

Universidad de Sevilla

Facultad de Medicina

**Departamento de Bioquímica Médica, Biología Molecular e
Inmunología.**



Tesis Doctoral

**ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA
INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA
AVANZADO.**

María Luisa Sánchez León

Sevilla 2021



Tesis Doctoral

**ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA
INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA
AVANZADO.**

DOCTORANDO

María Luisa Sánchez León

DIRECTORES

**Dr. Luis de la Cruz Merino
Dr. Víctor Sánchez Margalet**

Sevilla 2021



Tesis Doctoral

**ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA
INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA
AVANZADO.**

**Trabajo realizado para optar al grado de Doctora por
María Luisa Sánchez León**

V°B° por los Directores de Tesis

Dr. Luis de la Cruz Merino

Dr. Víctor Sánchez Margalet

Sevilla 2021

“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. ¡Pero qué importa! Hay que perseverar y sobre todo tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y sentir que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”.

Marie Curie.

Dedicatoria

A mis padres por su confianza infinita en mí, por creer incondicionalmente en todo lo que he hecho, hago y haré y además que conseguiré todo lo que me propongo, de eso no tienen la menor duda. El alcanzar mis metas se lo debo a ellos, por enseñarme en la vida que todo se consigue con esfuerzo. Gracias por todo lo que me habéis dado y donde he llegado, sin vosotros NADA hubiese sido posible. OS ADORO!.

A mi hermana, gracias por haber vivido conmigo siempre mis angustias y mis agobios para conseguir lo que quiero. Y gracias por haberme dado el tesoro más valioso de este mundo, mi PRINCESA!!.

Agradecimientos

El llegar hasta aquí no ha sido un camino de rosas, ni mucho menos, ha requerido un enorme esfuerzo por mi parte y por todo el equipo de grandes profesionales del que tengo la gran suerte de rodearme y que gracias a ellos mi sueño se ha hecho realidad. La investigación es mi gran pasión y por ello me he involucrado en esta gran aventura, con ello quiero aportar mi granito de arena en la investigación en cáncer de mama y ojalá en un futuro pudiésemos conseguir la cura de esta enfermedad que cada vez es más prevalente y a edades más tempranas y por la que aún fallecen en el mundo muchas mujeres. Sin más, sólo puedo comenzar con palabras de agradecimiento.

En primer lugar, agradecer a mi director de tesis, **Luis de la Cruz**, la oportunidad de haber desarrollado este proyecto con él, por ser mi referente en el campo de la Inmunología e Inmunoterapia del cáncer, por saber transmitir esa pasión por esta materia tan apasionante. Gracias por confiar en mí, por tus palabras siempre de ánimo y por tu apoyo. He aprendido muchísimo y espero seguir aprendiendo aún más. Gracias por contar conmigo.

Agradecer a **Víctor Sánchez**, su labor en la dirección de ésta tesis, por su gran trabajo, por sus palabras de apoyo y ánimo, persona fundamental para que éste proyecto haya llegado hasta aquí.

A las **PACIENTES**, las grandes y principales protagonistas de ésta aventura, que no dudaron en ningún momento en participar en este trabajo, a ellas doy las **GRACIAS** en mayúsculas, sin la participación de éstas grandes y maravillosas luchadoras, de las que aprendo todos los días lo que es superarse a uno mismo y luchar contra ésta dura enfermedad, ésta tesis doctoral no se hubiese podido llevar a cabo.

Carlos, gracias, gracias, gracias, por estar ahí siempre, cualquier día, hora, momento, esa infinita disponibilidad que te caracteriza, por escucharme, por tus consejos cada vez que lo he necesitado, sobre todo en esos días que tenía torcidos, que han sido muchos, ¡¡¡eres un grandísimo compañero!!!!, no cambies nunca.

Natalia, mil gracias por tu ayuda, por aportar tanto en este trabajo, por transmitirme tanta positividad, tanto ánimo, en esos momentos de bajón. Muchas gracias!!!!.

A mi **EQUIPAZO** de enfermeros de la Unidad de Ensayos Clínicos de Oncología del H.U.Virgen Macarena, **Marian , Edu, Irene y Rocío**, no sé cómo agradeceros la gran ayuda que me habéis prestado en este trabajo, sin esas muestras no hubiésemos llegado hasta aquí. Mil gracias por vuestra inmensa disponibilidad, porque siempre, en cualquier momento del día que os he llamado para la extracción, habéis estado ahí, facilitándome el trabajo...incluso llevando las muestras vosotros al laboratorio. Os quiero chic@s, sois unos maravillosos compañeros y profesionales.

