perú, no se conoce a detalle el perfil inmunológico de las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la polarización de macrófagos M1/M2, el número de linfocitos, y de células dendríticas y el perfil de citoquinas th1/th2/th17 en sangre periférica y en biopsias de pacientes peruanas con cáncer de mama en diferentes estadios. Se encontró que la principal diferencia en los parámetros inmunológicos en los distintos estadios se da entre tipos de muestras (sangre y tejido), lo cual es un hallazgo novedoso. Además se encontró que a medida que progresa la enfermedad hay una polarización M2 y una tendencia a una respuesta Th2, típicas de un mal pronóstico de la enfermedad.

Palabras clave: Células inmunocompetentes, cáncer de mama, citoquinas Th1/Th2/Th17, linfocitos, células dendríticas, macrófagos.

ABSTRACT

Breast cancer is the most prevalent type of cancer in the female population globally and in Peru. Many factors can determine the severity of the cancer, but from the immunological point of view, the tumor microenvironment (TM) can define the progression of the disease, and its cellular and protein components can result in excellent predictors of the course of cancer. Among the immunocompetent cells with important roles in cancer there are tumor-associated macrophages (TAM), which are involved in the behavior and development of cancer, constituting up to 50% of the cellular component in the TM. This cell population, along with other cells of the immune system, respond in a polarizing manner in the presence of a tumor, generating anti-tumor or pro-tumor effects. The responses associated with a Th1 profile are essential to fight cancer, whereas a Th2 profile may be of poor prognosis. Likewise, it has been described that the cytokine profile in the TM is capable of positively or negatively modulate the immune response of the host. All these immunocompetent elements must have previously traveled through the bloodstream and although it is possible that they change their immunomodulatory properties upon reaching the TM, their evaluation in blood could give important information about a basal behavior that could be used as an indicator of the patient's condition. In Peru, the immunological profile of the patients diagnosed with breast cancer is not known in detail. The objective of this study was to evaluate the polarization of M1/M2 macrophages, the number of lymphocytes, and dendritic cells and th1/th2/th17 cytokine profile in peripheral blood and in biopsies of Peruvian patients with breast cancer in different stages. It was found that the main difference in the immunological parameters in the different stages occurs between types of samples (blood and tissue), which is a novel finding. It was also found that as the disease progresses there is a M2 polarization and a tendency to a Th2 response, typical of a poor prognosis of the disease.

Key words: Immunocompetent cells, breast cancer, Th1/Th2/Th17 cytokines, lymphocytes, dendritic cells, macrophages.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud de impacto mundial, cuyos registros de víctimas constituyen una amenaza. A pesar de los constantes avances en tecnología y medicina, el cáncer no ha dejado de representar un reto para los especialistas en salud. Es la segunda causa principal de muerte globalmente; 1 de cada 6 muertes es debida al cáncer según la OMS (1). Estadísticas de cáncer reportadas por Siegel et al 2018, indican que solo en Estados Unidos, el número de casos de cáncer en varones ha disminuido en 2%, mientras que los casos en mujeres se han mantenido constantes (2). El tipo de cáncer que más afecta a la población femenina es el cáncer de mama, que es incluso el segundo tipo de cáncer más común en general, entre hombres y mujeres. De acuerdo a los datos recientemente actualizados de la GLOBOCAN 2018, el cáncer de mama es el cáncer de mayor prevalencia en el mundo y ocupa el segundo puesto en incidencia, con una diferencia mínima con respecto al cáncer de pulmón (Fig. 1) (3).

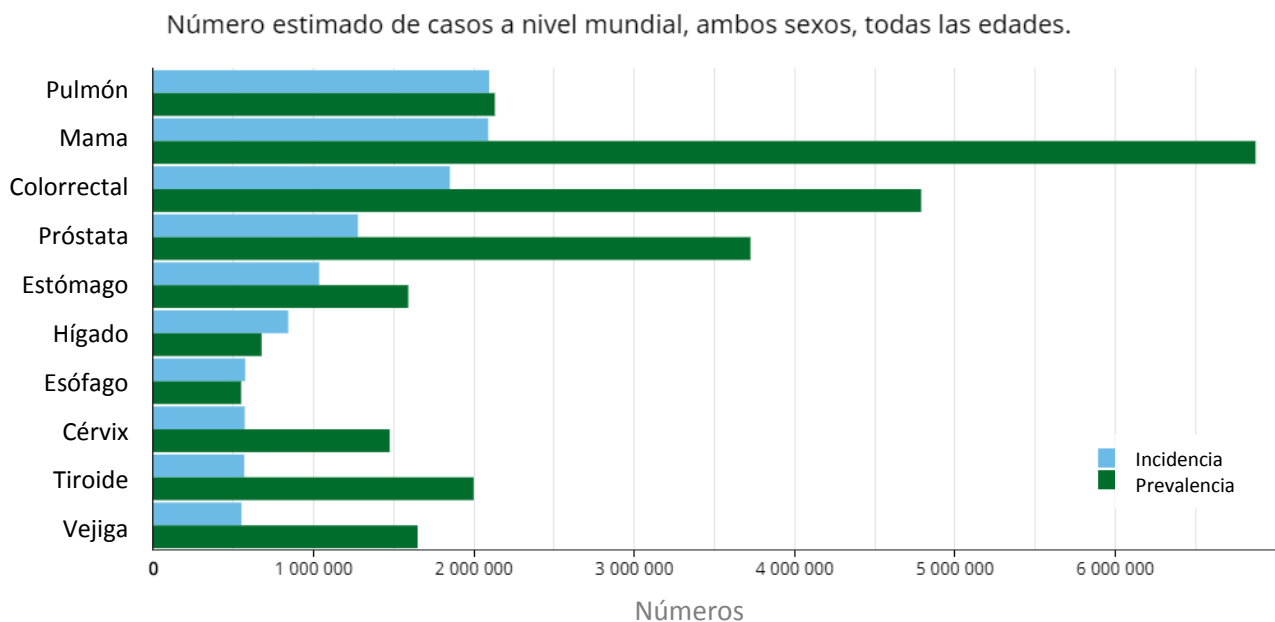


Figura 1. Incidencia y prevalencia de cáncer a nivel mundial, en ambos sexos y todas las edades, en los últimos 5 años. Fuente: GLOBOCAN 2018 (4).

En el Perú, el cáncer de mama solía ocupar el segundo puesto entre los tipos de cáncer que más afectaban a las mujeres, precedido solo por el cáncer de cérvix. Hoy en día, el cáncer de mama es el de mayor incidencia y figura en el segundo lugar en cuanto a tasas de mortalidad (4). Existe un plan nacional para la prevención y control del cáncer de mama donde se especifica que hay una brecha de equipamiento y hace falta mejorar los registros de información y la cobertura de los tamizajes (5). Sin embargo, es posible realizarse una auto-evaluación y es importante conocer los factores de riesgo para evitarlos.

Dentro de los factores de riesgo, hay algunos modificables y otros no modificables. Pero, tener uno o varios de estos factores no es sinónimo de que la enfermedad se desarrollará, así como también, aunque raro, se puede desencadenar la enfermedad sin factores de riesgo aparentes. La edad es uno de los factores que no se puede cambiar, la mayoría de los cánceres de mama son detectados en mujeres mayores de 50 años (6). Las mutaciones genéticas heredadas tampoco son modificables, las mujeres que tengan mutaciones en el gen BRCA1 o BRCA2 tienen más probabilidades de adquirir el cáncer. Otros factores no modificables son: la historia familiar del cáncer de mama, la raza (mujeres blancas son más propensas), lesiones mamarias previas, tratamientos con radiación, tener una elevada densidad mamaria, entre otros (7).

En general, pero sobre todo para aquellas mujeres que ya tengan factores de riesgo innatos, es recomendable evitar los factores de riesgo modificables. Mantener un nivel aceptable de actividad física, no tener sobrepeso y no tomar bebidas alcohólicas son algunas de las cosas que se pueden hacer para disminuir las probabilidades de tener cáncer. Se sabe que el uso de pastillas anticonceptivas u otras terapias hormonales aumentan el riesgo; así mismo, el no tener hijos y no dar de amamantar también puede tener un efecto negativo (7).

Como se vio anteriormente, la edad es un elemento importante para tomar en cuenta. Existen distintas organizaciones que hacen recomendaciones sobre cuando hacerse chequeos o exámenes de despistaje oncológico; la mayoría estipula que a partir de los 50 años se deberían realizar estos exámenes cada 2 años, pero mujeres mayores de 40 pueden decidir hacerse las pruebas consultando con sus médicos (8). Es necesario saber que las

mamografías pueden tener beneficios, pero también perjuicios. Løberg y colaboradores reportaron que de una población de 1000 mujeres, en el Reino Unido, 200 tuvieron un diagnóstico falso positivo y 30 incluso se sometieron a una biopsia por un resultado erróneo (9). Una revisión sistemática sobre la misma materia, hecha por Myers y colaboradores, concluye que el “screening” (prueba de despistaje) disminuye aproximadamente el 20% de la mortalidad asociada al cáncer de mama (10). Estudios más recientes, afirman que la mortalidad debido al cáncer de mama disminuye hasta 40% en mujeres que participan en screening cada 1 a 2 años (11). La tecnología va mejorando y con ello la capacidad de detección del cáncer. No obstante, las mujeres deben tener la información completa a disposición para elegir.

Además de las mamografías, el diagnóstico de cáncer de mama se puede comprobar con otros exámenes como: ultrasonido, resonancias magnéticas y en última instancia una biopsia que da mayor información sobre las características de la lesión, cualquiera sea la naturaleza (12) (13). La evaluación patológica requiere del análisis del tejido afectado, que se puede obtener por escisión quirúrgica, biopsia core (centro) o por aspiración con aguja fina (FNA). Un estudio hecho en modelo de ratón demostró que las biopsias core del cáncer de mama pueden incrementar las metástasis distantes (14). Años después, Sennerstam y colaboradores reportaron que en humanos, las biopsias core también están asociadas a tasas más altas de metástasis distante que las biopsias por FNA (15). Sin embargo, las biopsias core son las más utilizadas y las que dan información sobre los marcadores predictivos del tumor, a través de la inmunohistoquímica.

Son 3 los indicadores pronóstico que se buscan en toda prueba inmunohistoquímica (IHC) para cáncer de mama: los receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP) y el receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER-2) (16). Conocer el estado de estos 3 indicadores es esencial para la decisión de la terapia que seguirá el paciente. La mayoría de los cánceres son positivos para los receptores hormonales, en un 70% para el RE y hasta 65% para el RP (17). Las personas que presenten estos parámetros pueden ser beneficiadas de las terapias endocrinas. Por otro lado, el HER-2 es detectado en 15-20% de los cánceres de mama (18), dando opción a terapias blanco para esta proteína. Según los 3 factores ya mencionados y de acuerdo al nivel de la proteína Ki67, que determina la

rapidez con la que crecen las células cancerígenas, se puede dividir el cáncer de mama en 5 subtipos moleculares o intrínsecos (19). A continuación se muestra una tabla resumen que presenta los distintos estados de la prueba inmunohistoquímica y los subtipos de cáncer correspondientes.

Tabla 1. Subtipos intrínsecos o moleculares del cáncer de mama. Tabla extraída de “Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends” (20).

Subtipo intrínseco	Estado IHC	Grado	Pronóstico	Prevalencia
Luminal A	[RE+ RP+] HER2-KI67-	1 2	Bueno	23.7%
Luminal B	[RE+ RP+] HER2-KI67+ [RE+ RP+] HER2+KI67+	2 3	Intermedio Malo	38.8% 14%
HER-2 positivo	[RE-RP-] HER2+	2 3	Malo	11.2%
Basal o triple negativo	[RE-RP-] HER2-, marcador basal+	3	Malo	12.3%
Similar a la mama normal (normal-like)	[RE+ RP+] HER2-KI67-	1 2 3	Intermedio	7.8%

El grado de un tumor hace referencia a la similitud que tienen las células cancerígenas a las células normales; un grado más alto evidencia que las células del cáncer se alejan más en apariencia de las células normales (21). De este modo, un tumor de grado 1 está conformado por células bien diferenciadas, parecidas al tejido mamario normal. En el grado 2 hay células moderadamente diferenciadas y en el 3, las células están pobremente diferenciadas. El grado del tumor también indicará la velocidad con la que se puede expandir el cáncer y va en relación directa con el número, mientras mayor sea el grado mayor será la rapidez de expansión.

Como se vio anteriormente, el estado de los receptores en la prueba IHC es importante para definir el tratamiento. Los cánceres de subtipo luminal son los más frecuentes y suelen tener mejor pronóstico que los demás por contar con positividad para los receptores hormonales (20). El cáncer HER-2 positivo no tiene buen pronóstico, a pesar de los avances en medicamentos como el trastuzumab (22) (23); su mecanismo más complejo está asociado directamente con una mayor invasión o metástasis (24). El subtipo de cáncer

más peligroso es el triple negativo, llamado así por su falta de expresión de los 3 receptores principales, lo cual limita en gran medida las terapias a utilizar (25).

1.1. Células inmunológicas implicadas en el cáncer de mama

Además de las características ya mencionadas, y las características comunes en todo cáncer descritas por Hanahan y Weinberg (26), esta enfermedad también posee en muchos casos un patrón inflamatorio que facilita el progreso de las células cancerígenas (27). El microambiente tumoral juega un rol importante en el comportamiento y el desarrollo del cáncer; y dentro de este microambiente las células del linaje mielóide son una de las principales. Las células del sistema inmune que hayan generado una respuesta antitumoral tienen la habilidad de eliminar células tumorales, pero por otro lado también pueden reclutar células que favorezcan el desarrollo del tumor (28). Los macrófagos asociados a tumores (TAM) son aquellos componentes que, a través de la comunicación bidireccional con otras células inmunes por medio de citoquinas, logran mantener o activar respuestas en el ambiente tumoral. Este efecto es gobernado por el tumor, que lo utiliza como estrategia de evasión del sistema inmune.

Los macrófagos son células efectoras importantes que actúan contra patógenos y células tumorales. Clásicamente, se dividen en dos subpoblaciones definidas; y, dependiendo del tipo de activación se diferencian en inmunofenotipos en base a: la función, las citoquinas producidas, los marcadores celulares e incluso la morfología celular. Los macrófagos tipo M1 son los llamados “clásicos” o pro-inflamatorios. Por otro lado, los M2 son “alternativos” o antiinflamatorios (29). Esta respuesta opuesta de los macrófagos M1 y M2 se denomina polarización, y es un fenómeno asociado con inflamación, implicado en el cáncer. Los M1 son activados por las células Th1, NK y Th17, producen citoquinas pro-inflamatorias como IL-12 pero producen escasa IL-10 o TGF-beta (30); se caracterizan por tener la molécula de superficie CD68 y el receptor de quimioquinas CCR2 o CD192. Presentan una alta actividad de fagocitosis y de procesamiento de antígenos, además promueven la defensa con su actividad tumoricida (31). En contraste, los M2 producen citoquinas antiinflamatorias en alta proporción como IL-10 y por el contrario muy poca IL-12; tienen receptores tipo scavenger o CD163 y receptor de tipo manosa o CD206, inhiben la actividad antitumoral (32). Dadas estas características, es

fácil comprender por qué generalmente las células extraídas de un tumor presentan un fenotipo M2 (33). Pero, un ambiente tumoral no solo activa M2; según Sánchez-Reyes y colaboradores, las células tumorales pueden cambiar el fenotipo de M1 a M2 como es el caso en cáncer de cérvix (34). Un estudio en carcinoma oral de células escamosas encontró una diferencia en los niveles de M2 entre la muestra diagnóstica y la pieza tumoral; el daño causado por la biopsia estaría favoreciendo una polarización hacia M2 y con ello se acelera la progresión del tumor (35).

En el colon, que es uno de los órganos con mayor abundancia de macrófagos, la polarización M2, normalmente, es esencial para mantener la homeostasis. Sin embargo, en un ambiente tumoral los M2 promueven el crecimiento y la metástasis del tumor (36). La clave está en que la polarización se puede dar en condiciones fisiológicas normales, pero también patológicas (37) y las funciones desempeñadas en un estado u otro son contrarias. Muchos ensayos clínicos muestran una asociación entre una alta presencia de TAM y malos pronósticos en cáncer hepatocelular, cervical, de ovario y en cáncer de mama (38).

En el cáncer de mama, los macrófagos son uno de los componentes principales y pueden llegar a ocupar más del 50% de la masa tumoral. Se sabe que los M2 son más abundantes en el microambiente tumoral y promueven directamente el crecimiento del tumor debido a la secreción de mitógenos tumorales y factores angiogénicos (39). Es por esto que los macrófagos son considerados como buenos elementos para evaluar la evolución del cáncer, donde una mayor infiltración de macrófagos M2 en tumor está asociado con un pronóstico menos favorable. Además, los M2 están implicados en la metástasis (40) (41) y en el aumento de la resistencia a la quimioterapia (42) (43). En los últimos años se han convertido en blancos útiles para la creación de nuevas terapias oncológicas, incluyendo el cáncer de mama (44) (45).

En un modelo de ratón al que se le inyectó células tumorales intraductales, se demostró que en estadios tempranos de la enfermedad hay mayor cantidad de citoquinas asociadas a M1. Por otro lado, a medida que progresa el cáncer hay un incremento considerable de las citoquinas asociadas a M2 (46). Se encontró un resultado similar en un estudio hecho en sangre periférica de humanos; el porcentaje de M2 era significativamente más alto en

estadios más avanzados del cáncer de mama. Además, se menciona que hay una mayor cantidad de M2 en pacientes con cáncer de mama en comparación a pacientes sanas (47).

Otros de los componentes celulares que más participan en el cáncer de mama son las células Natural Killer (NK), los linfocitos T citotóxicos (CD8+) y los linfocitos T helper (CD4+). Las células NK son parte del sistema inmune innato, están en la primera línea de defensa del cuerpo y se encargan de la inmunovigilancia (48) (49). Tienen una actividad citotóxica que actúa contra células infectadas por virus o células cancerígenas (50), e incluso producen respuestas contra bacterias y hongos (51). Pueden ser identificadas en lesiones cancerosas tempranas, pero su función se ve afectada a medida que avanza la enfermedad (52). Es justamente esta pérdida de funcionalidad la que está asociada con un progreso del cáncer; en estadios más avanzados del cáncer de mama se muestra una actividad reducida de las NK (27). En experimentos con ratones, se ha demostrado que las células NK activadas e infiltradas pueden inducir la muerte de las células tumorales. En humanos, se encontró que la mayoría de tumores tienen un nivel bajo de infiltración de células NK y aquellos con mayor infiltración están asociados con mejores pronósticos y menor recurrencia del cáncer (53). Estas células también están siendo estudiadas para utilizarse como blancos para terapias, especialmente en leucemias ya que las NK son más abundantes en sangre (54).

Como parte de la inmunidad adaptativa, entran a escena los linfocitos T, tanto citotóxicos como helper. Ambos tienen un rol importante en el impedimento del desarrollo del cáncer; aunque sus funciones son complejas de dilucidar. En promedio, los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) están presentes en la masa tumoral mamaria en un 26%, pero pueden llegar hasta un 50% (55). Algunas pacientes con cáncer de mama muestran signos de inmunosupresión con niveles más bajos de linfocitos y células NK en sangre (56). Se ha demostrado que los niveles de expresión de los linfocitos CD4+, CD8+ y las células NK están relacionados con el pronóstico de pacientes con cáncer colorrectal (57). En cáncer de mama, se ha visto la importancia de las mismas células, con énfasis en las CD8+, en relación con la sobrevivencia de las pacientes. Pacientes que presentan niveles bajos de linfocitos CD8+ y CD4+ tienen pronóstico más desfavorable y están asociados incluso con la expansión de la enfermedad (58). Sin embargo, se ha visto que los linfocitos CD4+ promueven la metástasis del cáncer de mama hacia el pulmón, mientras que los

linfocitos CD8+ la limitan (59). Estos eventos, que pueden parecer contradictorios son explicados por los dos fenotipos distintos que tienen las células T helper (CD4+). Dentro de estas subpoblaciones se tienen a las células Th1 que cooperan con las CD8+ y tienen actividad tumoricida y las células Th2, que son la contraparte y por lo tanto tienen la función contraria (60). También existen las células Th17 que expresan IL-17 y aunque tienen un rol en la inflamación autoinmune también son importantes en la respuesta contra tumores. Se han descrito otras subpoblaciones de TIL como Th9, Th22 y Thf (foliculares) las cuales no parecen tener un rol importante en cáncer (61). Un estudio hecho por Mao y colaboradores, reporta que los TIL solo tienen valor pronóstico en ciertos subtipos de cáncer de mama (62) (63). Otros autores sugieren que sería interesante estudiar el cáncer de mama dividiéndolo en TIL+ y TIL- para observar las diferencias y posibles implicancias (64).