A **Fernando Henao**, darle las gracias, como no podía ser de otra manera, porque desde el minuto uno estuvo dispuesto a ayudarme en el reclutamiento de las pacientes y por supuesto por ser uno de mis referentes en esta patología, del que aprendo mucho todos los días y es un gran apoyo para mí en el día a día dentro del Servicio de Oncología Médica del H.U.Virgen Macarena.

A todas mis compañeras de la Unidad de Ensayos Clínicos de Oncología, de Hospital de Día y del

Servicio de Radioterapia, del H.U. Virgen Macarena, que se prestaron a formar parte de la cohorte sana del estudio. Muchísimas gracias a todas!!!!.

A mis compañeros del Servicio de Oncología Médica, **Esteban Nogales, Juan Antonio Virizuela, Francisco Valdivia, Lourdes Sevilla, Mayka Álamo**, que me han mostrado su apoyo y su cariño durante ésta etapa que hemos vivido juntos.

A **Adoración Nieto**, por su colaboración en este trabajo y su apoyo personal.

A mis dos grandes amigas, **Sara y Bea**, por todo lo que me aportáis, desde el primer día que os conocí, sois fundamentales para mi, por todo ese cariño y fuerza que me dais. Os quiero infinito!!.

A **Roberto**, por su apoyo, cariño, paciencia y por creer en mi. Te quiero!.

¡GRACIAS a todos!!, porque sin cada uno de vosotros este proyecto no hubiese salido adelante.

Abreviaturas

ALDH 1: Aldehído Deshidrogenasa 1.

APC: Células Presentadoras de Antígenos.

BCSC: Breast Cancer Stem Cells.

CAF: Fibroblastos Asociados a tumor.

CD: Célula Dendrítica.

CSC: Células madre del cáncer o Cancer Stem Cells.

CSF: Factor Estimulante de Colonias.

CTL: Linfocitos T Citotóxicos.

CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (Cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen 4).

CXC: Quimiocinas.

DKK-1: Dickkopf -related protein 1.

EGFR: Receptor de crecimiento epidérmico humano.

EMT: Transición Epitelio Mesénquima.

ER: Receptor de estrógenos.

FOXP3: Forkhead box P3.

G-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos.

G-MDSC: Células supresoras de origen mieloide de tipo granulocítica.

GLI-1: Oncogen asociado a glioma.

HIF: Factor inducible de hipoxia.

HLA: Antígeno Leucocitario Humano.

HSC: Stem Cells Hematopoyéticas.

Hsp 72: Proteína de choque térmico.

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa.

IHC: Inmunohistoquímica.

IL: Interleucina o Interleuquinas.

IMC: Células Mieloides Inmaduras.

INF γ : Interferon γ .

i NOS: Óxido nítrico sintasa inducible.

LB: Linfocitos B.

LPS: Lipopolisacárido.

LT: Linfocitos T.

MAPK: Mitogen- activated protein kinasa.

MDSC: Células supresoras de origen mieloide.

M-MDSC: Células supresoras de origen mieloide de tipo monocítico.

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

NICD: Dominio intracelular de Notch.

NK: Células Natural Killer.

NO: Óxido Nítrico.

OPG: Osteoprotegerina.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PD-1: Programmed death -1.

PGE2: Prostaglandina E2.

PMN-MDSC: Células supresoras de origen mieloide de tipo polimorfonuclear.

PR: Receptor de progesterona.

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.

RT-PCR: PCR en tiempo real.

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription.

TAM: Macrófagos asociados a tumor.

TCR: Receptor de linfocitos T (T cell receptor).

Tfh: Linfocitos T foliculares.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β .

Th: Linfocitos T helper o efectores.

TiCS: Células iniciadoras de tumor.

TILs: Linfocitos infiltrantes de tumor.

TME: Microambiente tumoral.

Treg: Linfocitos T reguladores

ÍNDICE

<u>RESUMEN</u>	1
<u>Introducción</u>	
1. Epidemiología del cáncer de mama	4
2. El sistema Inmunitario y su papel en la patogénesis del cáncer de mama	7
2.1 <i>Células madre del cáncer o Cancer Stem Cells (CSCs)</i>	8
2.2 <i>Células mieloides supresoras (MDSCs)</i>	10
2.3 <i>Vías de señalización implicadas en la interacción de las MDSCs y las CSCs en cáncer de mama</i>	13
2.4 <i>Principales vías de señalización involucradas en la inmunidad y cáncer de mama</i>	15
2.4.1 Wnt/ β -catenina.....	15
2.4.2 Notch.....	25
2.4.3 Hedgehog.....	37
2.4.4 STAT 3.....	43
2.5 <i>Factores moleculares implicados en la patogénesis del cáncer de mama</i>	53
2.5.1 Factores de crecimiento.....	53
2.5.1.1 HER/ErbB.....	53
2.5.1.2 PDGF/PDGFR.....	54
2.5.1.3 TGF- β	55
2.5.1.4 VEGF/VEGFR-2.....	66

2.5.2 Citocinas inflamatorias e inmunoreguladoras asociadas al cáncer de mama....	68
2.5.2.1 Citocinas relacionadas con la respuesta tipo Th1.....	68
• IL-2/IL-2R.....	68
• INF γ /INF γ R.....	77
• IL-12.....	86
• TNF α	89
2.5.2.2 Citocinas relacionadas con la respuesta tipo Th2.....	94
• IL-6/IL-6R.....	94
• IL-1 α , β /IL-1R.....	97
• IL-10/IL-10R.....	102
• IL-4/IL-4R.....	106
• IL-13/IL-13R.....	109
• IL-5/IL-5R.....	112
2.5.3 Quimiocinas inmunoreguladoras asociadas al cáncer de mama.....	114
2.5.4 Factores de transcripción: Relación con el SI y el cáncer de mama.....	127
2.5.4.1 NF-kB y HIF: Implicación en la respuesta inmunitaria.....	129
2.5.4.2 HIF y su papel en cáncer de mama.....	137
2.5.4.3. NF-kB y su papel cáncer de mama.....	138

Hipótesis y Objetivos..... 142

1. Hipótesis..... 143

2. Objetivos..... 143

 2.1 Objetivos principales..... 143

 2.2 Objetivos secundarios..... 143

Metodología..... 146

1. Diseño del estudio..... 146

2. <i>Sujetos del estudio</i>	146
2.1 Pacientes.....	146
2.2 Población sana.....	147
3. <i>Materiales</i>	147
3.1 Determinaciones inmunológicas.....	148
3.2 Determinación de células supresoras de origen mieloide (MDSC).....	148
3.3 Determinación de los linfocitos T reguladores (Treg).....	150
3.4 Determinación de otras poblaciones linfocitarias.....	152
3.5 Determinación de otras poblaciones celulares.....	152
3.6 Determinación de antígenos de superficie OX40 y PD-1. Moduladores de la actividad de los linfocitos T CD4+ y CD8+.....	152
3.7 Otros reactivos.....	153
4. <i>Análisis por citometría de flujo</i>	153
5. <i>Análisis de datos</i>	154
5.1 Cálculo del tamaño muestral.....	154
5.2 Análisis estadístico	154
6. <i>Aspectos éticos</i>	155
6.1 Comité de Ética.....	155
6.2 Consentimiento Informado.....	155

Resultados.....	157
<i>1. Características principales de las poblaciones de estudio.....</i>	<i>158</i>
<i>2. Evaluación y comparativa de las diferentes poblaciones celulares.....</i>	<i>159</i>
2.1 Leucocitos totales.....	160
2.2 Neutrófilos	161
2.3 Monocitos.....	163
2.4 Linfocitos totales.....	164
2.5 Linfocitos T	165
2.6 Linfocitos B.....	167
2.7 Linfocitos NK.....	168
2.8 Linfocitos T CD4.....	168
2.9 Linfocitos T CD8.....	170
2.10 Linfocitos T reguladores.....	171
2.11 Células supresoras de origen mieloide (MDSC).....	173
<i>3. Estudio de las ratios celulares.....</i>	<i>177</i>
3.1 Ratio CD4/CD8.....	178
3.2 Ratio CD8/Treg.....	179
3.3 Ratio linfocitos/monocitos.....	180
3.4 Ratio neutrófilos/linfocitos.....	181

4. Expresión del biomarcador estimulador OX40 (CD134) en linfocitos T CD4+ y CD8+	183
4.1 Expresión de OX40+ en linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con CMA en comparación con la cohorte sana	183
4.2 Correlación de la respuesta al tratamiento con la expresión de OX40+ en linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con CMA.....	184
5. Expresión del biomarcador co-inhibidor, PD-1. Modulador negativo de la actividad de los linfocitos T CD4+ y CD8+.....	186
5.1 Expresión de PD-1 en linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con CMA en comparación con la cohorte sana.....	186
5.2 Correlación entre la respuesta al tratamiento y la expresión de PD-1+ en linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con CMA.....	187

Discusión..... 191

1. Perfil de respuesta inmune en sangre periférica inducido por tratamiento sistémico de primera línea.....	196
1.1 Células mieloides supresoras (MDSC).....	196
1.2 Linfocitos T reguladores (Treg)	200
1.3 Expresión de la molécula co-estimuladora OX40(CD134) en linfocitos CD4+ y CD8+ en pacientes con CMA tratadas en primera línea.....	203
1.4 Expresión de la molécula co-inhibidora PD-1 en linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con CMA tratadas en primera línea.....	205
1.5 Niveles en sangre periférica de las diferentes subpoblaciones celulares en pacientes con CMA tratadas en primera línea.....	208
A. Pacientes vs Cohorte sana.....	208
B. BC vs PE.....	209

Conclusiones.....	213
Bibliografía.....	216
Anexos.....	245
Actividades Científicas relacionadas.....	254

Introducción

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en la mujer en todo el mundo, siendo una de las neoplasias malignas con mayor incidencia, pero también la de mayor tasa de curación, considerando que entre un 80-85% de las pacientes se curan, aunque una proporción estimable de ellas, recurrirá en un estado avanzado de la enfermedad y morirá por causa de ésta.