Otras células del sistema inmune que encontramos en menor medida son los linfocitos B y las células dendríticas (CD), que están interactuando con las demás células y también cumplen una función en el cáncer. Las células dendríticas son las presentadoras de antígenos por excelencia y son las principales reguladoras de la respuesta inmune adaptativa (65). Se encargan de endocitar las células neoplásicas y el debris celular para transportar los antígenos tumorales hacia las células T y activarlas (66). Existen distintos tipos de células dendríticas según su ubicación, pero las principales son las células dendríticas convencionales o mieloides (CDm) y las células dendríticas plasmacitoides (CDp) (67). Las CDp están predominantemente en sangre, pero su presencia en tumores está relacionada con pronósticos malos (68). Por otro lado, las CD están siendo usadas como blancos para terapias; las vacunas de CD tienen el potencial de inducir respuestas citotóxicas específicas antitumorales, con buenos resultados y no tan buenos resultados (69) (70). Se requiere más que la simple presentación de antígenos, es decir se requieren señales coestimuladoras y citoquinas capaces de activar a las poblaciones linfocitarias.

Los linfocitos B forman parte de la inmunidad humoral, secretan anticuerpos, pero también colaboran con la presentación de antígenos y dan señales coestimuladoras para las células T (71). No obstante, su rol en el microambiente tumoral es materia de controversia por los datos y/o reportes variables (72) (73). Por un lado, los linfocitos B son considerados como una población pro-tumoral, que activa células inflamatorias y

promueve la angiogénesis. Por el otro lado, se ha demostrado que estas células pueden ser inducidas o moduladas para generar respuestas anticancerígenas de las células T (74) (75). En un estudio hecho por Colluru y McNeel, en conjunto con vacunas de ADN, las células B probaron ser eficaces en promover las células CD8+ en un modelo *ex vivo* y además generaron una respuesta Th1 que tiene un efecto anti-tumoral (76). El estudio de Tsuda y colaboradores concluyó que, aunque altamente variable, las pacientes con cáncer de mama tienden a presentar una mayor cantidad de linfocitos B que los controles negativos (77).

De esta manera, las distintas células inmunocompetentes están interactuando a nivel sistémico y local generando las respuestas pro y anti tumorales. Los macrófagos son las células que más influencia tienen sobre las demás; los TAM M2 pueden bloquear la acción de las células CD4+ y CD8+, y suprimen la producción de IL-12 por las CD (78). En relación con las NK, los TAM M1 pueden colaborar para inducir una respuesta anticancerígena, mientras que los TAM M2 impiden la citotoxicidad de las NK. Las células B también están interactuando con las NK, ayudando en la actividad citotóxica (51). Pero, toda esta comunicación celular es posible gracias a las citoquinas, los factores clave para desencadenar muchas de las funciones. El IFN- γ , producido por las Th1 y las CD8+, es una de las citoquinas más importantes para prevenir y suprimir el cáncer. Otras de las citoquinas producidas por las Th1 son la IL-12, IL-2 y TNF- α . Las Th2, por su parte, producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (79). Por último, las Th17, que han probado tener un efecto antagonista a las Th1, producen IL-17 e IL-6 (80). Consecuentemente, se ha encontrado que la IL-6 contribuye a la progresión del cáncer, la IL-4 está asociada a mortalidad y la IL-10 e IL-17 están asociadas a un mal pronóstico de la enfermedad (81).

Cada una de las células del sistema inmune viene siendo estudiada para evaluar su potencial de convertirse en blanco de terapias novedosas contra el cáncer.

1.2. Inmunoterapia

Por mucho tiempo, los pilares para el tratamiento del cáncer eran: la radioterapia, la quimioterapia y la cirugía. El cáncer de mama no era una excepción, pero la generación de resistencia hacia las terapias hormonales llevó a los científicos a crear nuevos métodos

de tratamiento. La inmunoterapia se basa en la estimulación del propio sistema inmune para reforzar su acción (82). Hoy en día es un campo muy prometedor que ya ha dado frutos. El premio Nobel 2018 de fisiología y medicina fue otorgado a dos científicos por el descubrimiento de las moléculas activadoras e inhibidoras de los linfocitos T (checkpoints) que promovió el uso de anticuerpos monoclonales como inmunoterapia contra el cáncer (83).

Actualmente existen varios tipos de inmunoterapias como: la terapia celular adoptiva (ACT), los tratamientos con citoquinas y la inhibición de las llamadas moléculas checkpoint. Para este último tipo de inmunoterapia, que es uno de los tratamientos más utilizados, existen varias opciones; una de ellas es utilizar anticuerpos que se unen a PD1 (Programmed cell death-1), molécula que se encuentra en la superficie de las células citotóxicas (CD8+), para evitar que estas se desactiven (84) (85). El CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) también es un blanco estudiado que, al ser bloqueado, ayuda a las células T helper a reclutar a otras células antitumorales (86). El uso de las células CART (chimeric antigen receptor T cell), que permite la manipulación genética del receptor del linfocito T para dirigir respuestas antígeno específicas (87), es otra de las inmunoterapias que están surgiendo, aunque el acceso a la misma aún es costoso y demanda un tratamiento personalizado.

A pesar de los avances, la inmunoterapia tiene aún mucho por desarrollar y un mejor entendimiento de la inmunología del cáncer aportaría en la realización de este objetivo.

1.3. Estadios del cáncer de mama y la clasificación TNM (Tumor, Node, Metástasis)

Para determinar el estadio en el que se encuentra el cáncer de mama es necesario hacer un análisis de un conjunto de características. La clasificación TNM, que es la aceptada internacionalmente, se encarga de dar un valor a cada una de estas características con el fin de uniformizar los datos clínicos y acto seguido otorgarle un estadio al cáncer en cuestión. El sistema TNM está detallado en un manual realizado por la “American Joint

Committee on Cancer” (AJCC), el cual es actualizado cada cierto tiempo en nuevas ediciones (88) (89).

El sistema TNM, según sus siglas, se basa en el tamaño del tumor (T), en la cantidad de ganglios a los que se haya diseminado el cáncer (N que viene del inglés “node”) y la presencia o ausencia de metástasis (M).

A la letra T se le otorga un valor del 0 al 4, aunque existe la denominación Tis que quiere decir “in situ”; se usa cuando el cáncer no ha invadido el tejido circundante. Hay 3 tipos de cáncer de mama in situ: el carcinoma lobulillar in situ (LCIS, por sus siglas en inglés), el carcinoma ductal in situ (DCIS) y la enfermedad de Paget, que ataca las células cutáneas del pezón (90). La clasificación T0 significa que no hay rastros de tumor en la mama. El T1 es subdividido hasta en 3 grupos (T1a, T1b y T1c) según el tamaño del tumor, para mayor detalle; pero en términos generales, son aquellos tumores que miden menos de 20 mm o 2 cm en su dimensión más grande. Se clasifica como T2 aquellos tumores que miden entre 2-5 cm y T3 aquellos que miden más de 5 cm. Los T4, al igual que los T1, están subdivididos en 3 grupos pero en relación al área de su extensión. Un tumor T4 puede ser un tumor de cualquier tamaño, pero que tiene una extensión directa a la pared torácica (T4a), a la piel (T4b) o a ambas (T4c) (91).

En el caso de la N se hace referencia a los ganglios linfáticos regionales, ubicados en: la zona axilar, arriba y debajo de las clavículas y debajo del esternón. La N recibe un valor de 0 a 3 de acuerdo a la cantidad de ganglios que han sido alcanzados por las células cancerígenas. Cabe resaltar que las clasificaciones nodal clínica y patológica son distintas (91); la clasificación clínica se da en base a estudios de imágenes o una examinación clínica. Por otro lado, la clasificación patológica se determina con una confirmación histológica post-quirúrgica donde hay una escisión de ganglios o una biopsia del ganglio centinela (primer ganglio al que se disemina el cáncer) en conjunto con una clasificación patológica del tumor primario (variable T). Una clasificación patológica es más compleja y tiene una nomenclatura diferente, empezando porque lleva una “p” antes de la N (Ej.: pN2a). Sin embargo, para definir los grupos de estadios anatómicos se usa la nomenclatura convencional de 0 a 3.

N0 denota que no hay ganglios regionales comprometidos. N1 significa que hay de 1 a 3 ganglios a los que se ha diseminado el cáncer o según la posición hace referencia a una metástasis ipsilateral (del mismo lado del tumor) en los ganglios de la zona baja (nivel I) o media (nivel II) de la axila. La clasificación N2 se da cuando los ganglios alcanzados por el cáncer están en el rango de 4 a 9. Se subdivide en dos grupos: N2a cuando los ganglios linfáticos afectados se encuentran en la zona baja y media de axila, pero están fijados o en contacto unos con otros; N2b cuando la metástasis ocurre en los ganglios mamarios internos, pero no hay afección en la zona axilar. La denominación N3 corresponde a un compromiso de 10 o más ganglios, se divide en 3 grupos. N3a cuando hay una metástasis infraclavicular, considerada como zona axilar alta (nivel III), con o sin compromiso de ganglios afectados en las otras zonas axilares (niveles I y II). N3b se define como una metástasis en los ganglios mamarios internos y axilares. Por último, se considera N3c a una metástasis supraclavicular, con o sin compromiso de los ganglios mamarios internos o axilares.

La última sigla M refleja si hay una metástasis a distancia, en otro órgano. Solo se le otorga dos valores según la negatividad (M0) o positividad (M1) de esta variable.

A continuación se muestra una tabla predictiva de los estadios del cáncer de mama según el sistema ya mencionado.

Tabla 2. Grupos pronóstico/estadio anatómico del cáncer de mama. Tabla extraída de la 7ma edición de “Breast Cancer Staging”, AJCC (92). *Incluye T1mi (tumor ≤ 1 mm en su dimensión más grande). **No incluye N1mi (micrometástasis nodal).

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1*	N0	M0
Estadio IB	T0	N1mi	M0
	T1*	N1mi	M0
Estadio IIA	T0	N1**	M0
	T1*	N1**	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Estadio IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Estadio IIIC	T	N3	M0
Estadio IV	T	N	M1

Como se puede observar en la tabla, según la clasificación TNM se obtiene un estadio específico que va de 0 a IV. Cada estadio contará con las características dadas por cada uno de los factores tomados en cuenta.

Mientras mayor sea el estadio, mayor será el riesgo que representa para la salud de la paciente y para su recuperación.

De acuerdo a la Sociedad Americana de Cáncer hay varios factores para elegir el tratamiento de una paciente con cáncer de mama, siendo el más importante el estadio de éste. Otros factores incluyen la salud general, el tipo de cáncer y la edad del paciente (93). Tener un adecuado conocimiento de los parámetros inmunológicos de las pacientes al momento del diagnóstico daría un enfoque más profundo sobre su enfermedad y permitiría determinar si son candidatas a terapias más específicas como la inmunoterapia (94).

Bajo la premisa de que un estadio avanzado de cáncer es de mal pronóstico, surge la pregunta sobre una posible asociación con una polarización M2 y una respuesta de tipo Th2. En este estudio descriptivo se evaluó la polarización M1-M2 en muestras de tejido y sangre de pacientes peruanas con cáncer de mama en diferentes estadios. Además, se analizaron las citoquinas Th1/Th2/Th17 y la presencia de otras células inmunocompetentes que dan una idea sobre el tipo de respuesta inmune que se desencadena en cada estadio de cáncer analizado.

II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen cambios en la respuesta de macrófagos, linfocitos, células dendríticas y/o citoquinas Th1/Th2/Th17 en relación al estadio de cáncer de mama en muestras de tejido mamario y/o sangre periférica?

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar cambios en las poblaciones de macrófagos, linfocitos, células dendríticas y/o citoquinas Th1/Th2/Th17 en muestras de tejido mamario y sangre de pacientes peruanas con cáncer de mama en diferentes estadios.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar los porcentajes poblacionales de linfocitos T helper (CD4+) y citotóxicos (CD8+); linfocitos B (CD19+); linfocitos NK (CD56+/CD16+); macrófagos M1 (CD68+) y M2 (CD163+) y células dendríticas mieloides (CD11c+) y plasmacitoides (CD11c-) en muestras de tejido y sangre de pacientes con cáncer de mama de estadios II, III y IV.
- Determinar el perfil de citoquinas Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2), Th2 (IL-10, IL-6, IL-4) y Th17 (IL-17A) en sobrenadante de cultivo de las muestras de tejido y sangre de pacientes con cáncer de mama de estadios II, III y IV.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Criterios de inclusión y exclusión de donantes

En este estudio se incluyeron mujeres mayores de 18 años, 20 con carcinoma mamario sin terapia sistémica preoperatoria y 6 controles negativos para cáncer o cáncer negativo (CN), sin neoplasias malignas ni benignas (Anexo 1). Los criterios de exclusión para este estudio fueron: mujeres embarazadas o inmunocomprometidas (con enfermedades que alteran el sistema inmune).

4.2. Obtención de muestras

En el marco del Círculo para la Investigación de Agentes Infecciosos Endémicos Causantes de Cáncer en el Perú, del cual forma parte este proyecto de tesis, todas las muestras fueron proporcionadas por el Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN). No hubo una estimación de tamaño de muestra de acuerdo a un poder estadístico, la donación de las muestras estuvo sujeta a un convenio que dependía de la disponibilidad del área clínica. Por tanto, el número de muestras fue una limitación del estudio. Se realizó un muestreo por conveniencia obteniéndose 24 muestras de sangre (18 con carcinoma mamario y 06 sin cáncer) y 23 muestras de tejido (20 con carcinoma mamario y 03 sin cáncer) (Ver Tabla 4). A las pacientes captadas se les pidió que lean y firmen un consentimiento informado INEN 16-29, aprobado por el Comité Revisor de Protocolos del Departamento de Investigación del INEN (Anexo 2), y luego se procedió a la toma de muestras de sangre (en ayunas) en 2 tubos Vacutainer® de 7mL con anticoagulante (Fig. 2). Asimismo, se tomaron muestras de biopsias de tejido mamario, como parte del proceso diagnóstico (<1g), que fueron colocadas en recipientes conteniendo un medio de transporte RPMI-1640 completo (medio RPMI + 5% SBF + 1% P/S/A) (Fig. 3). En ambos casos las tomas de muestras estuvieron a cargo del personal técnico entrenado de INEN. Posteriormente ambos tipos de muestras fueron enviadas en un lapso no mayor a 4 horas al Laboratorio de Inmunología # 108, laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana

Cayetano Heredia, para lo cual se contó con un formato que permitía hacer un seguimiento del tiempo desde la toma de muestra hasta su recepción (Anexo 3). Las muestras de sangre se transportaron a temperatura ambiente, mientras que las biopsias se transportaron en recipientes con refrigerante. Este estudio fue hecho en ciego, los análisis inmunológicos se realizaron en paralelo con el diagnóstico que se conoció al finalizar los ensayos. Cada muestra tenía un código de reconocimiento con el cual se hizo el seguimiento clínico de la paciente para conocer su estadio. Se tuvo acceso a todo el historial clínico de las pacientes según base de datos proporcionada por el Departamento de Investigación de INEN, software SISINEN.



Figura 2. Tubo Vacutainer® con muestra de sangre. Se usó 2 tubos Vacutainer® de 7cc con EDTA por donante.

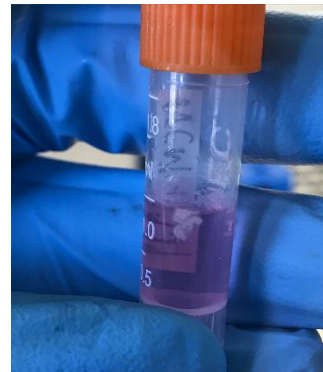


Figura 3. Microtubo con muestra de biopsia en medio de transporte. Se usó <1g de tejido transportado en medio RPMI-1640 completo.

4.3. Procesamiento de muestras

Todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones estériles, en una cabina de flujo laminar clase IIA en el Laboratorio de Inmunología, LID, UPCH (95). Para todos los ensayos se realizaron mediciones únicas.

4.3.1. Procesamiento de Muestras de Sangre

Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC):

La muestra de sangre de la paciente fue transferida desde los tubos de toma de muestra hacia un tubo Falcon de 50 mL. Se mezcló la sangre obtenida (14mL) con PBS en partes iguales y se procedió a agregar esta mezcla lentamente en otro tubo Falcon que contenía Histopaque®, manteniendo la proporción sangre:Histopaque® de 2:1. Después de centrifugar la muestra a 1800 rpm por 30 minutos (sin freno) se separó el anillo de células mononucleares (PBMC) o “buffy coat” colocándolas en otro tubo vacío. Se completó el volumen del tubo con PBS (aprox. 40mL) para realizar dos lavados por centrifugación a 2500 rpm por 10 minutos. Luego, se retiró el PBS del último lavado y el precipitado de células se resuspendió en 1 mL de RPMI completo. Luego se procedió al conteo celular y determinación de la viabilidad celular con el colorante Trypan Blue usando una cámara de Neubauer. Se consideró que la viabilidad fuese mayor a 90% para utilizar las células.

4.3.2. Procesamiento de biopsias de tejido

Obtención de la muestra de tejido (biopsia):

Todas las muestras de tejido para este estudio provinieron de un proceso diagnóstico por biopsia core, la cual permite obtener muestras del centro de la lesión sospechosa. Una vez localizada la zona de la lesión, mediante un equipo de ultrasonido o un ecógrafo, se anestesia localmente con una aguja fina (96). Luego, se hace una pequeña incisión (5 mm aprox.) por donde se coloca el agua gruesa para tomar la muestra. Una vez extraído el tejido se cubre el área con un vendaje estéril. Para determinar el peso de la biopsia, se colocó el tejido en un tubo con medio de cultivo previamente pesado y tarado en una balanza analítica.

Obtención de una suspensión celular de muestra de tejido mamario (SCMT):

Las SCMT fueron obtenidas siguiendo los protocolos de Lozada-Requena et al (97) y Kahn (98) con algunas modificaciones. Brevemente, se descartó el medio de cultivo de las biopsias a través de un lavado por filtración (70 μ m). El tejido fue transferido a un tubo Falcon de 50 ml que contenía 10 ml de HBSS sin CaCl_2 , MgCl_2 , pero con antibiótico y EDTA (HBSS-1) (99). Se dejó incubando a 37°C por 30 minutos, agitando constantemente. Posteriormente, el contenido del tubo fue lavado por filtración (70 μ m) para separar el tejido y colocarlo en HBSS con CaCl_2 y MgCl_2 (sin EDTA) (HBSS-2), por 10 minutos a temperatura ambiente en agitación. Nuevamente, se separó el tejido y se colocó en un tubo de 1.5 ml con una solución de digestión a base de medio RPMI-1640 (1mL), antibiótico (PSA, 10uL), SBF (10uL), colagenasa tipo I (10uL) y cloruro de calcio (10uL) (100).

Este primer paso de digestión se realizó por 45 minutos con pipeteo o agitación intermitente. Luego, el tejido pasó por una disgregación mecánica usando láminas de borde rugoso. Tras la disgregación, el tejido fue incubado a 37°C por 15 minutos. El contenido del tubo fue filtrado y centrifugado a 1400 rpm para la obtención del pellet celular. El pellet se resuspendió en RPMI completo para su posterior conteo y uso en los ensayos de marcaje celular y medición de citoquinas según se especifica en el punto 4.4 y 4.5 (Fig. 4).

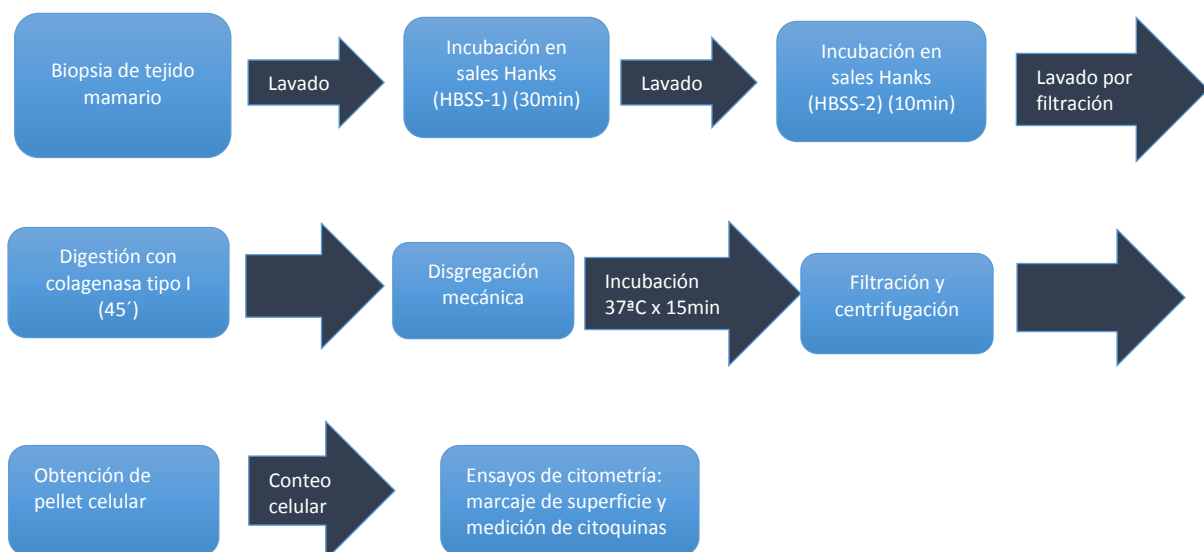


Figura 4. Esquema para el procesamiento de la muestra de tejido (biopsia)

4.4. Citometría de Flujo para poblaciones celulares de PBMC y SCMT

Se realizó el marcaje celular de superficie utilizando paneles de anticuerpos (101) que permiten identificar las poblaciones de interés, según la siguiente tabla:

Tabla 3. Panel de anticuerpos monoclonales usados para el marcaje de células inmunocompetentes en muestras de sangre y tejido.

Población celular	Siglas	Panel de Anticuerpos*
Linfocitos T**, B y NK	TBNK	Cóctel TBNK CD45-PerCP; CD3-FITC; CD19-APC; CD16-CD56-PE
LT CD4 y CD8	CD4/CD8	Cóctel CD4/CD8 CD45-PerCP; CD3-FITC; CD4-APC; CD8-PE
Macrófagos	M1	CD14-PE; CD68-FITC; CD192-Alexa Fluor 647
	M2	CD14-PE; CD163-PerCP Cy5.5; CD206-FITC
Células dendríticas***	CD	CD11c-APC; HLA-DR-PerCP; Lin-1-FITC Cóctel Lin-1 = CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56

*Todos los anticuerpos usados son de la marca Becton Dickinson. **Para el análisis de las subpoblaciones de linfocitos T solo se consideró el cóctel CD4/CD8. *** La población de CDp se definió como CD11c-(102).

Nota: El número de eventos adquiridos para el análisis celular cambia en función del tipo de célula y según el tipo de muestra (sangre o tejido). Por ejemplo, en sangre, ciertas células como los linfocitos se encuentran en mayor proporción que los macrófagos. Para cada caso se indica el número de eventos obtenidos.

4.4.1. Determinación de linfocitos T, B y NK totales y LT CD4 y CD8 en sangre y tejido.

Para la determinación de linfocitos se utilizaron 1×10^6 PBMC o 0.2×10^6 SCMT, los cuales fueron agregados en tubos para citometría, uno para TBNK y otro para CD4/CD8. Los anticuerpos para determinar TBNK y CD4/CD8 son reactivos conformados por cócteles de anticuerpos (Tabla 3). Se agregó a cada tubo 10 μ L del respectivo panel, TBNK o CD4/CD8, y se incubaron los tubos por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron los tubos con 'stain' buffer (PBS 1% SBF) por centrifugación a 1500 rpm por

5min. Las células se resuspendieron en buffer 'cell fix' (PBS 1% Paraformaldheido) y luego de hacer la adquisición en el citómetro de flujo se obtuvieron los archivos FSC para realizar el análisis en el software FlowJo según las estrategias de determinación de las poblaciones en estudio que se mencionan a continuación.

Estrategia para la determinación de linfocitos TBNK y linfocitos CD4 y CD8.

Mediante el análisis con el software FlowJo versión X.07 se realizó la siguiente estrategia, aplicada para ambos tipos de muestras (sangre y tejido). Mediante la gráfica de density plot de SSC vs. CD45 se seleccionó la población de linfocitos con escasa granularidad y positivos para el marcador CD45 para leucocitos. A partir de esta selección se realizó otra gráfica representando a SSC vs. CD3, donde se seleccionaron las células CD3+, correspondientes a los linfocitos T totales, y las células CD3-. A partir de las CD3- se representó una nueva gráfica de CD16-56 vs. CD19 que representan a los linfocitos NK y B totales, respectivamente (Fig. 5 y 6).

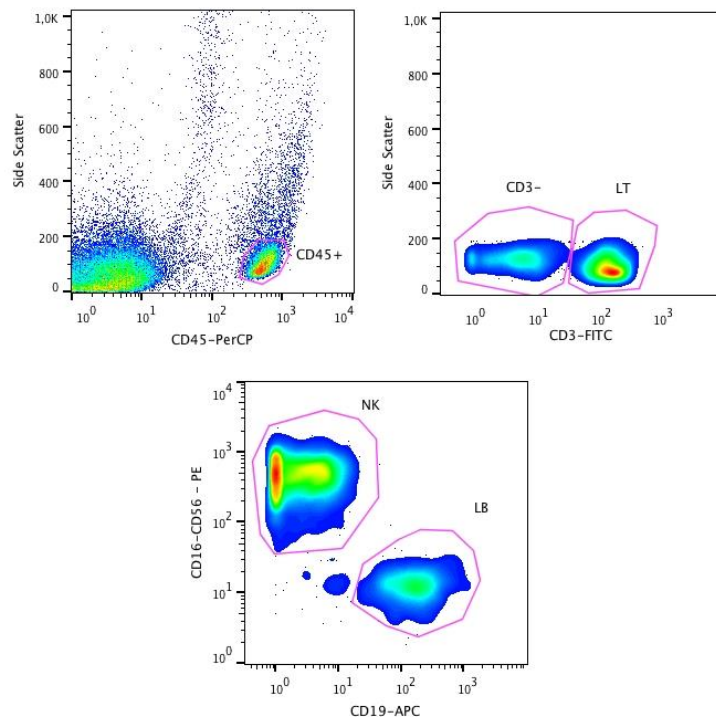


Figura 5. Determinación de linfocitos T, B y NK en sangre. Se marcaron 1×10^6 PBMC con el cóctel TBNK, se adquirieron 15000 eventos en un citómetro FACSCalibur BD Biosciences y el análisis fue realizado en el software FlowJo vX.07. La gráfica es una muestra representativa de una donante y se muestran los porcentajes poblacionales de linfocitos T, B y NK.

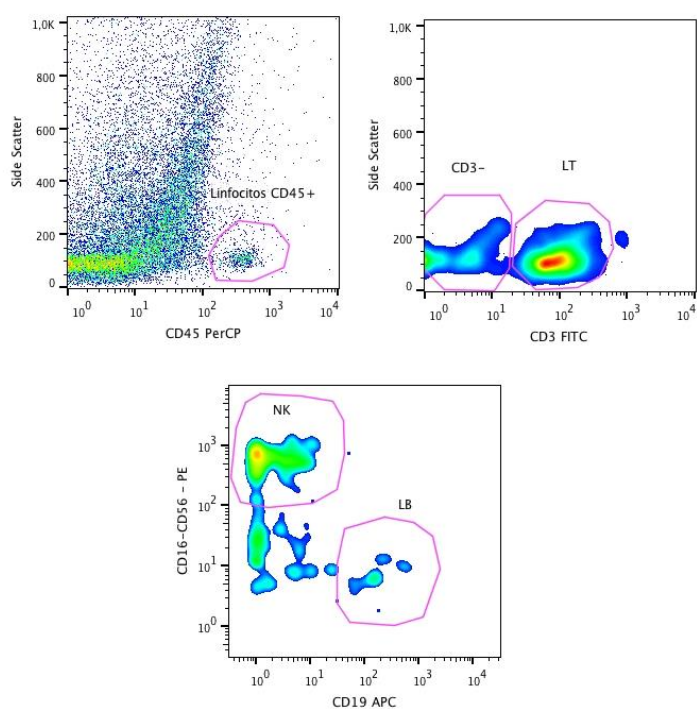


Figura 6. Determinación de linfocitos T, B y NK en tejido canceroso. Se marcaron 0.2×10^6 SCMT con el cóctel TBNK, se adquirieron 15000 eventos en un citómetro FACSCalibur BD Biosciences y el análisis fue realizado en el software FlowJo vX.07. La gráfica es una muestra representativa de una donante y se muestran los porcentajes poblacionales de linfocitos T, B y NK.

En el caso del análisis de linfocitos T CD4 y CD8 se realizó la siguiente estrategia para ambos tipos de muestras (sangre y tejido). Mediante la gráfica de SSC vs. CD45 se seleccionó la población de linfocitos con escasa granularidad y positivos para el marcador CD45 para leucocitos. A partir de esta selección se realizó otra gráfica representando a SSC vs. CD3, en la que se seleccionaron las células CD3+ correspondientes a los linfocitos T totales. A partir de la población CD3+ se representó una nueva gráfica de CD8 vs. CD4 donde los LT citotóxicos ubicados en el cuadrante superior izquierdo corresponden a la población CD4-CD8+ y los LT helper ubicados en el cuadrante inferior derecho corresponden a la población CD4+CD8-, respectivamente (Fig. 7 y 8).

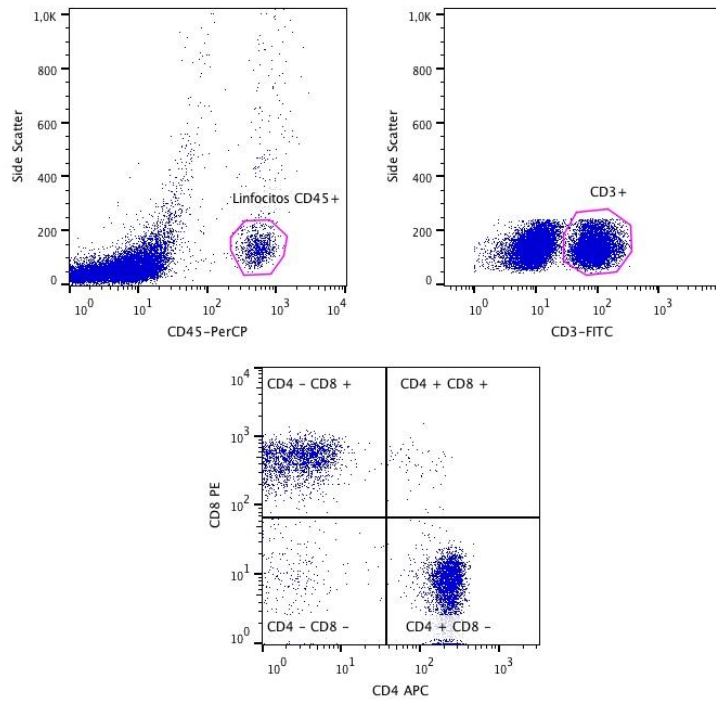


Figura 7. Determinación de subpoblaciones de LT en sangre. Se marcaron 1×10^6 PBMC con el cóctel CD4/CD8, se adquirieron 15000 eventos en un citómetro FACSCalibur BD Biosciences y el análisis fue realizado en el software FlowJo vX.07. La gráfica es una muestra representativa de una donante y se muestran las poblaciones de LT: Helper (CD4+CD8-) y Citotóxicos (CD4-CD8+).

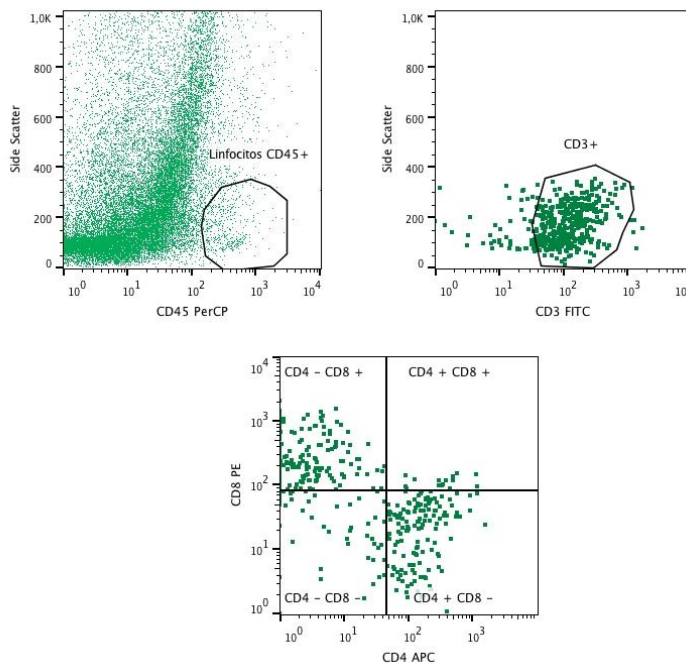


Figura 8. Determinación de subpoblaciones de LT en tejido canceroso. Se marcaron $0,2 \times 10^6$ SCMT con el cóctel CD4/CD8, se adquirieron 15000 eventos en un citómetro FACSCalibur BD Biosciences y el análisis fue realizado en el software FlowJo vX.07. La gráfica es una muestra representativa de una donante y se muestran las poblaciones de LT: Helper (CD4+CD8-) y Citotóxicos (CD4-CD8+).

4.4.2. Determinación de macrófagos (M1/M2) en sangre y tejido.

Tanto para las muestras de PBMC como para las muestras de SCMT se siguió el mismo procedimiento que en 4.4.1, con la diferencia que se utilizó el panel de anticuerpos correspondiente a macrófagos M1 y M2 (Tabla 3), y con la salvedad de que se usaron dos tubos de citometría, uno para los macrófagos M1 y otro tubo para los macrófagos M2.

Estrategia para la determinación macrófagos M1 y M2.

Para determinar las poblaciones de macrófagos M1/M2, mediante el análisis con el software FlowJo versión X.07, se realizó la siguiente estrategia para ambos tipos de muestras (sangre y tejido). Mediante la gráfica de FSC vs. SSC se seleccionó la población de monocitos-macrófagos con tamaño y granularidad intermedia. A partir de esta selección se realizó otra gráfica representando a SSC vs. CD14, en la que se seleccionaron las células CD14+ correspondientes a los macrófagos totales. A partir de la población CD14+ se representó una nueva gráfica de CCR2 vs. CD68 que representa a los macrófagos M1 como CD68+CCR2+ (Fig. 9 y 11). En el caso de los macrófagos M2, a partir de la población CD14+ se representó una nueva gráfica de CD206 vs CD163 que muestra a los macrófagos M2 como CD163+CD206+ (Fig. 10 y 12).

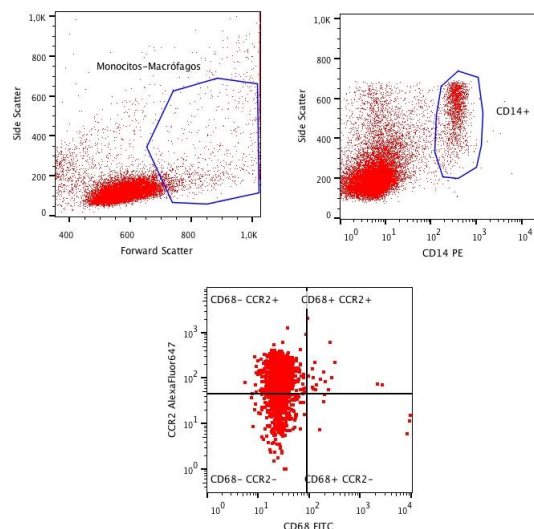


Figura 9. Determinación de la población de macrófagos M1 en sangre. Se marcaron 1×10^6 PBMC con anticuerpos específicos según panel M1 (Tabla 3), se adquirieron 10000 eventos en un citómetro FACSCalibur BD Biosciences y el análisis fue realizado en el software FlowJo vX.07. La gráfica es una muestra representativa de una donante y se muestran las poblaciones de macrófagos M1: CD68+CCR2+.

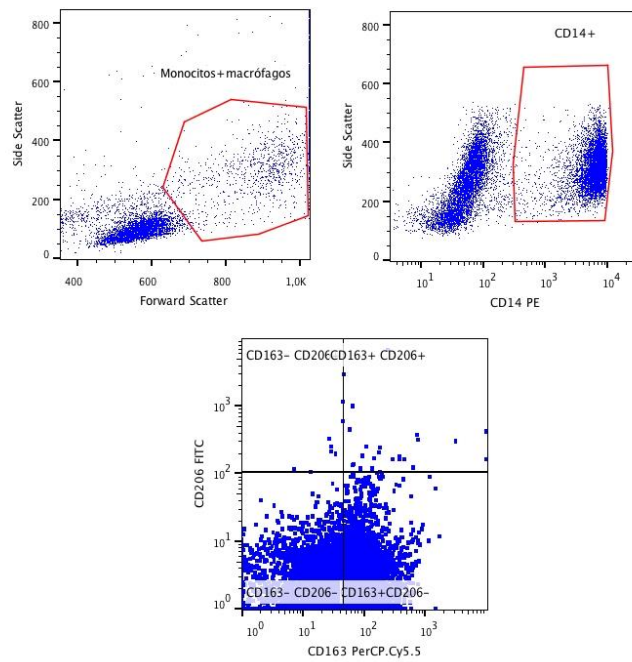


Figura 10. Determinación de la población de macrófagos M2 en sangre. Se marcaron 1×10^6 PBMC con anticuerpos específicos según panel M2 (Tabla 3), se adquirieron 10000 eventos en un citómetro FACSCalibur BD Biosciences y el análisis fue realizado en el software FlowJo vX.07. La gráfica es una muestra representativa de una donante y se muestran las poblaciones de macrófagos M2: CD163+CD206+.

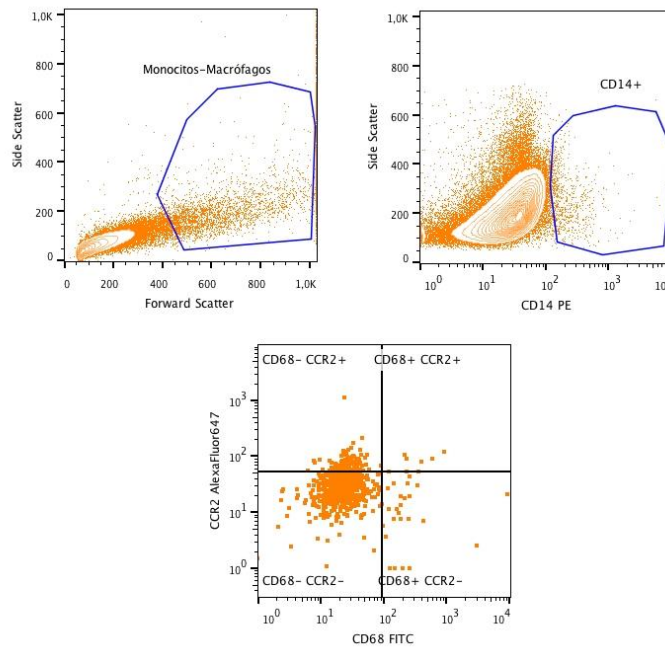


Figura 11. Determinación de la población de macrófagos M1 en tejido canceroso. Se marcaron $0,2 \times 10^6$ SCMT con anticuerpos específicos según panel M1 (Tabla 3), se adquirieron 10000 eventos en un citómetro FACSCalibur BD Biosciences y el análisis fue realizado en el software FlowJo vX.07. La gráfica es una muestra representativa de una donante y se muestran las poblaciones de macrófagos M1: CD68+CCR2+.