El sistema inmunitario juega un papel dual en la biología del cáncer de mama, por un lado, favorece el crecimiento tumoral y por otro, media la erradicación del mismo. La relación entre el sistema inmunológico y el cáncer de mama depende de varios factores: la histología del tumor, el tamaño y la afectación ganglionar, así como una gran variedad de células, moléculas y sustancias químicas que forman parte del microambiente tumoral (del inglés "tumor microenvironment" TME). En este sentido aparece un nuevo término que se conoce como inmunoección del cáncer ("cancer immuno-editing"), un nuevo "hallmark" o señal de identidad del cáncer (Hanahan 2011).

Los tumores mamarios son considerados de baja inmunogenicidad y esto se debe a varios factores: expresión heterogénea de antígenos en el tumor primario o en la metástasis, modificaciones en el perfil antigénico durante la progresión, niveles bajos de expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC del inglés major histocompatibility complex) y liberación de citocinas supresoras. Además, la expresión de moléculas supresoras de la activación de las células T, como CTLA4 (del inglés cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) y PD-1 (del inglés programmed death-1). Todo ello puede actuar favoreciendo un microambiente tumoral supresor lo que favorece el escape de la vigilancia inmune. (Tower H.et al.,2019)

El microambiente tumoral está formado por un entramado celular, compuesto por células tumorales, células inmunes que participan en la respuesta inmune innata como las NK, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células supresoras de origen mieloide (MDSC) y células que participan en la respuesta inmune adaptativa, como los linfocitos T (Th1, Th2, Tregs, CTL), linfocitos B, células del estroma, endoteliales y epiteliales; moléculas y citocinas que integran el tumor y favorecen el crecimiento y la progresión tumoral. Todo este complejo, se comunica a través de una compleja red de vías moleculares, dando lugar a una respuesta inflamatoria crónica que

favorece tanto la iniciación como la progresión del tumor. Se crea así un microambiente inmunosupresor con baja expresión de antígenos, pérdida de moléculas coestimuladoras y del sistema MHC de clase I y con un aumento de moléculas inmunosupresoras como IDO, PD-1, CD39, CD73 y receptores de adenosina. En cuanto a la expresión de IDO, se ha visto recientemente que favorece el estado de inmunosupresión en pacientes con cáncer de mama y además con ganglios linfáticos positivos. Además, las MDSC producen citocinas supresoras como TGF β e IL-10. El TGF β estimula las metástasis óseas en pacientes con cáncer de mama y activa la transición epitelio-mesénquima, incrementando así la invasión tumoral. (S.D.Soyсал et al.,2015; L. de la Cruz-Merino et al.,2016)

El balance entre las señales inmunes inhibitoras y estimuladoras, es determinante para explicar el efecto final de anergia o activación del sistema inmunitario contra las células cancerígenas. La determinación de algunas poblaciones de células inmunes y de marcadores inmunológicos, es extraordinariamente relevante y lo más interesante es que se pueden detectar en sangre periférica sin necesidad de hacerlo en el tejido tumoral, lo cual pone de manifiesto la gran ventaja de la “biopsia líquida” sobre la biopsia de tejidos.

Tanto MDSC como los subtipos de linfocitos T, Treg, linfocitos TCD4+, linfocitos TCD8+ y otras subpoblaciones celulares pueden ser medidas en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama avanzado o metastásico.

Las MDSC constituyen una población heterogénea inmadura de células mieloides de estirpe monocítica y granulocítica con una amplia variedad de propiedades inmunosupresoras. Su papel en cáncer ha sido dilucidado en una gran cantidad de estudios donde se pone de manifiesto que un alto nivel de estas células en sangre periférica representa un mal pronóstico de la enfermedad. Los principales mecanismos por el que suprimen la respuesta inmune es por alteración del metabolismo de la L-arginina a través de la arginasa-1, por la vía de la iNOS que genera NO, promoción de la captación de cisteína, estimulación de Treg, producción de TAM-2 (del inglés tumor-associated macrophages type-2), inhibición de los linfocitos TCD8+ y de la función de las NK.

Las MDSC pueden ser detectadas en sangre periférica de pacientes con distintos tipos tumorales en estadios avanzados, principalmente. Pacientes con cáncer de mama presentan altos niveles de MDSC y más aún en estadios avanzados o metastásicos de la enfermedad. Por su gran heterogeneidad, su caracterización plantea todo un reto. En la actualidad, las MDSC son generalmente caracterizadas por citometría de flujo como CD45+CD3-CD19-CD20-CD56-CD16-HLADR-CD33+CD11b+, siendo CD14+ y CD15+ los marcadores que definen el linaje mielóide monocítico y granulocítico, respectivamente. (Bronte V. et al., 2015; Gabrilovich 2017).

Los Treg se generan tanto en el timo como en la periferia. En el timo, se generan a partir de las células T CD4+ que expresan altos niveles de CD25, que es la cadena α del receptor de la IL-2, mientras en la periferia se induce la expresión del factor de transcripción denominado Forkhead box P3 (FOXP3) en células T. Otros marcadores de los Treg son: GITR, miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral α inducido por corticoides, el CD11a, CD44, CD54, CD45RB, CD122, CD134, CD62L y CTLA-4, además de altos niveles de receptores de quimocinas y bajos niveles de CD127. Se han caracterizado dos tipos fundamentales de Treg: los linfocitos Treg naturales (nTreg) que se caracterizan por ser FOXP3+, se originan en el timo dependiente del reconocimiento de antígenos por el receptor de las células T y el correceptor CD28. Y los linfocitos Treg inducidos (iTreg), que se originan en los órganos linfáticos periféricos a partir de linfocitos vírgenes T CD4+CD25-FOXP3-. Ambos tipos están presentes en los linfocitos infiltrantes de tumor (del inglés tumor-infiltrating lymphocytes; TILs) y suprimen la respuesta inmune antitumoral en el microambiente. (T.L. Whiteside, 2014; Christina M. Paluskievicz et al., 2019)

En cáncer de mama, el nivel de Treg FOXP3+ es más alto durante el desarrollo de la enfermedad y está asociado a un pronóstico desfavorable con una disminución del tiempo a la progresión y de la supervivencia global. Además, existe evidencia de que la expresión de FOXP3+ es más alta en el tumor que en el tejido sano y se localiza en el citosol y no en el núcleo como en las células sanas. Esto se asocia con una mutación en el gen codificante de dicho factor de transcripción, el cual se asocia a proliferación celular y desarrollo de metástasis por la expresión del receptor para la quimocina CCL12 (CXCR4), que es un marcador para el desarrollo de metástasis en cáncer de

mama. (Jiafeng Shou et al.,2016)

Se ha encontrado también una alta expresión de citocinas supresoras como TGF β , IL-10 en el tumor mayor que en el tejido sano, lo cual puede asociarse con la agresividad del tumor y resistencia a la terapia.

Existen estudios en estadios tempranos de la enfermedad donde se ha visto altos niveles de CTLA-4 y FOXP3, esto sugiere que los Treg expresan receptores inhibidores CTLA-4 y PD-1 por lo que suprimen la respuesta inmune antitumoral y favorecen por lo tanto el crecimiento del tumor (Joshua P. Bates et al.,2018).

Es interesante resaltar que en cáncer de mama los Treg parecen estar inducidos por el estradiol, lo cual es importante para el proceso de carcinogénesis y se asocia además con la producción de VEGF. (Gaynor J. Bates et al.,2006)

En este trabajo, nos hemos centrado en analizar los niveles de MDSC en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama avanzado tanto en estado basal como a lo largo del tratamiento de primera línea. Hemos comparado estos resultados entre el grupo que obtuvo beneficio clínico vs progresión de la enfermedad. Se han analizado también otras subpoblaciones celulares como los Treg y los linfocitos TCD4+ y CD8+, además de las moléculas co-estimuladoras (OX40+) y co-inhibidoras (PD-1+), expresadas por estas células. Hemos incluido una cohorte de 20 mujeres sanas sin antecedentes oncológicos como grupo control.

1.Epidemiología del cáncer de mama

Según el último informe disponible dentro del proyecto GLOBOCAN 2018, a nivel mundial se estiman 18.1 millones de nuevos casos de cáncer al año y 9.6 millones de muertes por esta enfermedad. Su incidencia por continentes es mayor en Asia con un 48.4% y un 53% de muertes, le sigue Europa con un 23.4% de incidencia y 20.3 % de muertes, América con un 21% de incidencia y 14.4 % de muertes, África con un 7.3% de incidencia y 5.8% de muertes y finalmente Oceanía con un 1.4% de incidencia y 0.7 % de muertes.