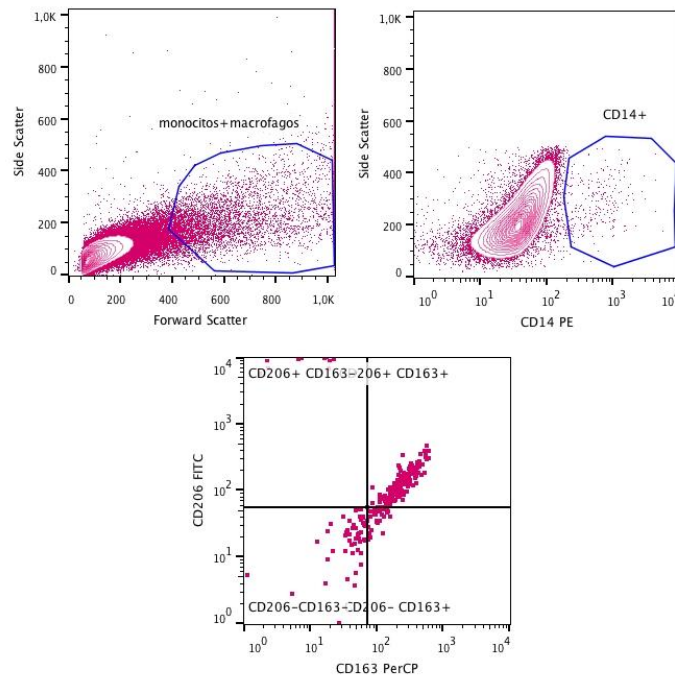


Figura 12. Determinación de la población de macrófagos M2 en tejido canceroso. Se marcaron $0,2 \times 10^6$ SCMT con anticuerpos específicos según panel M2 (Tabla 3), se adquirieron 10000 eventos en un citómetro FACSCalibur BD Biosciences y el análisis fue realizado en el software FlowJo vX.07. La gráfica es una muestra representativa de una donante y se muestran las poblaciones de macrófagos M2: CD163+CD206+.

4.4.3. Determinación de células dendríticas (CD) en sangre y tejido.

Tanto para las muestras de PBMC como para las muestras de SCMT se siguió el mismo procedimiento que en 4.4.1 con la diferencia que se utilizó el panel de anticuerpos correspondiente a células dendríticas (Tabla 3). A un tubo de citometría conteniendo la muestra se agregaron 5uL de anticuerpos anti-CD11c y anti-HLA-DR y 7uL del cóctel de anticuerpos Lin-1. Las subpoblaciones de CD se diferenciaron en base a la presencia o ausencia del marcador CD11c; positivo para CD mieloides y negativo para las CD plasmacitoides (102).

Estrategia para la determinación de células dendríticas

Para determinar las poblaciones de células dendríticas mieloides (CDm) y plasmacitoides (CDp), mediante el análisis con el software FlowJo versión X.07, se realizó la siguiente estrategia para ambos tipos de muestras (sangre y tejido): mediante la gráfica de FSC vs.

SSC se seleccionó la población de Linfocitos-Monocitos con tamaño y granularidad baja e intermedia, respectivamente. A partir de esta selección se realizó otra gráfica representando a HLA-DR vs. Lin1, en esta gráfica se seleccionaron las células HLA-DR+Lin1-. En este caso el cóctel de anticuerpos Lin1 permite la detección y discriminación de un grupo de poblaciones celulares entre las que se encuentran linfocitos T (CD3+), macrófagos (CD14+), linfocitos NK (CD16/CD56+) y linfocitos B (CD19/CD20). Con ello se genera un área de interés que es la población de células HLA-DR+Lin1-, las que corresponden a células que expresan el antígeno HLA-DR o MHC-II y además no son LT, macrófagos, NK ni LB. A partir de esta población se representó una nueva gráfica de CD11c vs. HLA-DR que muestra a las células dendríticas mieloides como CD11c+HLA-DR+. Además, se aprovechó el análisis para identificar a la otra subpoblación de CD, es decir las plasmacitoides, las cuales se presentan como CD11c-HLA-DR+ (Fig. 13 y 14) (102).

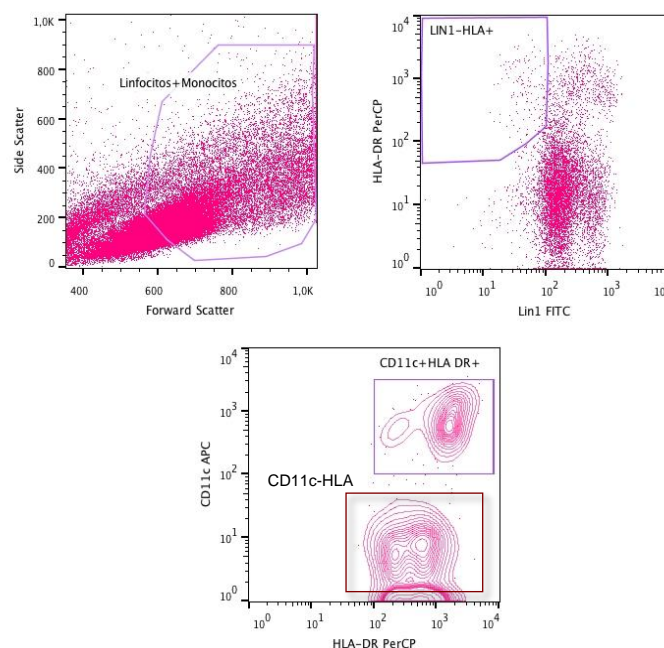


Figura 13. Determinación de la población de CD en sangre. Se marcaron 1×10^6 PBMC con anticuerpos específicos según panel CD (Tabla 3), se adquirieron 100000 eventos en un citómetro FACSCalibur BD Biosciences y el análisis fue realizado en el software FlowJo vX.07. La gráfica es una muestra representativa de una donante y se muestran las poblaciones de células dendríticas mieloides (CDm): CD11c+HLA-DR+ y plasmacitoides (CDp): CD11c-HLA-DR+.

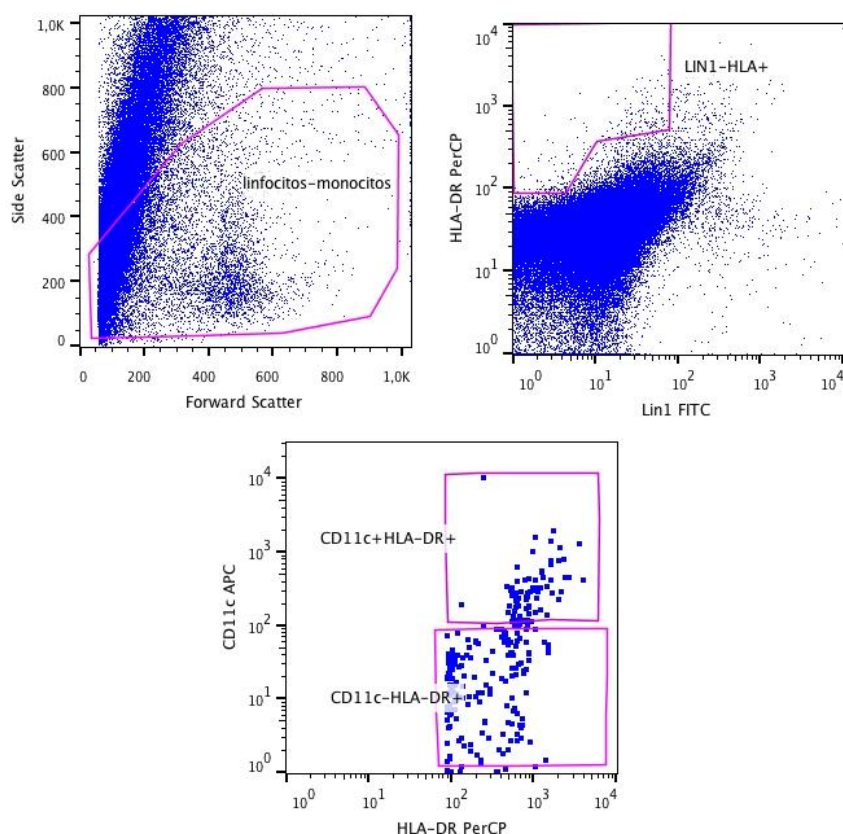


Figura 14. Determinación de la población de CD en tejido canceroso. Se marcaron $0,2 \times 10^6$ SCMT con anticuerpos específicos según panel CD (Tabla 3), se adquirieron 100000 eventos en un citómetro FACSCalibur BD Biosciences y el análisis fue realizado en el software FlowJo vX.07. La gráfica es una muestra representativa de una donante y se muestran las poblaciones de células dendríticas mieloides (CDm): CD11c+HLA-DR+ y plasmacitoides (CDp): CD11c-HLA-DR+.

4.5. Medición de citoquinas Th1/Th2/Th17

En tubos de citometría estériles se dejaron incubando 1×10^6 PBMC o $0,2 \times 10^6$ SCMT por 24 horas sin ningún tipo de estímulo. Al término de este periodo se centrifugaron los tubos y se recogieron los sobrenadantes de cultivo, los cuales fueron almacenados a -70°C hasta el momento de la medición.

Se utilizó la técnica de CBA (cytometric Bead array) y todos los procedimientos se realizaron de acuerdo al manual de instrucciones del fabricante (BD: Becton Dickinson). Brevemente, la técnica consiste en medir moléculas solubles (citoquinas) por medio de citometría de flujo, usando beads o partículas fluorescentes (aloficocianina, APC) como soportes para la captura de las citoquinas a través de anticuerpos de captura adheridos a estos beads. Al agregar las muestras conteniendo las citoquinas se genera una reacción

antígeno-anticuerpo que posteriormente es evidenciada por otro anticuerpo específico contra la misma citoquina pero unido a un fluorocromo (ficoeritrina, PE). Toda esta reacción es leída en un citómetro de flujo a través de señales de fluorescencia que luego serán transformadas a unidades de concentraciones de citoquinas (pg/mL) mediante extrapolación de la intensidad de fluorescencia media en curvas estándar y utilizando el software FCAP Array v3 (Becton Dickinson). Para el ensayo se preparó el mix de los beads de captura usando 10 µl de cada uno (un bead por citoquina). Se preparó los estándares de las citoquinas haciendo diluciones seriadas usando una concentración alta en diluyente de ensayo para obtener curvas estándar por cada citoquina (Anexo 5). Luego, se agregó 50 µL de los beads de captura por tubo; 50 µL de las diluciones del estándar o 50 µL de las muestras (sobrenadante de cultivo) a los tubos correspondientes y además 50 µL del reactivo de detección (Anticuerpo unido a PE) a todos los tubos. Todos los tubos se incubaron por 3 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Luego se agregó 1 ml de buffer de lavado y se centrifugaron a 1400 rpm por 5 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y los beads se resuspendieron en 300 µl de buffer de lavado para dar comienzo a las lecturas con el citómetro. Antes de iniciar la adquisición en el citómetro este fue configurado con la ayuda de una plantilla proporcionada por el fabricante que permite establecer la ubicación de los beads y verificar la compensación de los fluorocromos utilizados. El kit permite medir las citoquinas: IL-17A, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2.

Estrategia para la determinación de citoquinas Th1/Th2/Th17.

Se utilizó una plantilla de adquisición apropiada para un equipo con dos láseres (dual-laser instrument). Se configuró el número de eventos a ser leídos durante la adquisición a 2100 en el gate o selección de los beads. Esto asegura que el archivo de cada muestra tenga aproximadamente 300 eventos por bead de captura. La lectura empieza con el control negativo (0pg/mL), usando la gráfica de FSC vs SSC se ubican los beads en su respectiva región (Fig. 15A) y se inicia la adquisición en modo High (velocidad alta). Inmediatamente después, se corren los tubos con los estándares y luego los que contienen las muestras. Gráficamente los estándares y muestras se pueden representar de dos formas: en un caso se muestra la gráfica de dot-plot de FL4-APC vs FL2-PE que muestra la intensidad de fluorescencia de los beads en el canal APC, la cual se representa mediante

un degrade de fluorescencias para el fluorocromo APC o alofocianina, donde cada grupo de dots o puntos corresponden a los beads de captura de cada citoquina; mientras que en el canal FL2-PE se representa la intensidad de fluorescencia media de cada una de las citoquinas capturadas, la cual será convertida luego a unidades de concentración (Fig. 15B). En el otro caso se muestra una gráfica de histogramas en la cual se representa la intensidad de fluorescencia media en el canal FL4-APC que muestra la intensidad de fluorescencia media de los beads para cada una de las citoquinas (Fig.15C).

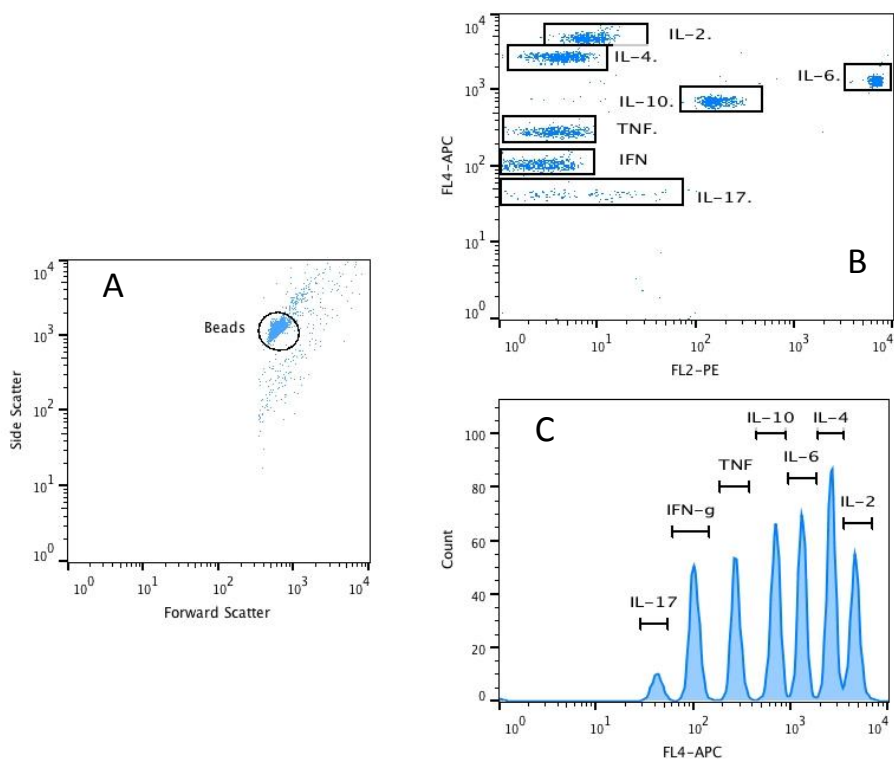


Figura 15. Determinación de citoquinas Th1/Th2/Th17. Se obtuvieron sobrenadantes de cultivo de PBMC o SCMT, se adquirieron 2100 eventos en un citómetro FACSCalibur BD Biosciences y el análisis fue realizado en el software FCAP Array v3. La gráfica es una muestra representativa de una donante y se muestran las poblaciones de beads (A); las citoquinas en una gráfica de FL2-PE vs FL4-APC (B) y una gráfica de histograma para FL4-APC (C).

4.6. Análisis de resultados

En este estudio se hizo un muestreo por conveniencia. Las gráficas representan la media porcentual \pm el error estándar de la media (SEM). La expresión de los marcadores celulares y la expresión de citoquinas fueron analizadas utilizando el software FlowJo.

Previo al análisis estadístico de los parámetros inmunológicos se realizó el test de Regresión Robusta y Remoción de Valores Atípicos (outliers). Se utilizó la estrategia más estricta ($Q=0.1\%$) de modo que se eliminan solo los valores atípicos definitivos (se tiene menos poder para detectar valores atípicos reales, pero también menor posibilidad de definir falsamente un punto como valor atípico) (103).

Las comparaciones entre pacientes de distintos estadios de cáncer se analizaron con las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para múltiples grupos y el test de Mann-Whitney en caso de comparar entre dos grupos en específico. Además, se hizo una comparación de los ratios tejido/sangre de cada población celular entre los distintos estadios.

El paquete estadístico utilizado fue Prism V 6, GraphPad (San Diego, CA, USA). Las probabilidades de $p<0.05$ fueron consideradas como estadísticamente significativas.

4.7. Aspectos éticos

La toma de muestra se llevó a cabo siguiendo los principios éticos para la investigación médica que involucra a sujetos humanos, estipulados en la Declaración de Helsinki 2014. Esta tesis fue aprobada por el Comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, bajo el nombre: “Evaluación de células inmunocompetentes y perfil de citoquinas Th1/Th2/Th17 en sangre periférica y biopsias de pacientes con cáncer de mama”, con código SIDISI 102764, mientras que el consentimiento informado utilizado para la toma de muestras forma parte del proyecto: “Círculo para la investigación de agentes infecciosos endémicos causantes de cáncer en Perú”, el cual fue aprobado por el Comité Revisor de Protocolos del Departamento de Investigación del INEN (INEN 16-29) (Anexo 2).

V. RESULTADOS

5.1. Recopilación de los datos clínicos

En total se obtuvieron 23 muestras de biopsias y 24 de sangre periférica distribuidas según lo indicado en la Tabla 4. En el caso de las muestras de pacientes con carcinoma mamario, estas se clasificaron según el estadio de la enfermedad basado en el diagnóstico histopatológico del tejido canceroso (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de muestras incluidas en el estudio.

Estado	Tejido	Sangre
Carcinoma mamario	N = 20	N = 18
	II = 6; III = 10; IV = 4 *	II = 6; III = 8; IV = 4 *
Sin cáncer	N = 03	N = 06

N = número total de muestras. * Distribución de muestras por estadio.

Todas las muestras siguieron un sistema de codificación creado por INEN. Como se mencionó en 4.2, la información clínica fue extraída de la base de datos SISINEN (Tabla 5). A continuación se muestra una tabla resumen sobre los datos clínicos obtenidos de las pacientes con carcinoma mamario (N=20). En algunos ítems los pacientes no llegan a 20 debido a campos en blanco encontrados en la base de datos original.

Tabla 5. Resumen de la data clínica de las pacientes provenientes del INEN.

Características		
Edad (rango)***		52.5 (32-88)
Estado RE *	Positivo	9 (60%)
	Negativo	6 (40%)
Estado RP **	Positivo	9 (56.3%)
	Negativo	7 (43.7%)
Estado HER-2 **	Positivo	3 (18.7%)
	Negativo	13 (81.3%)
Grado del tumor *	Grado 1	1 (6.7%)
	Grado 2	3 (20%)
	Grado 3	11 (73.3%)
Tamaño del tumor ***	<2 cm	0 (0%)
	2-5 cm	9 (45%)
	≥ 5 cm	11 (55%)
Grado de extensión a ganglios linfáticos #	0	3 (25%)
	1	5 (41.7%)
	2	1(8.3%)
	3	3 (25%)
Metástasis ***	Positivo	4 (20%)
	Negativo	16 (80%)
Antecedentes de cáncer ##	Positivo	9 (52.9%)
	Negativo	8 (47.1%)
Estadio ***	II	6 (30%)
	III	10 (50%)
	IV	4 (20%)

Nota: En algunos casos no se pudo contar con la información completa de la donante debido a que no se habían completado sus datos durante el ingreso al software SISINEN. * n=15 donantes; ** n=16 donantes; *** n= 20 donantes; # n=12 donantes; ## n= 17 donantes.

5.2. Determinación de poblaciones linfocitarias

Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre las poblaciones linfocitarias (LB y NK) de los distintos estadios del carcinoma mamario y el grupo CN

(Fig. 16). Cuando se evaluó los grupos por estadio se encontró que los porcentajes de LB en el tejido eran significativamente menores que en sangre en los estadios II, III y IV; y también el porcentaje de NK en el tejido de los estadios II y IV (Fig. 16A y B). Sin embargo, la comparación de los ratios tejido/sangre entre los estadios no mostró diferencias significativas para ninguna de las poblaciones linfocitarias analizadas.