Por sexos, en el hombre se diagnostica en mayor proporción el cáncer de pulmón, siendo así mismo el que mayor letalidad ocasiona, seguido del cáncer de próstata y colorrectal en incidencia y del cáncer de hígado y estómago en el número de muertes. (GLOBOCAN 2018)

En la mujer, sin embargo, es el cáncer de mama el más frecuente a nivel mundial y el que causa el mayor número de muertes, seguido del cáncer colorrectal y de pulmón en cuanto a incidencia y mortalidad, respectivamente. (GLOBOCAN 2018)

El cáncer de mama se considera un problema de salud pública a escala mundial. En este sentido, se estima que 2.1 millones de casos de cáncer de mama fueron diagnosticados en 2018, a 1 de cada 4 mujeres, se le diagnosticó cáncer de mama (Bray et al.,2018). Es la enfermedad más frecuentemente diagnosticada en 154 países de 185 y es la que más muertes provoca en mujeres en más de 100 países. En este aspecto hay que hacer excepciones, como en el caso de Australia/Nueva Zelanda, Norte de Europa y Norte América donde le preceden en frecuencia las muertes por cáncer de pulmón, y en el África Subsahariana donde las muertes se deben principalmente a cáncer de cérvix, debido a las elevadas tasas de este tipo de tumor.

La tasa de incidencia más alta por cáncer de mama, la encontramos en: Australia/Nueva Zelanda, Norte de Europa (Reino Unido, Suecia, Finlandia y Dinamarca); Este y Oeste de Europa (Bélgica, Holanda y Francia); Sur de Europa (Italia) y Norte América (Figura 1).

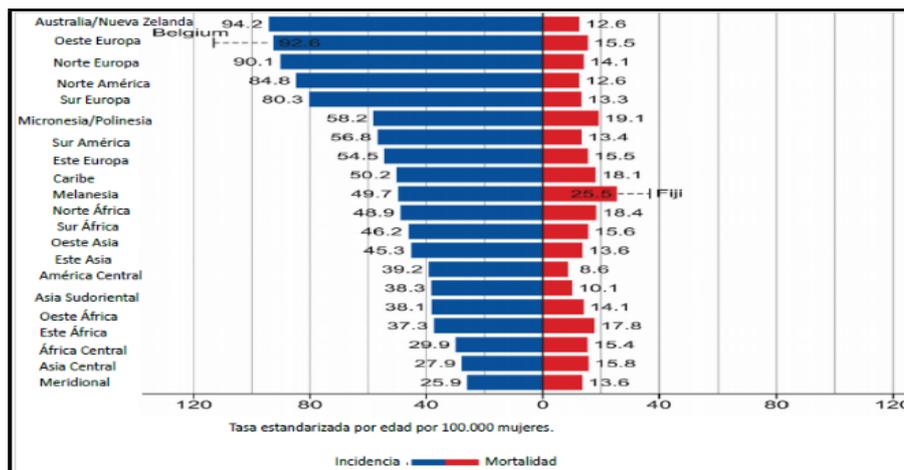


Figura 1. Tabla de Incidencia y Mortalidad en diferentes regiones estandarizadas por edad para cáncer de mama 2018.
Fuente: GLOBOCAN 2018. (Adaptada de GLOBOCAN 2018)

Si nos fijamos en la Figura 1, en términos de mortalidad, podemos observar que no hay mucha variabilidad en las diferentes zonas del mundo a las que hace referencia, aunque hay que hacer distinción en Melanesia, concretamente en Fiji, es el país del mundo con mayor tasa de mortalidad por esta patología.

En España la incidencia en cáncer de mama para el año 2018, fueron de 32.825 nuevos casos. En 2012 se diagnosticaron 25.215 nuevos casos, por lo que entre 2012 y 2018 ha habido un incremento en la incidencia del 30%. Se estimó con ello que 1 de cada 8 mujeres en nuestro país desarrollaría un cáncer de mama. (GLOBOCAN 2018, ECIS-European Cancer Information System 2018 e Informe SEOM 2018)

Según el informe de SEOM para 2019, estimaba 32536 nuevos casos diagnosticados de cáncer de mama en nuestro país. La mortalidad por esta causa en 2018, fue de 6421 pacientes, por lo que la prevalencia de esta enfermedad a 5 años es de 129.928.

En el sexo femenino, los tumores responsables del mayor número de muertes en España son el de mama (+1.6%) y el de pulmón (+6.4%), este último debido al aumento del hábito tabáquico en las mujeres.

En términos generales, la mortalidad en nuestro país por cáncer ha disminuido en los últimos años. Esto se debe a las campañas de diagnóstico precoz y los avances terapéuticos, entre otras causas. Por lo tanto, la supervivencia en cáncer, en términos generales en nuestro país, es similar a las de otros países europeos, un 53% a 5 años. (Informe SEOM 2019)

En Andalucía según los datos facilitados por el Observatorio de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), en su informe anual para el año 2018, podemos conocer los datos de incidencia, prevalencia y mortalidad por cáncer de mama en esta comunidad, desglosado por provincias y rango de edad.