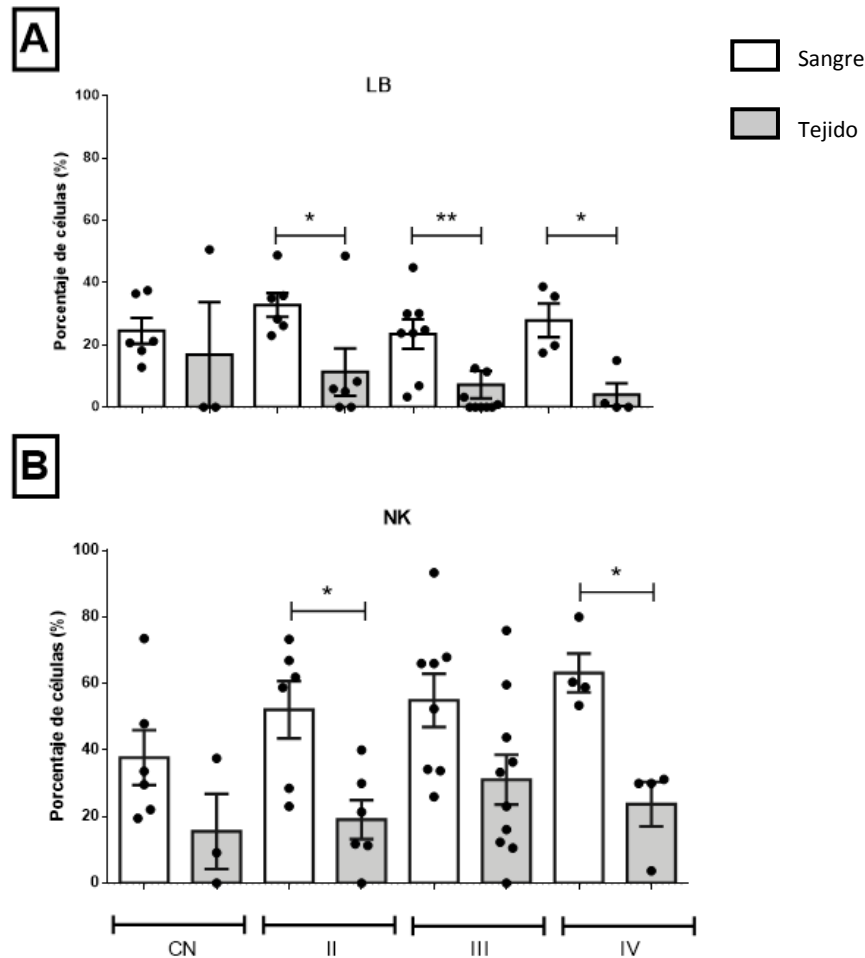


Figura 16. Porcentajes poblacionales de LB y NK entre pacientes sin cáncer y los distintos estadios de pacientes con carcinoma mamario, en muestras de sangre y/o tejido. Se obtuvieron 1×10^6 PBMC y $0,2 \times 10^6$ SCMT y luego se marcaron con 10uL de un cóctel de anticuerpos específicos para linfocitos TBNK para después ser adquiridas en un citómetro de flujo (FACSCalibur BD Biosciences). **A:** LB= Linfocitos B; **B:** NK= Linfocitos Natural Killer. Test de Mann Whitney * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

En las subpoblaciones de LT CD4 y CD8, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los distintos estadios de carcinoma mamario y los controles sin cáncer; sin embargo, en el grupo estadio III se encontró un menor valor estadísticamente significativo del porcentaje de LT CD4 de sangre con respecto al tejido (Fig. 17A).

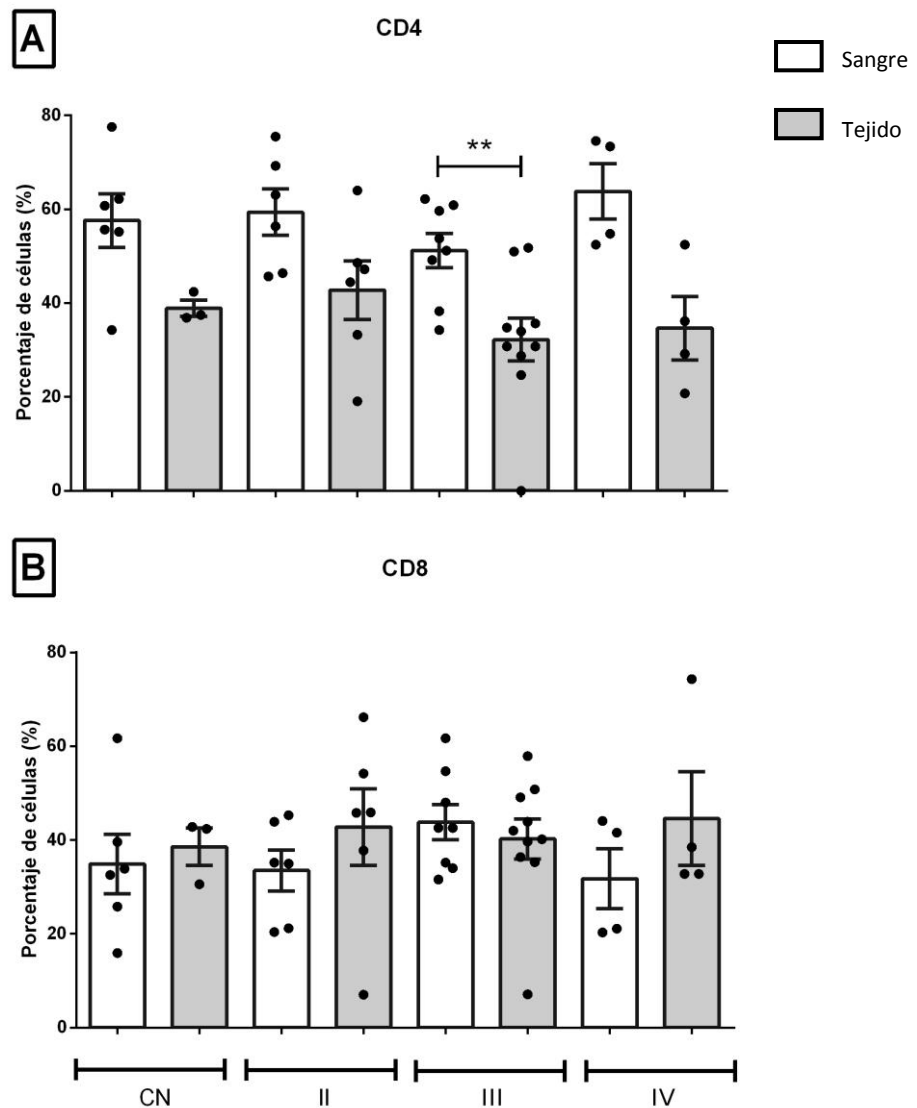


Figura 17. Porcentajes poblacionales de LT CD4 y CD8 entre pacientes sin cáncer y los distintos estadios de pacientes con carcinoma mamario, en muestras de sangre y/o tejido. Se obtuvieron 1×10^6 PBMC y $0,2 \times 10^6$ SCMT y luego se marcaron con 10uL de un cóctel de anticuerpos específicos para linfocitos CD4 y CD8, para después ser adquiridas en un citómetro de flujo (FACSCalibur BD Biosciences). **A:** CD4 =LT CD4 o Helper; **B:** CD8=LT CD8 o citotóxicos. Test de Mann Whitney ** $p < 0,01$.

Cuando se comparó la relación entre CD4/CD8 entre los distintos estadios del carcinoma mamario y los controles sin cáncer, así como la comparación según tipo de muestra (sangre/tejido) para cada grupo no se encontraron diferencias significativas (Fig. 18).

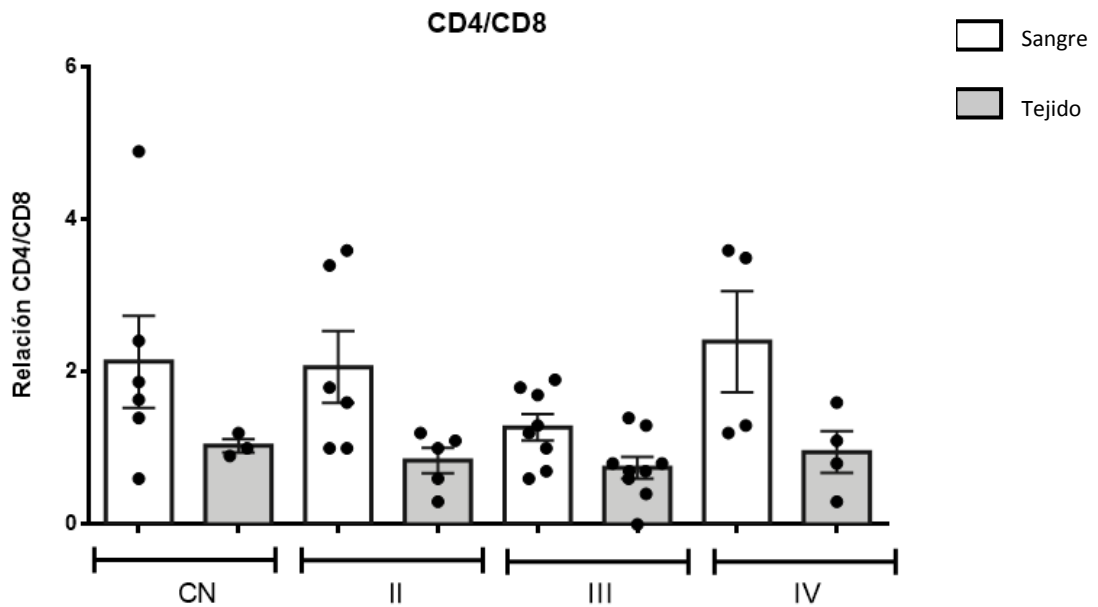


Figura 18. Relación de LT CD4/CD8 entre pacientes sin cáncer y los distintos estadios de pacientes con carcinoma mamario, en muestras de sangre y/o tejido. Los datos fueron obtenidos de la división de los porcentajes de LT CD4 y LT CD8. CD4 =LT CD4 o Helper; CD8=LT CD8 o citotóxico.

Se encontró que la población de LT CD4+ es significativamente mayor que la población de LT CD8+ en las muestras de sangre periférica en el grupo CN como en los estadios II y IV (Fig. 19 A, B y D). Por otro lado, como se describió en la Fig. 17A se evidenció que la población de LT CD4+ en el estadio III era significativamente mayor en sangre en comparación con tejido (Fig19C).

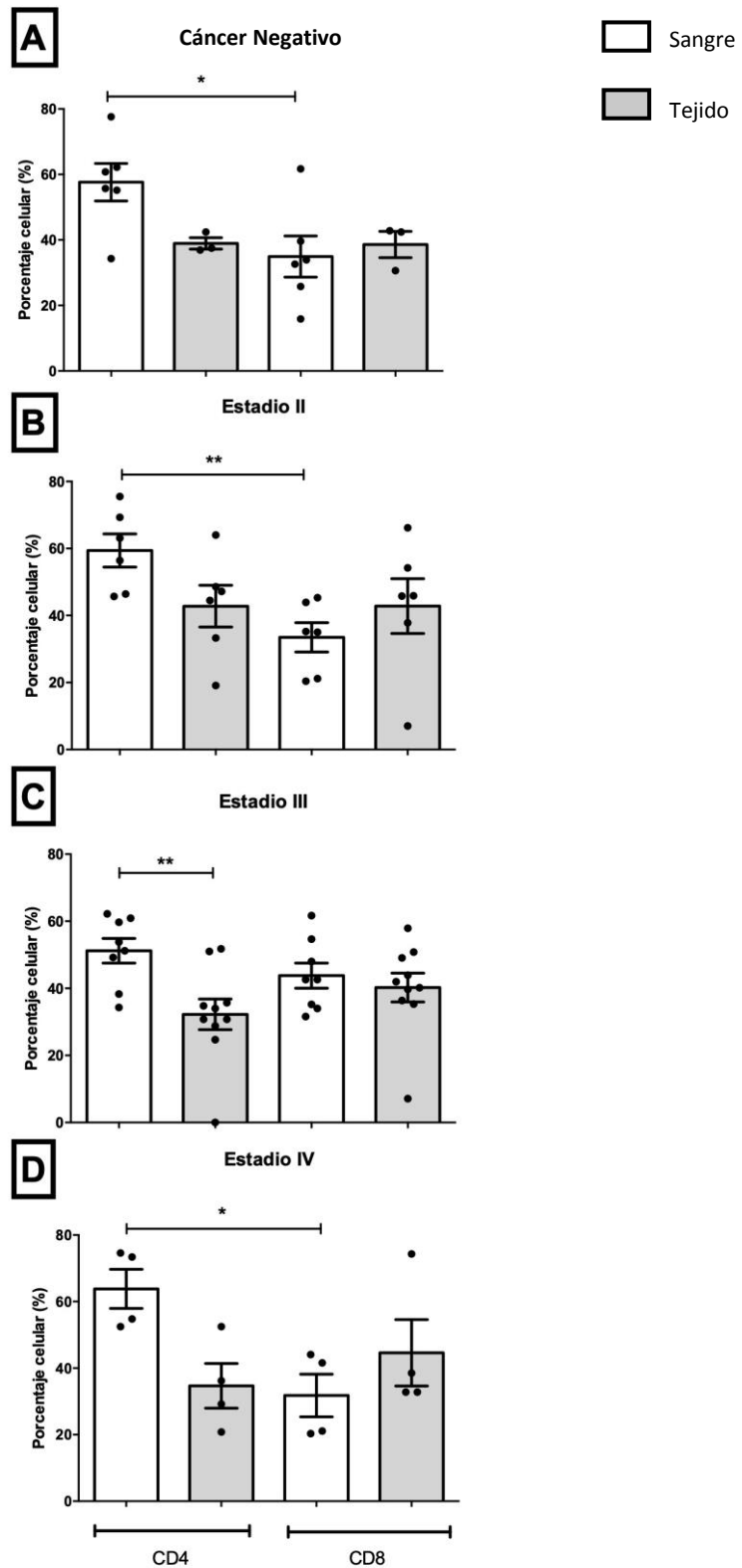


Figura 19. Comparación de porcentajes poblacionales de LT CD4 y CD8 por grupos y por tipo de muestra. Se obtuvieron 1×10^6 PBMC y $0,2 \times 10^6$ SCMT y luego se marcaron con 10uL de un cóctel de anticuerpos específicos para linfocitos CD4 y CD8, para después ser adquiridas en un citómetro de flujo (FACSCalibur BD Biosciences). **A:** CN=Grupo Cáncer Negativo; **B:** Grupo Estadio II; **C:** Grupo Estadio III; **D:** Grupo Estadio IV; Test de Mann Whitney * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.3. Determinación de poblaciones de macrófagos M1 y M2

El único parámetro inmunológico evaluado que en el test de “valores atípicos” presentó un valor demasiado elevado fue una población de M2 provenientes de PBMC, por lo que fue retirado de la evaluación. En el análisis de las poblaciones de macrófagos no se hallaron diferencias significativas entre los distintos estadios de carcinoma mamario y las pacientes sin cáncer tanto en sangre como en tejido; sin embargo, en todos los grupos, los porcentajes poblacionales de macrófagos M1 y M2 son significativamente mayores en las muestras de tejido en comparación a las muestras de sangre, aproximadamente 11% M1 y 63,5% M2, respectivamente (Fig. 20). Las comparaciones de los ratios tejido/sangre no presentaron diferencias significativas entre los estadios.

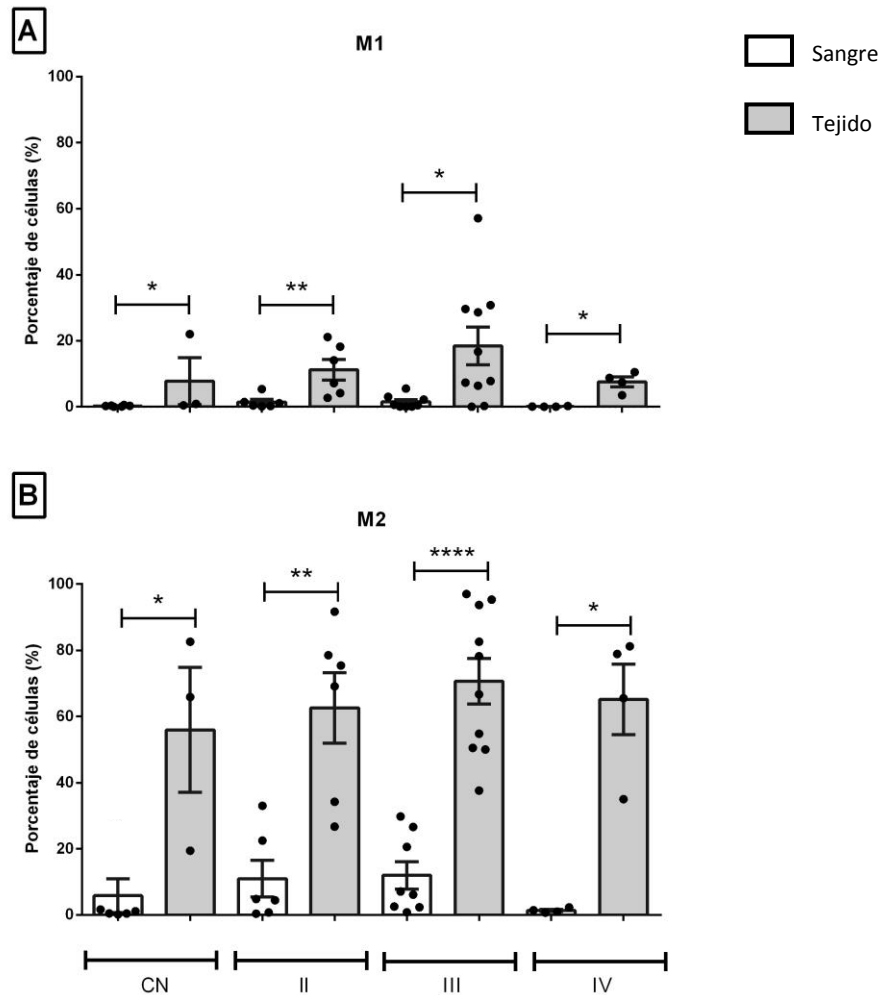


Figura 20. Porcentajes poblacionales de M1 y M2 entre pacientes sin cáncer y los distintos estadios de pacientes con carcinoma mamario, en muestras de sangre y/o tejido. Se obtuvieron 1×10^6 PBMC y $0,2 \times 10^6$ SCMT y luego se marcaron con 10uL de un cóctel de anticuerpos específicos para macrófagos M1 y M2, para después ser adquiridas en un citómetro de flujo (FACSCalibur BD Biosciences). **A:** M1 = Macrófagos clásicos; **B:** M2 = Macrófagos alternativos. Test de Mann Whitney * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$

Cuando se evaluó por grupo (CN o estadio) y por tipo de muestra se encontró que en todos los grupos las poblaciones de macrófagos M1 y M2 son significativamente mayores en muestras de tejido comparado a las muestras de sangre periférica (Fig. 21) y siempre se observa un mayor porcentaje de M2 que M1, 11% versus 63,5% (Fig. 19 y 21). Interesantemente, se encontró en los estadios II, III y IV una población significativamente mayor de macrófagos M2 con respecto a la población de macrófagos M1 en las muestras de tejido, caso que no ocurre en el grupo sin cáncer (Fig. 21B,C y D). Adicionalmente, se encontró un porcentaje de macrófagos M2 significativamente mayor con respecto a macrófagos M1 en sangre periférica de los estadio III y IV (Fig. 21C y D).

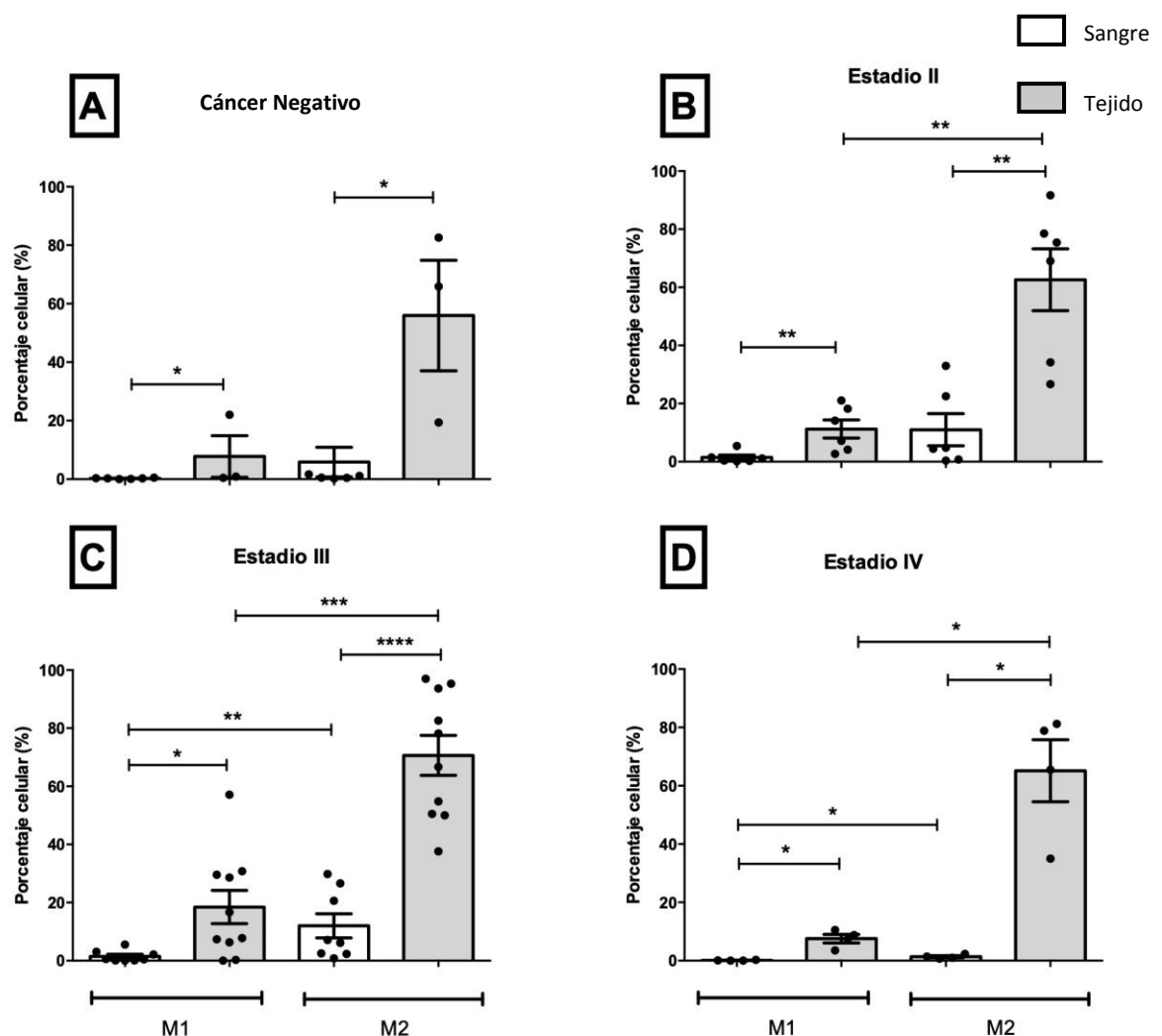


Figura 21. Comparación de porcentajes poblacionales de macrófagos M1 y M2 por grupos y por tipo de muestra. Se obtuvieron 1×10^6 PBMC y $0,2 \times 10^6$ SCMT y luego se marcaron con 10uL de un cóctel de anticuerpos específicos para macrófagos M1 y M2, para después ser adquiridos en un citómetro de flujo (FACSCalibur BD Biosciences). **A:** CN=Grupo Cáncer Negativo; **B:** Grupo Estadio II; **C:** Grupo Estadio III; **D:** Grupo Estadio IV; Test de Mann Whitney * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.4. Determinación de poblaciones de células dendríticas CDm y CDp

Con respecto a la evaluación de las poblaciones de células dendríticas, no hubo diferencias significativas entre los distintos estadios de carcinoma mamario y las pacientes sin cáncer. Cuando se hace la comparación dentro de cada grupo y por tipo de muestra (sangre y tejido) se encontró que el tejido presentaba un porcentaje significativamente menor de la subpoblación de CDm en el estadio III y un porcentaje significativamente mayor de la subpoblación de CDp en el grupo CN en comparación a la sangre (Fig. 22 A y B). Los ratios de tejido/sangre no presentaron diferencias significativas entre los estadios, en ninguna de las células dendríticas.

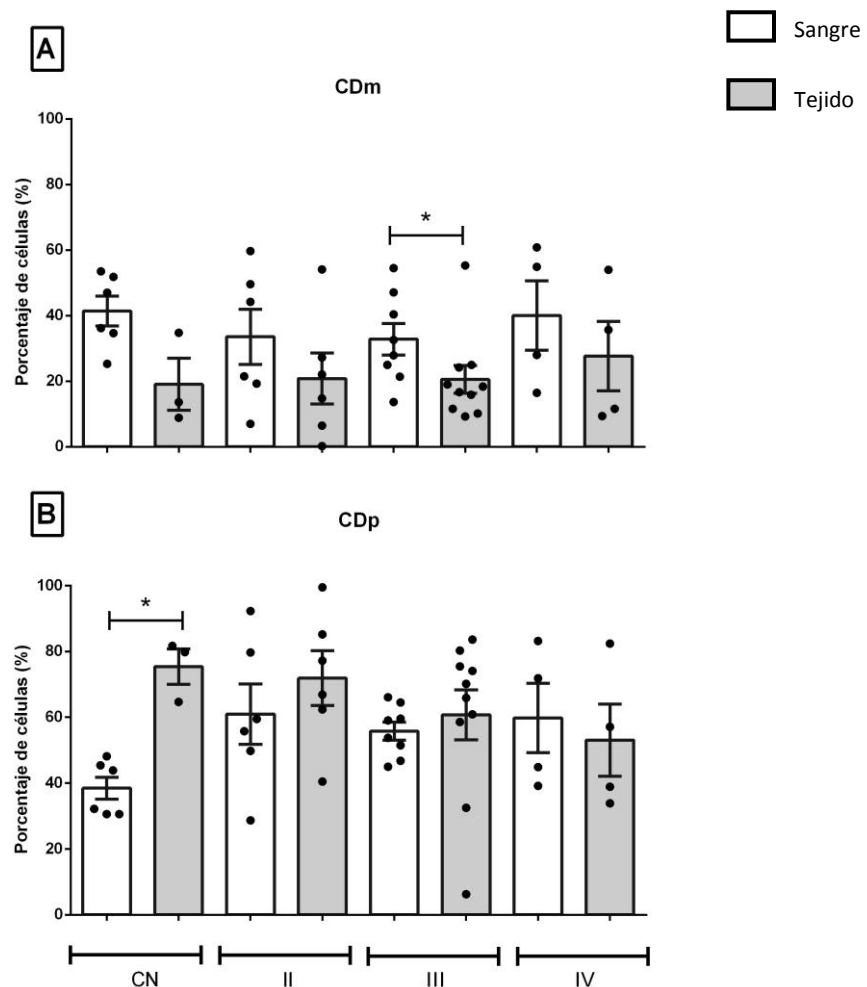


Figura 22. Porcentajes poblacionales de CDm y CDp entre pacientes sin cáncer y los distintos estadios de pacientes con carcinoma mamario, en muestras de sangre y/o tejido. Se obtuvieron 1×10^6 PBMC y $0,2 \times 10^6$ SCMT y luego se marcaron con 10uL de un cóctel de anticuerpos específicos para células dendríticas CDm y CDp, para después ser adquiridas en un citómetro de flujo (FACSCalibur BD Biosciences). **A:** CDm = Células dendríticas mieloides; **B:** CDp = Células dendríticas plasmacitoides. Test de Mann Whitney * $p < 0,05$.

Cuando se evaluó por grupo (CN o estadio) y por tipo de muestra se encontró que el grupo sin cáncer presentaba mayor porcentaje de CDp en tejido que en sangre (Fig. 22B y 23A). En el grupo de estadio III se encontró menor porcentaje significativo de CDm en las muestras de tejido; también se encontró que en los grupos estadio II y III existían mayores porcentajes significativos de CDp que CDm en tejido (Fig. 23 B y C). Finalmente en muestras de sangre del grupo estadio III se encontró un mayor porcentaje estadísticamente significativo de CDp que CDm (Fig. 23C).

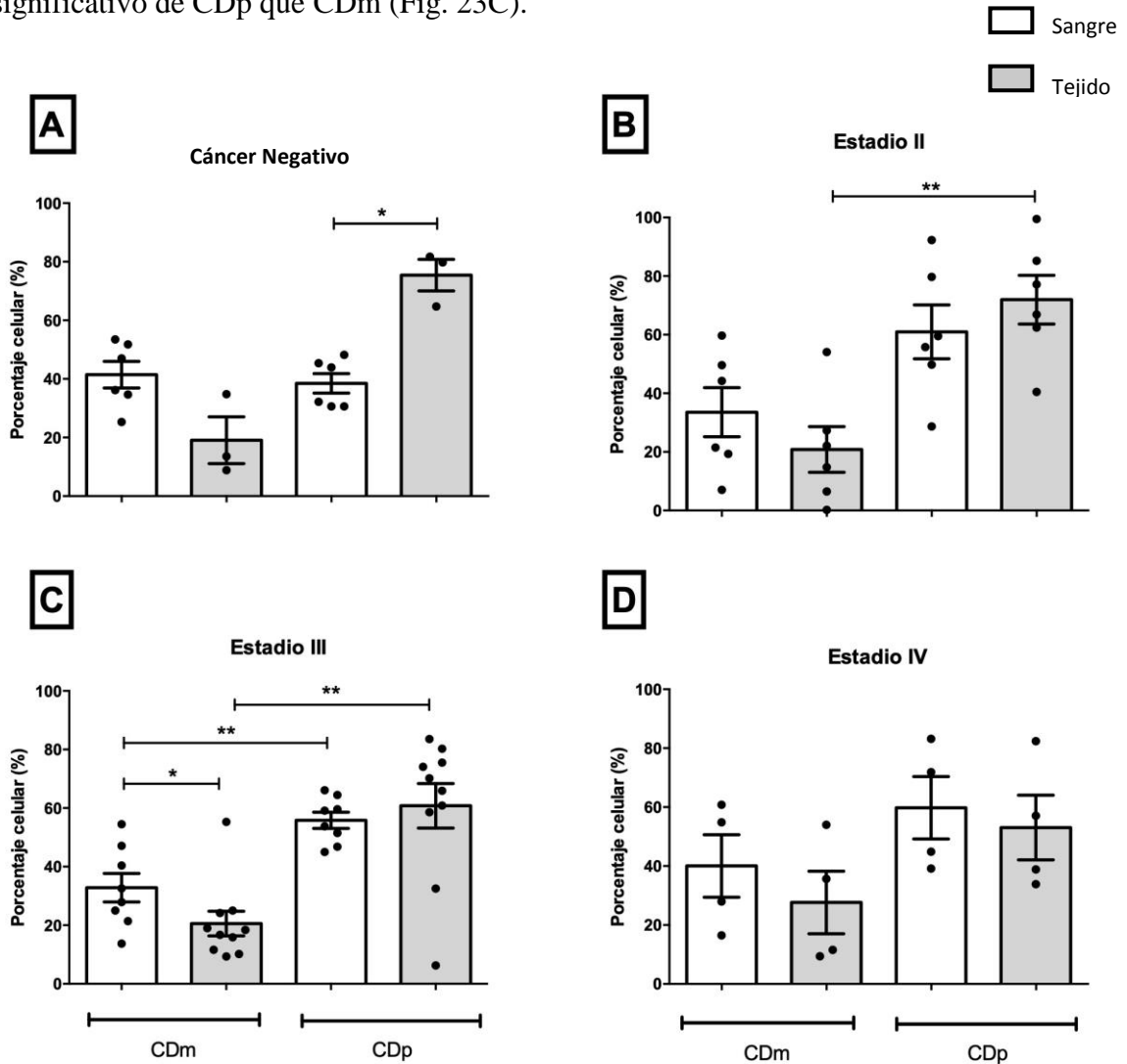


Figura 23. Comparación de porcentajes poblacionales de células dendríticas CDm y CDp por grupos y por tipo de muestra. Se obtuvieron 1×10^6 PBMC y $0,2 \times 10^6$ SCMT y luego se marcaron con 10uL de un cóctel de anticuerpos específicos para células dendríticas, para después ser adquiridos en un citómetro de flujo (FACSCalibur BD Biosciences). **A:** CN=Grupo Cáncer Negativo; **B:** Grupo Estadio II; **C:** Grupo Estadio III; **D:** Grupo Estadio IV; Test de Mann Whitney * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5.5. Análisis del perfil de citoquinas

Para el estudio de citoquinas se utilizaron sobrenadantes de cultivo de las muestras indicadas en la tabla 4; sin embargo, de las 20 muestras de tejido de donantes con carcinoma mamario se procesaron solo 11 sobrenadantes debido a la escasa cantidad de tejido para los ensayos y de las 18 muestras de sangre de donantes con carcinoma mamario se procesaron 17 muestras debido a la pérdida de una muestra, quedando distribuidas como se indica en la Tabla 6.

Tabla 6. Distribución de muestras de sobrenadante obtenido de células provenientes de sangre y tejido para el estudio del perfil de citoquinas.

	Tejido	Sangre
Carcinoma mamario	N = 11	N = 17
	II = 2; III = 5; IV = 4 *	II = 6; III = 7; IV = 4 *
Sin cáncer	N = 03	N = 06

N = número total de muestras. * Distribución de muestras por estadio.

Los perfiles de citoquinas Th1/Th2/Th17 fueron medidos en células provenientes de sangre periférica (PBMC) y tejido (SCMT) sin adicionar ningún tipo de estímulo luego de su obtención, por lo que se muestran las concentraciones de estas citoquinas (pg/mL) en su estado natural.

Los datos obtenidos fueron analizados con el test para identificar valores atípicos, con el cual se encontraron mediciones que fue necesario eliminar. Los resultados indican que no hubo diferencias significativas entre los perfiles de citoquinas Th1/Th2/Th17 del grupo sin cáncer con respecto a los grupos de estadios II, III y IV. Asimismo, la comparación intragrupo tampoco evidenció diferencias significativas, mostrándose solo tendencias. Aunque las concentraciones de las citoquinas en cada uno de los grupos tuvieron variabilidad, interesantemente encontramos en sobrenadantes de cultivo de PBMC que el IFN- γ (citoquina Th1) tenía un valor más elevado en el grupo sin cáncer y luego prácticamente desaparece en los grupos de los distintos estadios del carcinoma mamario (Fig. 24A). En el caso del grupo estadio II hay una tendencia a una mayor concentración de las citoquinas IL-6 y IL-10 (citoquinas Th2) que la citoquina TNF- α (citoquina Th1) (Fig. 24 B, D y F). De manera similar, los sobrenadantes de cultivo de PBMC del grupo

estadio III también mostraron el perfil anterior, una mayor cantidad de citoquinas Th2 que Th1 (Fig. 24 B, D y F). Cuando evaluamos el perfil de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de SCMT encontramos que aunque a concentraciones bajas, la IL-6 (citoquina Th2) mostraba una tendencia a una mayor concentración que el resto de citoquinas Th1 (Fig. 24F). En el caso de las citoquinas IL-2 (Th1), IL-4 (Th2) y IL-17 (Th17) presentaron concentraciones por debajo de los 4pg/mL, lo que no representaría una respuesta significativa a nivel fisiológico (Fig. 24 C, E y G).

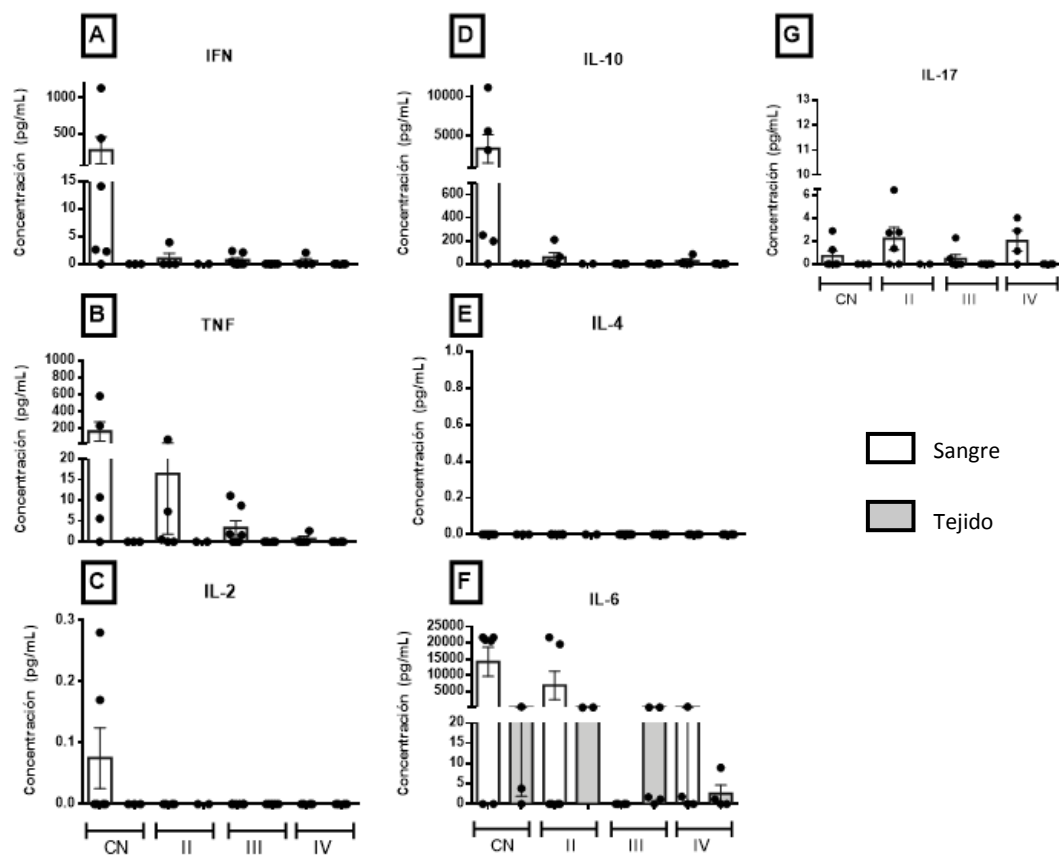


Figura 24. Comparación del perfil de citoquinas Th1/Th2/Th17. Se cultivaron por 24 horas 1×10^6 PBMC y $0,2 \times 10^6$ SCMT y se obtuvieron los sobrenadantes para medir las citoquinas con la técnica Cytometric Bead Array en un citómetro de flujo (FACSCalibur BD Biosciences). **A:** IFN- γ = Interferón gamma; **B:** TNF- α = Tumoral necrosis factor alfa; **C:** IL-2 = Interleuquina 2; **D:** IL-10 = Interleuquina 10; **E:** IL-4 = Interleuquina 4; **F:** IL-6 = Interleuquina 6; **G:** IL-17 = Interleuquina 17.

VI. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio ha sido evaluar las principales poblaciones de células inmunocompetentes (linfocitos, macrófagos y células dendríticas) y el perfil de citoquinas Th1/Th2/Th17 a nivel sistémico y en biopsias de tejido mamario de donantes peruanas sin cáncer y con carcinoma mamario de estadios II, III y IV provenientes del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN). Ello con el fin de determinar si existen diferencias en los parámetros inmunológicos entre los diferentes estadios de cáncer en comparación a las pacientes sin cáncer y además entre los tipos de muestras utilizados (sangre y tejido). Cabe mencionar que la evaluación conjunta de sangre y tejido de pacientes con cáncer de mama es algo novedoso. No se encuentran estudios previos que evalúen ambas variables en humanos. Es un campo nuevo que puede ser explorado de tener buenos resultados. Sobre todo en Perú, ampliar el conocimiento del perfil inmunológico de las pacientes en los distintos estadios y tanto del ámbito local como periférico (tejido y sangre) puede ser beneficioso para el desarrollo de nuevos tratamientos.

Los resultados no muestran diferencias significativas de las poblaciones inmunocompetentes (linfocitos, macrófagos y células dendríticas) y el perfil de citoquinas Th1/Th2/Th17 entre los estadios II, III y IV de carcinoma mamario y los controles sin cáncer. Sin embargo, cuando se hizo la evaluación por tipo de muestra encontramos claramente una mayor proporción de macrófagos M1 y M2 en el tejido mamario de controles sin cáncer y en los estadios II, III y IV en comparación con las muestras de sangre periférica (PBMC) de estas mismas donantes. Aunque ambas poblaciones de macrófagos en tejido son siempre elevadas es importante destacar que siempre la proporción de macrófagos M2 fue superior a los M1, incluso existió una tendencia a incrementar conforme se pasaba del grupo sin cáncer hasta el estadio IV (Fig. 20 y 21). Cuando se evaluó los macrófagos M1 y M2 del grupo sin cáncer se observó un mayor porcentaje de ambos fenotipos en el tejido mamario en comparación a sangre, lo que se mantuvo en los estadios II, III y IV. La polarización de macrófagos M2 en dicho tejido se evidenció de manera significativa en los estadios II, III y IV (Fig. 20); mientras que la polarización de macrófagos M2 en sangre recién se hace significativa en los estadios III y IV (Fig. 21 C y D). Es importante indicar que los porcentajes poblacionales de ambos fenotipos fueron inferiores al 1,8% en el estadio IV (Fig.21D).

Aras et al 2017 (41) y Chih-Hsing et al 2018 (47) han demostrado que en varios tipos de cáncer existe una alta proporción de macrófagos y una polarización de tipo M2, la cual es pro-angiogénica y pro-tumoral. Nuestros resultados confirman los hallazgos por Ward et al 2015 (39), que indican que los macrófagos M2, o también conocidos como TAM (macrófagos asociados al tumor), son los más abundantes en el microambiente tumoral del cáncer de mama donde son promotores del crecimiento neoplásico debido a la secreción de factores mitogénicos y angiogénicos. Por ello los M2 son asociados con un pobre pronóstico en pacientes con cáncer de mama.

De manera anecdótica en nuestro caso encontramos que los controles sin cáncer presentaban un mayor porcentaje de células M1 y M2 en tejido; sin embargo, no existe una polarización como si se aprecia en los estadios.