- **Incidencia**: El total de casos nuevos diagnosticados fueron de 5.572. Por provincias: Sevilla 1282; Málaga 1098; Cádiz 817; Granada 618; Córdoba 550; Jaén 442; Almería 425 y Huelva 341. Por intervalo de edad: 15-39= 411; 40-44= 453; 45-49= 609; 50-54= 725; 55-59= 707; 60-64= 606; 65-69= 516; 70-74= 481 y +75 años= 1064 casos.

*Fuente de datos: Incidencia : GLOBOCAN 2018; Población: Padrón continuo del INE.

- **Prevalencia** a los 5 años: La tasa total de prevalencia en Andalucía es de 22.005. Por provincias: Sevilla 5056; Málaga 4337; Cádiz 3224; Granada 2445; Córdoba 2182; Jaén 1753; Almería 1666 y Huelva 1342. Por intervalo de edad: 15-39= 1166; 40-44= 1487; 45-49= 2229; 50-54= 2993; 55-59= 2919; 60-64= 2533; 65-69= 2208; 70-74= 2194 y +75 años= 4276.

*Fuente de datos: Fallecidos: Estadística de defunciones según causa de muerte del INE ; Población: Padrón continuo del INE.

- **Mortalidad**: El número total de casos de fallecimiento por cáncer de mama en nuestra comunidad es de 1094. Por provincias: Sevilla 261; Málaga 219; Cádiz 186; Granada 127; Córdoba 103; Almería 75; Huelva 63 y Jaén 61. Por rango de edad: 15-39= 29; 40-44= 49; 45-49= 49; 50-54= 104; 55-59= 98; 60-64= 88; 65-69= 86; 70-74= 109 y +75 años= 482 muertes.

*Fuente de datos: Mortalidad: Estadística de defunciones según causa de muerte. Población: Padrón continuo del INE.

En nuestra área sanitaria, Hospital Universitario Virgen Macarena, según los datos facilitados por la Unidad de Mama (Servicio de Ginecología y Obstetricia), en el año 2018, se diagnosticaron 335 casos, de los cuales 119 procedían del Programa de detección precoz (PDP) del cáncer de mama (Servicio Andaluz de Salud). Esta cifra supone que el 37% del total de las pacientes diagnosticadas

procedían del PDP.

El intervalo de edad de las pacientes fue: < 40 años= 9.09%; 40-50 años= 29.07%; 50-70 años= 53.60% y > 70 años= 11.20%.

Según el informe anual de las cifras del cáncer en España, que elabora la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) para el año 2020, se estima que el número de nuevos casos irá en aumento hasta alcanzar aproximadamente 29.5 millones de casos al año en 2040. Para estimar las cifras de incidencia, prevalencia y mortalidad a nivel mundial los datos han sido proporcionados por el Global Cancer Observatory (GCO) elaborado por la International Agency for Research on Cancer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que recoge los datos de GLOBOCAN junto con otras bases de datos.

Los datos de incidencia recogidos a nivel nacional los ha elaborado la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). Los de mortalidad, el Instituto Nacional de Estadística (INE) y los de prevalencia se han obtenido por GLOBOCAN.

En España, el cáncer es una de las principales causas de morbi-mortalidad. El número estimado de nuevos casos para el año 2020 será de 277.394. Los más frecuentemente diagnosticados serán colon y recto (44.231 casos); próstata (35.126); mama (32.953); pulmón (29.638) y vejiga (22.350). En mujeres los más frecuentes serán mama, colon y recto. (Informe SEOM 2020).

Otra información epidemiológica interesante procede de los datos que estima la Organización Mundial de la Salud (OMS) en cuanto al número total de nuevos casos de cáncer de mama a nivel mundial, para el periodo 2018 al 2040 (Figura 2), así como el número de muertes a nivel mundial por esta causa (Figura 3).

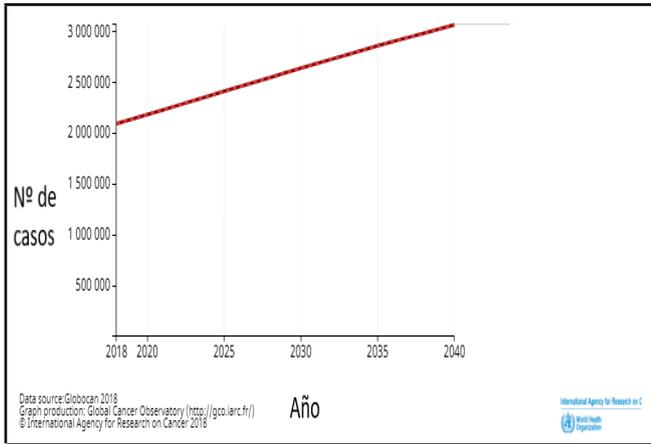


Figura 2. Incidencia mundial de cáncer de mama desde 2018-2040. (Adaptada de GLOBOCAN 2018).