Asimismo, nuestros resultados demuestran que la polarización M2 ocurre en tejido canceroso de pacientes que se encuentran el estadio II y III de la enfermedad (Fig. 21B y C respectivamente). Una posible explicación es el hecho de que las células sanguíneas son direccionadas hacia el microambiente tumoral. Esta información es útil para el abordaje del tratamiento de estos pacientes cuando se quiera modificar la polarización M2 hacia M1 como lo sugieren y demuestran investigadores como Ngambenjwong et al 2017 (44).

Otro resultado interesante se observó a nivel de las poblaciones de linfocitos. Cuando se evaluaron las subpoblaciones de LT provenientes de PBMC aislados de sangre se encontró que las CD4+ estaban incrementadas significativamente comparadas a las CD8+ en los grupos sin cáncer, estadio II y IV (Fig. 18A, B, D); mientras que en el estadio III las CD4+ estaban incrementadas significativamente pero con respecto a las CD4+ de tejido (Fig. 18C). El mayor porcentaje de CD4+ que CD8+ en sangre en los estadios II y IV representa un escenario negativo para las pacientes ya que las CD8+, citotóxicas, son las que beneficiarían una acción anti-tumoral. Al respecto, Engin et al 2013 (57) realizaron un estudio con poblaciones linfocitarias sanguíneas de pacientes con carcinoma mamario no metastásico e hipotetizaron que el aumento de LT CD4+ se debería al incremento de la molécula HLA-DR en LB, es decir los LB actuarían como células presentadoras de antígenos tumorales. En nuestro caso, si bien encontramos ambas poblaciones sanguíneas el porcentaje de LB en todos los estadios es inferior al porcentaje de LT totales y en vista que no se ha medido ninguna molécula relacionada con la

presentación de antígeno o activación linfocitaria sólo podríamos indicar que existe una diferencia porcentual entre ambas poblaciones. Adicionalmente, Engin et al 2013 (57) concluyen que estas poblaciones linfocitarias serían buenos marcadores pronósticos, lo que en nuestro caso se debería complementar con la medición adicional de marcadores de activación como moléculas coestimuladoras (CD28, CTLA-4), de memoria (CD45RO+) o de células naive (CD45RA+). Típicamente los linfocitos que llegan al microambiente tumoral son llamados TIL (linfocitos infiltrantes de tumor); en nuestro caso la única población que demostró un porcentaje significativamente menor en el tejido tumoral fue la población de LT CD4+ en el estadio III (Fig.17A y Fig.19C). Los LT CD4+ son un tipo de TIL que realiza funciones extremadamente importantes para la defensa anti-tumoral. Por lo tanto el hecho de que se encuentren en baja proporción en el tejido de pacientes con carcinoma mamario estadio III resulta en mal pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, también sería importante que se pueda evaluar el grado de activación o funcionalidad de estas células en estudios futuros.

En el caso de los linfocitos B, se encontró que el porcentaje fue significativamente mayor en sangre que en tejido en los estadios II, III y IV. Al respecto, Tsuda et al 2017 (77), al evaluar los LB en sangre de pacientes con carcinoma mamario demostró que los LB estaban incrementados en relación a las pacientes sin cáncer; sin embargo, deja abierta la posibilidad de que existiría una alta variabilidad como por ejemplo en nuestro caso en el que no encontramos diferencias entre los LB sanguíneos de ambos grupos de donantes (Fig. 16A). Además, Tsuda et al 2017 (77) demostró que una alta proporción de los LB de estos pacientes serían del fenotipo de LB de memoria, lo que en nuestro caso podría ser similar a pesar de que no se midieron marcadores de memoria.

Tsuda B et al 2018 y otros investigadores declaran que la inmunidad contra el cáncer está principalmente relacionada a los linfocitos Natural Killer (NK) y a los linfocitos NK-T de la inmunidad innata; mientras que los LT CD4+, CD8+ y LB de la inmunidad adaptativa serían las más representativas. En el caso de nuestro estudio sobre las NK, observamos que los porcentajes poblacionales de NK no varían cuando se comparan entre el grupo sin cáncer y los grupos de los estadios II, III y IV (Fig. 16C). Este resultado es similar al encontrado por Verma et al 2015 (53), quien evaluó 25 pacientes con cáncer de mama grande (>3cm) y localmente avanzado pero que recibieron terapia neoadyuvante (Capecitabina, Doxetaxel, Doxorubicina y Ciclofosfamida). Por tanto, sería interesante

comprobar estos resultados en nuestros pacientes luego del tratamiento al que sean sometidos. Además, cuando se hizo la comparación por tipo de muestra se vio una diferencia significativa del porcentaje de NK en sangre comparada con tejido tanto en el estadio II como en el estadio IV y aunque en el estadio III también se observó esta diferencia, el p fue ligeramente mayor a 0,05 ($p=0,051$) (Fig.16C). En sangre, resulta siendo anecdótico que los porcentajes de NK sean mayores dependiendo de la condición desde el grupo sin cáncer y pasando por los estadios II, III y IV; sin embargo, la estadística no mostró diferencias significativas (Fig.16C). Estos últimos resultados sobre las NK en nuestro estudio estarían de acuerdo con lo declarado por Pahl et al 2017 (52), quien indica que altos números de NK y LT CD8+ se asocian con un mejor pronóstico. Se sabe que las NK montan mejores respuesta para tumores hematológicos que contra tumores sólidos como el del carcinoma mamario, por tanto las NK (y los LT CD8+) frecuentemente se agotan como consecuencia del proceso de inmunoección del cáncer que ejecuta para defender al sistema inmune. De acuerdo a esto es altamente probable que las actividades funcionales estén reducidas en ambos ambientes (sangre y tejido). Esto último no ha podido ser demostrado por nuestro estudio ya que solo se midieron porcentajes poblacionales.

Tanto la respuesta innata como la adaptativa son importantes para la inmunidad contra los tumores y existe un grupo de células caracterizadas por constituir un enlace o unión entre ambas inmunidades: las células dendríticas, consideradas las presentadoras de antígeno profesionales (CPA). Ellas se dividen dos principales subpoblaciones caracterizadas por su rol en respuestas genéricas o convencionales (células dendríticas mieloides) y respuesta contra agentes virales e incluso con algún rol en la respuesta antitumoral (células dendríticas plasmacitoides). En nuestro estudio encontramos que las CDm solo demostraron un mayor porcentaje significativo de su población en sangre con respecto a tejido en el estadio III (Fig. 22A); mientras que en los grupos sin cáncer y estadios II y IV, a pesar de que se ve una diferencia similar, no existe diferencia significativa (Fig.22A). Por otro lado, las CDp en el grupo sin cáncer de tejido, presentaron un porcentaje significativamente alto con respecto a la muestra de sangre (Fig.22B). Al respecto, Treilleux et al 2004 (104) encontraron en el tejido primario de pacientes con carcinoma mamario un incremento en la población de CDp (medida por IHC) que constituía aproximadamente el 13% del infiltrado celular, razón por la cual concluyen que su presencia es un factor de mal pronóstico en cuanto a la supervivencia

de estos pacientes. En nuestro caso, se confirmaría esta hipótesis dado que hemos encontrado cerca del 60% de CDp en ambos tipos de muestras y en los estadios II, III y IV, incluso estos porcentajes son superiores a los de las CDm o convencionales (Fig.22B). Sin embargo, resulta anecdótico que el grupo sin cáncer tenga menos CDp en sangre, lo cual podría ser explicable por el hecho que aún no han recibido ningún estímulo en las donantes sin cáncer. En el análisis de ambas subpoblaciones de CD por estadios, se observó que en los estadios II y III la proporción de CDp es significativamente mayor que la proporción de CDm en tejido, lo que confirmaría el mal factor pronóstico declarado por Treilleux et al 2004 (104) (Fig. 23B y C). Esta diferencia poblacional también se encontró en muestras de sangre del grupo estadio III (Fig. 23C), lo que también demostraría que el estadio es un factor influyente.

Además de los parámetros celulares relacionados a la respuesta inmune, en este estudio también se evaluó parámetros solubles que en muchos casos son producidos por estas células, como es el caso de las citoquinas, que gobiernan gran parte de los mecanismos de defensa y en especial contra los tumores, pues son proteínas que inmunomodulan la actividad celular y cuyo perfil puede ser modificado incluso por los tumores para favorecer su progresión. En ese sentido en este estudio se hizo una evaluación de las citoquinas Th1/Th2/Th17 a partir de PBMC (sangre) y SCMT (tejido), pero en condiciones basales, es decir, sin la intervención de ningún estímulo que provoque su aumento o disminución en condiciones de cultivo. Esto suele ser un tanto complicado de evaluar pues en muchos casos los niveles de citoquinas no pueden ser detectables por las técnicas empleadas; sin embargo, el punto a favor es que se puede observar una condición real en un determinado estadio del cáncer de mama o de sujetos sin cáncer.

Según lo evaluado en resultados para las citoquinas Th1/Th2/Th17 y a pesar de que no existen diferencias significativas, los valores de concentración de cada una de las citoquinas nos muestran una tendencia hacia una polarización de tipo Th2 donde destacan los niveles de IL-10 en sangre, una citoquina inmunoreguladora y anti-inflamatoria, y los niveles de IL-6 incluso en tejido, una citoquina pro-inflamatoria. Para muchas de las otras mediciones de citoquinas los valores fueron muy bajos o imperceptibles lo cual se puede explicar por la ausencia de estímulos. Se midieron los niveles basales de citoquinas de las pacientes.

En varios cánceres humanos las células malignas y las células infiltrantes del huésped expresan y secretan un amplio rango de citoquinas Th1/Th2/Th17 y además estas pueden ser mejoradas o suprimidas por citoquinas reguladoras (Por ej. TGF- β) en el ambiente de la respuesta antitumoral (105). En su artículo de revisión, Carvalho et al 2014 (60) indican que algunos mecanismos de la respuesta inmune como la polarización Th2 pueden promover el desarrollo y progresión del tumor. Este balance entre la respuesta protectora citotóxica y la respuesta perjudicial humoral o Th2 puede ser regulada sistemáticamente por el estatus inmune del individuo. Kaewkangsadan et al 2018 (105) demostraron la presencia de una polarización Th2 en los nódulos linfáticos axilares con metástasis, encontrando un alto nivel de expresión de la citoquina supresora IL-10 y un bajo nivel de expresión de las citoquinas Th1 inflamatorias, IFN- γ e IL-2. Estos resultados son similares a los encontrados en este estudio, a pesar de que en nuestro caso no se pudo lograr la diferencia estadística debido a la gran variabilidad que existía entre donantes; sin embargo, los valores promedio de las concentraciones de citoquinas muestran las diferencias antes mencionadas.

VII. CONCLUSIONES

- Se observó una polarización de macrófagos M2 en el microambiente tumoral del tejido mamario, la cual llega a superar el 60% en los estadios II, III y IV; mientras que el fenotipo M1 no supera el 20%. Asimismo, en sangre periférica también se observó una polarización M2 pero a partir de estadios avanzados (III y IV); sin embargo, la frecuencia porcentual no supera el 20%.
- No se encontraron diferencias significativas entre la frecuencia celular y el nivel de citoquinas entre los grupos sin cáncer y los estadios II, III y IV del carcinoma mamario. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas cuando se evaluó el tipo de muestra, siendo la sangre periférica el lugar donde existe una mayor frecuencia porcentual de linfocitos T CD4+ (estadio III, >40%), linfocitos B (estadios II, III y IV, >20%) y linfocitos NK (estadios II y IV, >40%) en comparación con el microambiente tumoral del tejido mamario.
- El porcentaje de la subpoblación de linfocitos T en sangre periférica LT CD4+ fue significativamente mayor que el de LT CD8+ en los estadios II y IV. En el estadio III se observó esta misma tendencia, aunque no fue estadísticamente significativa.
- A pesar de que en el estadio III se encontró una mayor frecuencia porcentual de CDm (32%) en sangre periférica que en tejido, los porcentajes de CDp son o tienden a ser mayores que los porcentajes de CDm en los estadios II, III y IV, tanto en sangre como en tejido.
- Aunque no se encontró significancia estadística existiría una tendencia hacia la polarización de citoquinas Th2 en sangre periférica en los estadios II y III, donde las concentraciones de IL-6 (Th2) representan 100 veces más que TNF (Th1).

VIII. RECOMENDACIONES

Una de las principales limitaciones de este estudio fue el escaso número de muestras. Sería recomendable trabajar con un número más grande de muestras para lograr tener una mayor representatividad en cada uno de los estadios de cáncer estudiados. Además, también es importante incrementar el número de muestras negativas para cáncer que puedan ser incluidas como controles (pacientes sanas). En un proyecto de dimensiones más grandes, incluir todos los estadios estratificados por subtipos de cáncer, podría dar más luz en el tema de los cambios inmunológicos que se desarrollan a medida que avanza la lesión.

Finalmente, recomendamos el uso de marcadores celulares que permitan evaluar la funcionalidad, maduración y activación.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Fact sheets: Cancer. [Online].; 2018.
2. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer Statistics, 2018. A cancer journal for clinicians. 2018; 68(1).
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA CANCER J CLIN. 2018 Setiembre.
4. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M. Global Cancer Observatory: Cancer Today. [Online].; 2018 [cited 2018 Setiembre. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>.
5. Ministerio de Salud. PLAN NACIONAL PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE CÁNCER DE MAMA EN EL PERU 2017 - 2021. Documento técnico. Lima: MINSA; 2017.
6. Centers for Disease Control and Prevention. What Are the Risk Factors for Breast Cancer? [Online].; 2018 [cited 2018 setiembre. Available from: https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm.
7. Feng Y, Spezia M, Huang S. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. Genes & Diseases. 2018 Junio; 5(2).
8. Centers for Disease Control and Prevention. What Is Breast Cancer Screening? [Online].; 2018 [cited 2018 Setiembre. Available from: https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/screening.htm.
9. Løberg M, Lousdal M, Bretthauer M. Benefits and harms of mammography screening. Breast Cancer Res. 2015 Mayo; 17(1).
10. Myers E, Moorman P, Gierisch J. Benefits and Harms of Breast Cancer Screening: A Systematic Review. JAMA. 2015 Octubre; 314(15).
11. Seely J, Alhassan T. Screening for breast cancer in 2018—what should we be doing today? Curr Oncol. 2018 Junio; 25(1).
12. American Cancer Society. Breast Cancer Early Detection and Diagnosis. [Online].; 2018 [cited 2018 Setiembre. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection.html>.
13. Foundation NBC. Breast Cancer Diagnosis. [Online].; 2016 [cited 2018 Setiembre. Available from: <https://www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-diagnosis>.
14. Mathenge E, Dean C, Clements D. Core Needle Biopsy of Breast Cancer Tumors Increases Distant Metastases in a Mouse Model. Neoplasia. 2014 Noviembre; 16(11).
15. Sennerstam R, Franzén B, Wiksell H. Core-needle biopsy of breast cancer is associated with a higher rate of distant metastases 5 to 15 years after diagnosis than FNA biopsy. Cancer Cytopathol. 2017 Octubre; 125(10).
16. McDonald E, Clark A, Tchou J. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. J Nucl Med. 2016 Febrero; 57(Suppl 1).

17. Shah R, Rosso K, Nathanson D. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014 Agosto; 5(3).
18. Krishnamurti U, Silverman J. HER2 in breast cancer: a review and update. *Adv Anat Pathol*. 2014 marzo; 21(2).
19. breastcancer.org. Molecular Subtypes of Breast Cancer. [Online].; 2018 [cited 2018 Octubre. Available from: <https://www.breastcancer.org/symptoms/types/molecular-subtypes>.
20. Xiaofeng D, Ting L, Zhonghu B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*. 2015 Setiembre; 5(10).
21. American Cancer Society. Breast Cancer Grades. [Online].; 2017 [cited 2018 Octubre. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-grades.html>.
22. Zurawska U, Baribeau D, Gilck S. Outcomes of her2-positive early-stage breast cancer in the trastuzumab era: a population-based study of Canadian patients. *Curr Oncol*. 2013 Diciembre; 20(6).
23. Fink M, Chipuk J. Survival of HER2-Positive Breast Cancer Cells. *Genes Cancer*. 2013 Mayo; 4(5-6).
24. Tong ZJ, Shi NY, Zhang ZJ. Expression and prognostic value of HER-2/neu in primary breast cancer with sentinel lymph node metastasis. *Biosci Rep*. 2017 Agosto; 37(4).
25. Collignon J, Lousberg L, Schroeder H. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2016 Mayo; 8.
26. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011; 144.
27. Jiang X, Shapiro D. The immune system and inflammation in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Enero; 382(1).
28. Mantovani A. Macrophages, Neutrophils, and Cancer: A Double Edged Sword. *New Journal of Science*. 2014; 2014.
29. Tedesco S, Bolego C, Toniolo A. Phenotypic activation and pharmacological outcome of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages. *Inmunobiology*. 2015; 220.
30. Ferrante C, Leibovich S. Regulation of macrophage polarization and wound healing. *Advances in wound care*. 2012; 1(1).
31. Kapellos T, Iqbal A. Epigenetic Control of Macrophage Polarisation and Soluble Mediator Gene Expression during Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2016 Abril; 2016.
32. Li H, Yang B, Huang J. Cyclooxygenase-2 in tumor-associated macrophages promotes breast cancer cell survival by triggering a positive-feedback loop between macrophages and cancer cells. *Oncotarget*. 2015 Agosto; 6(30).
33. Biswas S, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*. 2010; 11(10).
34. Sanchez-Reyes K, Bravo-Cuellar A. Cervical Cancer Cell Supernatants Induce a Phenotypic Switch from U937-Derived Macrophage-Activated M1 State into M2-

- Like Suppressor Phenotype with Change in Toll-Like Receptor Profile. *BioMed Research International*. 2014; 2014.
35. Weber M, Moebius P, Büttner-Herold M. Macrophage polarisation changes within the time between diagnostic biopsy and tumour resection in oral squamous cell carcinomas—an immunohistochemical study. *Br J Cancer*. 2015 Julio; 113(3).
 36. Isidro R, Appleyard C. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016 julio; 311(1).
 37. Sica A, Erreni M, Allavena P. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Noviembre; 72(21).
 38. Tariq M, Zhang J, Liang G. Macrophage Polarization: Anti-Cancer Strategies to Target Tumor-Associated Macrophage in Breast Cancer. *J Cell Biochem*. 2017 setiembre; 118(9).
 39. Ward R, Sims A, Lee A. Monocytes and macrophages, implications for breast cancer migration and stem cell-like activity and treatment. *Oncotarget*. 2015 Mayo; 6(16).
 40. Linde N, Casanova-Acebe M, Sosa M. Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. *Nat Commun*. 2018 Enero; 9(21).
 41. Aras S, Zaidi R. TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *Br J Cancer*. 2017 Noviembre; 117(11).
 42. Nielsen S, Schmid M. Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis. *Mediators Inflamm*. 2017 Enero; 2017.
 43. Chen Y, Zhang S, Wang Q, Zhang X. Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein. *J Hematol Oncol*. 2017 Febrero; 10(36).
 44. Ngambenjawong C, Gustafson H, Pun S. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017 Mayo; 114.
 45. Poh A, Ernst M. Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Front Oncol*. 2018 Marzo; 8(49).
 46. Steenbrugge J, Breyne K, Demeyere K. Anti-inflammatory signaling by mammary tumor cells mediates prometastatic macrophage polarization in an innovative intraductal mouse model for triple-negative breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Agosto; 37(191).
 47. Chih-Hsing H, Fang-Ming C, Yi-Ching L. Altered monocyte differentiation and macrophage polarization patterns in patients with breast cancer. *BMC Cancer*. 2018 abril; 18(366).
 48. Law A, Lim E, Ormandy C, Gallego-Ortega D. The innate and adaptive infiltrating immune systems as targets for breast cancer immunotherapy. *Endocr Relat Cancer*. 2017 Febrero; 24(4).
 49. Park IH, Yang HN, Lee KJ. Tumor-derived IL-18 induces PD-1 expression on immunosuppressive NK cells in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Mayo; 8(20).

50. Rezvani K, Rouce R, Liu E, Shpall E. Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther.* 2017 Agosto; 25(8).
51. Sungur C, Murphy W. Positive and Negative Regulation by NK Cells in Cancer. *Crit Rev Oncog.* 2015 Enero; 19(0).
52. Pahl J, Cerwenka A. Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity. *Immunobiology.* 2017 Enero; 222(1).
53. Verma C, Viriya K, Eremin J. Natural killer (NK) cell profiles in blood and tumour in women with large and locally advanced breast cancer (LLABC) and their contribution to a pathological complete response (PCR) in the tumour following neoadjuvant chemotherapy (NAC): differential rest. *J Transl Med.* 2015 Junio; 13.
54. Martín-Antonio B, Suñe G, Perez-Amill L. Natural Killer Cells: Angels and Devils for Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2017 Setiembre; 18(9).
55. Varn F, Mullins D, Arias-Pulido H. Adaptive immunity programmes in breast cancer. *Immunology.* 2017 Enero; 150(1).
56. Emens L. Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012 Diciembre; 12(12).
57. Engin H, Bilir C, Ozel Tekin I. Prognostic Significance of Peripheral Blood Flow Cytometry Parameters in Patients with Non-Metastatic Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(12).
58. Makhoul I, Atiq M, Alwbari A, Kieber-Emmons T. Breast Cancer Immunotherapy: An Update. *Breast Cancer (Auckl).* 2018 mayo; 12.
59. Hong-Yan X, Zhi-Min S, Da-Qiang L. Tumor microenvironment: driving forces and potential therapeutic targets for breast cancer metastasis. *Chin J Cancer.* 2017 Marzo; 36.
60. Carvalho M, Pires I, Prada J. A Role for T-Lymphocytes in Human Breast Cancer and in Canine Mammary Tumors. *Biomed Res Int.* 2014 Febrero; 2014.
61. Ryba-Stanisławowska M, Werner P, Brandt A. Th9 and Th22 immune response in young patients with type 1 diabetes. *Immunol Res.* 2016 Junio; 64(3).
62. Mao Y, Qu Q, Chen X. The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016 Abril; 11(4).
63. Nagarajan D, McArdle S. Immune Landscape of Breast Cancers. *Biomedicines.* 2018 Marzo; 6(1).
64. Bates J, Derakhshandeh R, Jones L, Webb T. Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer.* 2018 Mayo; 18.
65. Hansen M, Andersen M. The role of dendritic cells in cancer. *Semin Immunopathol.* 2017 Abril; 39(3).
66. Chen X, Shao Q, Hao S. CTLA-4 positive breast cancer cells suppress dendritic cells maturation and function. *Oncotarget.* 2017 Enero; 8(8).
67. Veglia F, Gabrilovich D. Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr Opin Immunol.* 2017 Abril; 45.

68. Gardner A, Ruffell B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol.* 2016 Diciembre; 37(12).
69. Gelao L, Criscitiello C, Esposito A. Dendritic cell-based vaccines: clinical applications in breast cancer. *Immunotherapy.* 2014 Abril; 6(3).
70. Lin M, Liang S, Jiang F. 2003-2013, a valuable study: Autologous tumor lysate-pulsed dendritic cell immunotherapy with cytokine-induced killer cells improves survival in stage IV breast cancer. *Immunol Lett.* 2017 Marzo; 183.
71. Mahmoud S, Lee A, Paish E. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Abril; 132(2).
72. Thaunat O, Morelon E, Defrance T. Am^B-valent: anti-CD20 antibodies unravel the dual role of B cells in immunopathogenesis. *Blood.* 2010 Julio; 116(4).
73. Zhang Z, Zhu Y, Wang Z. Yin-yang effect of tumor infiltrating B cells in breast cancer: From mechanism to immunotherapy. *Cancer Lett.* 2017 Mayo; 393.
74. Sicard A, Koenig A, Graff-Dubois S. B Cells Loaded with Synthetic Particulate Antigens: A Versatile Platform To Generate Antigen-Specific Helper T Cells for Cell Therapy. *Nano Lett.* 2016 Enero; 16(1).
75. Marques R, Lorenzi N, Yokochi K. B lymphocytes can be activated to act as antigen presenting cells to promote anti-tumor responses. *PLoS One.* 2018 Julio; 13(7).
76. Colluru V, McNeel D. B lymphocytes as direct antigen-presenting cells for anti-tumor DNA vaccines. *Oncotarget.* 2016 Octubre; 7(42).
77. Tsuda B, Miyamoto A, Yokoyama K. B-cell populations are expanded in breast cancer patients compared with healthy controls. *Breast Cancer.* 2017 Diciembre; 25(3).
78. Zheng X, Turkowski K, Mora J. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. *Oncotarget.* 2017 Abril; 8(29).
79. Ruffell B, DeNardo D, Affara N. Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Febrero; 21(1).
80. Zamarron B, Chen W. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *Int J Biol Sci.* 2011 Mayo; 7(5).
81. King J, Mir H, Singh S. Association of Cytokines and Chemokines in Pathogenesis of Breast Cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017 Setiembre; 151.
82. American Cancer Society. What Is Cancer Immunotherapy? [Online].; 2016 [cited 2018 Octubre. Available from: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/what-is-immunotherapy.html>.
83. NobelPrize.org. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2018. [Online].; 2018 [cited 2018 Octubre. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/summary/>.
84. Vonderheide R, Domchek S, Clark A. Immunotherapy for breast cancer: what are we missing? *Clin Cancer Res.* 2017 Junio; 23(11).

85. Bertucci F, Gonçalves A. Immunotherapy in Breast Cancer: the Emerging Role of PD-1 and PD-L1. *Curr Oncol Rep*. 2017 Agosto; 19(10).
86. Yu LY, Tang J, Zhang CM. New Immunotherapy Strategies in Breast Cancer. *Int J Environ Res Public Health*. 2017 Enero; 14(1).
87. Li H, Zhao Y. Increasing the safety and efficacy of chimeric antigen receptor T cell therapy. *Protein Cell*. 2017 Agosto; 8(8).
88. Hortobagyi G. American Joint Committee on Cancer. [Online].; 2017. Available from: <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferencias/Pages/Breast-Cancer-Staging.aspx>.
89. Cserni G, Chmielik E, Cserni B. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch*. 2018 Mayo; 472(5).
90. American Society of Clinical Oncology. Cancer.net. [Online].; 2018 [cited 2018 setiembre. Available from: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-mama/estadios>.
91. Hortobagyi G, Connolly J, D'orsi C. Part XI: Breast. In *AJCC Cancer Staging Manual*. Chicago, Illinois; 2016. p. 589-636.
92. American Cancer Society. Breast Cancer Staging. 2009..
93. Society AC. Treating Breast Cancer. [Online].; 2018.
94. Tan T, Chan J, Kamis S, Dent R. What is the role of immunotherapy in breast cancer? *Chinese Clinical Oncology*. 2018 abril; 7(2).
95. Jungblut M, Oeltze K, Zehnter I, Hasselmann D, Bosio A. Standardized Preparation of Single-Cell Suspensions from Mouse Lung Tissue using the gentleMACS Dissociator. *Journal of Visualized Experiments*. 2009; 29(1266).
96. Radiological Society of North America. Stereotactic Breast Biopsy. [Online].; 2015. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/pruebas-de-deteccion-y-deteccion-temprana-del-cancer-de-seno/biopsia-del-seno/biopsia-del-seno-por-puncion-con-aguja-gruesa.html#referencias>.
97. Lozada-Requena , Iván , Nuñez C, Alvarez , Yubell. Lymphocyte subsets, dendritic cells and cytokine profiles in mice with melanoma treated with *Uncaria tomentosa*. *Rev. perú. med. exp. salud publica*. 2015 Octubre; 32(4).
98. Kahn L. Evaluación de poblaciones linfocitarias en el microambiente tumoral de ratones con melanoma tratados con *Uncaria tomentosa*. 2016..
99. Portal HI. Preparing a Single Cell Suspension from Either Frozen or Primary Tissue Samples. [Online].; 2013.
100. Booth J, Toapanta F, Salermo-Goncalves R, Patil S. Characterization and Functional Properties of Gastric Tissue-Resident Memory T Cells from Children, Adults, and the Elderly. *Front Immunol*. 2014 junio; 5(294).
101. eBioscience. Staining Cell Surface Antigens for Flow Cytometry. [Online].; 2013.
102. Tonon S, Goriely S, Aksoy E. Bordetella pertussis toxin induces the release of inflammatory cytokines and dendritic cell activation in whole blood: impaired responses in human newborns. *Eur. J. Immunol*. 2002 noviembre; 32(11).

103. Motulsky H, Brown R. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. [Online].; 2006. Available from: https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/reg_rout_method_outliers.htm?toc=0&printWindow.
104. Treilleux I, Blay J, Bendriss-Vermare N. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 noviembre; 10(22).
105. Kaewkangsan V, Verma C, Eremin J. Tumour-draining axillary lymph nodes in patients with large and locally advanced breast cancers undergoing neoadjuvant chemotherapy (NAC): the crucial contribution of immune cells (effector, regulatory) and cytokines (Th1, Th2) to immune-mediated tumour cell death induced by NAC. *BMC Cancer*. 2018 Febrero; 18(1).

Anexo 1: Tabla de pacientes sin cáncer

Código	Diagnóstico	Estado Civil	N° de hijos	Bebe alcohol	Fuma	Antecedentes familiares con cáncer
CAS	Tejido mamario con fibrosis y focal infiltrado inflamatorio crónico	Soltera	1	No	No	Sí
CZT	Mastitis crónica granulomatosa	Soltera	1	Sí	Sí	Sí
CAF	Mastitis crónica granulomatosa	Soltera	0	No	No	Sí
CAA	Mamografía negativa	Casada	2	No	No	No
EMP	Mamografía negativa	Soltera	2	No	No	No
GPG	Mamografía negativa	Casada	3	No	No	No

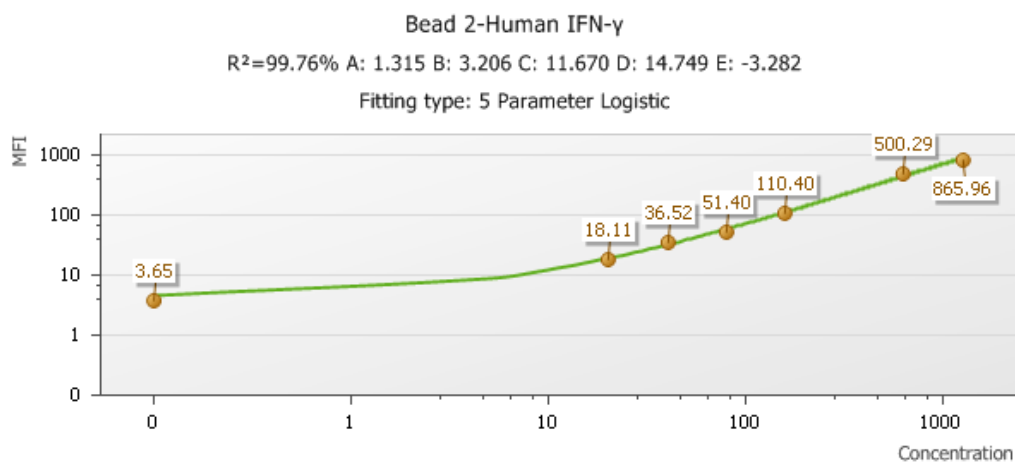
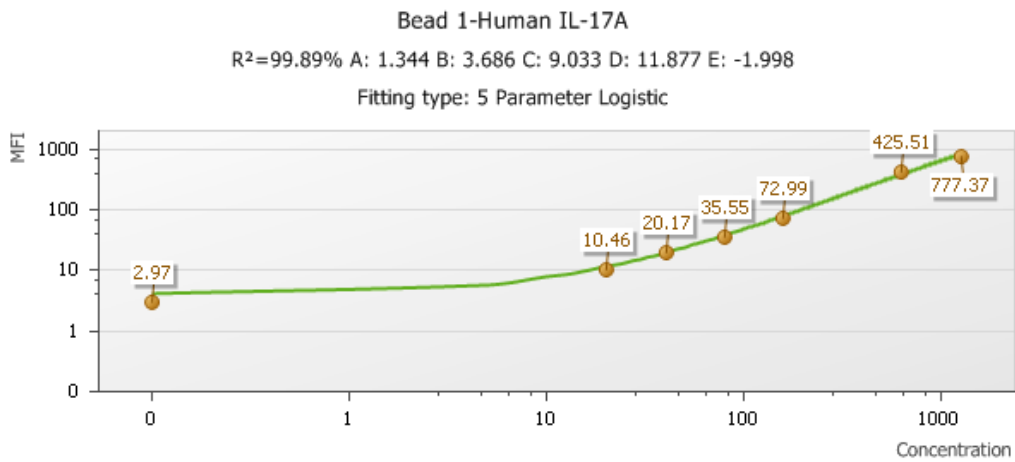
Anexo 4: Códigos y tipos de muestra

Código	Tipo de muestra	Estado Civil	N° de hijos	Bebe alcohol	Fuma	Antecedentes familiares con cáncer
MVM-3941 MVM3940	Tejido Sangre	Soltera	4	No	No	No
LQM-4024	Tejido Sangre	Soltera	1	No	No	Sí
AJM-4025	Tejido Sangre	Casada	2	Sí	No	Sí
MAC-4058 MAC-4057	Tejido Sangre	Viuda	5	Sí	No	No
CTC-4239	Tejido	Casada	2	No	No	Sí
IHV-4250 IHV-4251	Tejido Sangre	Casada	0	No	No	No
SPC-4253 SPC-4254	Tejido Sangre	Casada	2	No	No	Sí
BRS-4265 BRS-4266	Tejido Sangre	Soltera	5	No	No	No
ORM-4263 ORM-4264	Tejido Sangre	Conviviente	3	No	No	-
CAS-4311 CAS-4312	Tejido Sangre	Soltera	1	No	No	Sí
EAC-4316 EAC-4317	Tejido Sangre	Casada	1	No	No	Sí
DMC-4318 DMC-4318	Tejido Sangre	Soltera	8	No	No	No
NCM-4334	Tejido	Soltera	10	No	No	Sí
ECG-4350	Tejido	Conviviente	3	No	No	-

ECG-4349	Sangre					
CRT-4367	Tejido	Casada	1	No	No	Sí
CRT-4368	Sangre					
LGC-4374	Tejido	Casada	0	No	No	Sí
LGC-4375	Sangre					
CZT-4385	Tejido	Soltera	1	Sí	Sí	Sí
CZT-4387	Sangre					
MPA-4392	Tejido	Soltera	2	No	No	No
MPA-4393	Sangre					
CAF-4423	Tejido	Soltera	0	No	No	Sí
CAF-4424	Sangre					
ECA-4448	Tejido	Soltera	-	No	No	-
ECA-4447	Sangre					
LDZ-4485	Tejido	Casada	3	No	Sí	No
LDZ-4486	Sangre					
ECM-4492	Tejido	Viuda	13	No	No	Sí
ECM-4493	Sangre					
GVP-4494	Tejido	Soltera	-	No	No	No
GVP-4495	Sangre					

Anexo 5: Curvas de calibración para el análisis de citoquinas Th1/Th2/Th17

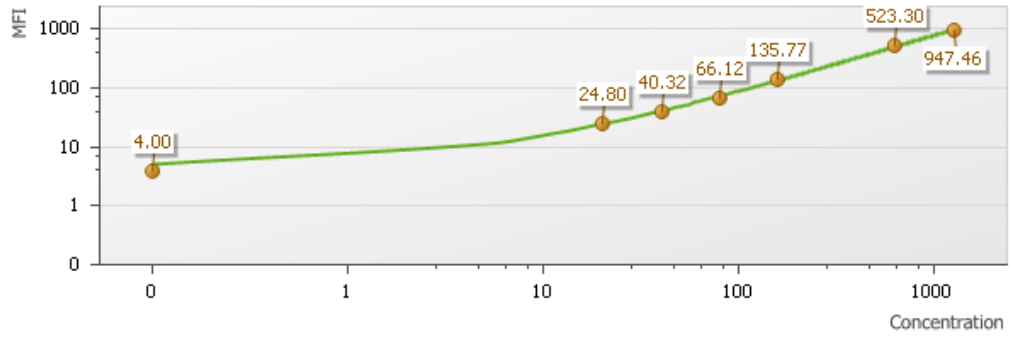
A continuación se muestran las curvas de calibración de cada una de las citoquinas:



Bead 3-Human TNF

R²=99.93% A: 0.844 B: 6.668 C: 21.888 D: 13.297 E: -14.559

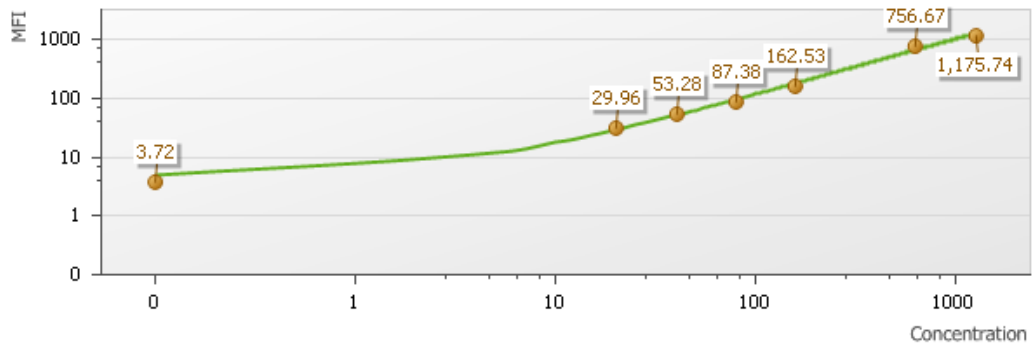
Fitting type: 5 Parameter Logistic



Bead 4-Human IL-10

R²=99.80% A: 1.203 B: 2.473 C: 11.488 D: 16.125 E: -2.575

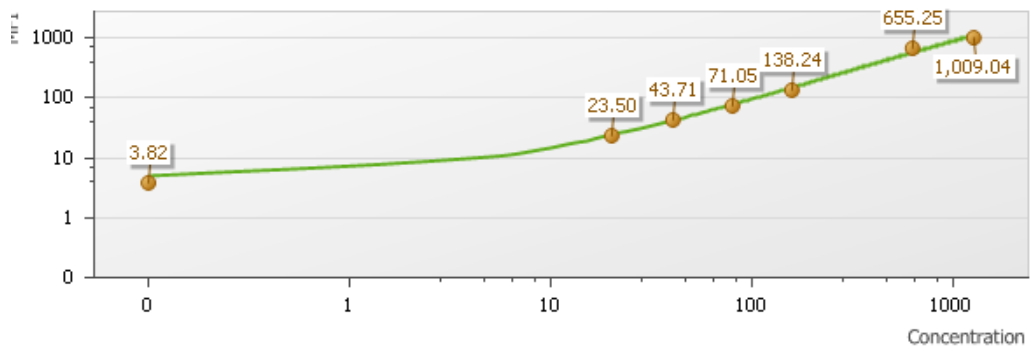
Fitting type: 5 Parameter Logistic



Bead 5-Human IL-6

R²=99.80% A: 1.290 B: 3.186 C: 11.074 D: 13.632 E: -3.432

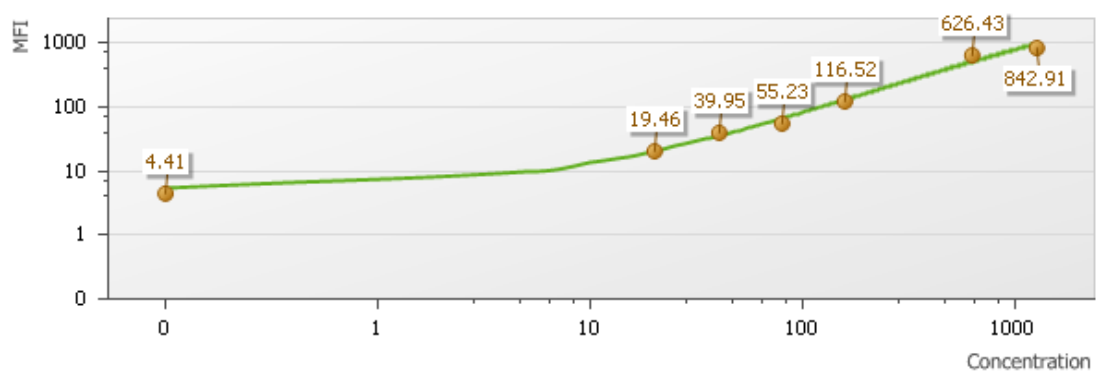
Fitting type: 5 Parameter Logistic



Bead 6-Human IL-4

R²=99.40% A: 1.568 B: 3.924 C: 9.892 D: 11.101 E: -3.334

Fitting type: 5 Parameter Logistic



Bead 7-Human IL-2

R²=99.90% A: 1.575 B: 1.955 C: 11.937 D: 21.437 E: -0.466

Fitting type: 5 Parameter Logistic