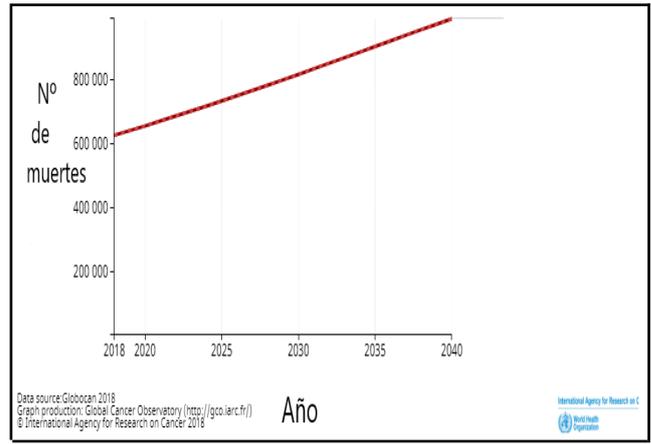


Figura 3. N.º de muertes a nivel mundial por cáncer de mama desde 2018-2040. (Adaptada de GLOBOCAN 2018).

2.El Sistema Inmunitario y su papel en la patogénesis del cáncer de mama.

El Sistema Inmunitario desempeña un doble papel en el desarrollo del cáncer de mama, por un lado promueve la formación tumoral a través de mecanismos de inflamación crónica, que es reconocida en la actualidad como un nuevo hallmark del cáncer y por otro previene la tumorigénesis a través de la vigilancia inmunológica. (Douglas Hanahan et al., 2011).

La respuesta inmune al cáncer se caracteriza por ser innata y adaptativa. La respuesta inmunitaria innata, también llamada inmunidad natural o nativa, se caracteriza por ser la primera línea de defensa frente a antígenos extraños o daños originados en nuestro organismo. Es una respuesta rápida y poco específica, además es iniciadora y estimuladora de la respuesta adaptativa. Los principales componentes de esta son: 1) Las barreras físicas y químicas, como el epitelio y las sustancias químicas antimicrobianas producidas en el mismo. 2) Fagocitos (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas, células NK, células linfoides innatas, entre otras. 3) Componentes sanguíneos solubles presentes en sangre como el sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación. En épocas anteriores se consideró que la respuesta inmune innata no generaba memoria, hoy día se habla de “trained immunity” o inmunidad entrenada, como una forma de memoria de la inmunidad innata. (López Martín JA et al., 2018; A.K. Abbas et al., 8ª edición).

La respuesta inmunitaria adaptativa, se diferencia de la respuesta innata, en que es mucho más específica y va dirigida a antígenos específicos y además genera memoria, por lo que responde de forma más rápida a una exposición repetida ante el mismo antígeno. El tiempo para generar esta respuesta es mayor comparado con el de la respuesta innata ya que se llevan a cabo una serie de procesos más complicados con la consiguiente generación de receptores y células de gran especificidad para eliminar el antígeno. Existen dos tipos de respuesta inmunitaria adaptativa que son la inmunidad humoral y la inmunidad celular.

Los componentes de la inmunidad humoral son los linfocitos B, que secretan anticuerpos y la inmunidad celular está integrada por los linfocitos T (helper y citotóxicos). (López Martín JA et al.,

2018; A. K. Abbas et al., 8ª edición).

A partir de estudios experimentales se han descubierto las vías de señalización relacionadas con el sistema inmunitario y su implicación en la etiopatogenia del cáncer de mama. Estas vías de señalización alteradas implican a las células iniciadoras de tumores (TICs), a las células madre cancerosas (CSCs), a las vías y moléculas implicadas en la evasión inmune y en el crecimiento y progresión tumoral. Estas vías pueden servir para la predicción del resultado clínico y de respuesta a los tratamientos o las que están implicadas en la resistencia a quimioterapia. Así mismo, gran parte de estas rutas están relacionadas con el origen del cáncer de mama y la evasión inmune.

2.1 Concepto de Células Madre del Cáncer o Cancer Stem Cells (CSCs) en cáncer de mama.

En 1977, Hamburger y Salmon, mencionan por primera vez la existencia de un subconjunto de células cancerosas denominadas Células Madre TumORAles, ahora denominadas Células Madre Cancerosas o también conocidas como Cancer Stem Cells (CSC), que pueden conducir a la formación de un tumor (Figura 4).

Este grupo investigador también define a estas CSCs como una subpoblación limitada de células iniciadoras de tumores (TICs) definidas como células cancerosas que conservan un amplio potencial de autorrenovación y tienen la capacidad de recrear la heterogenicidad del tumor primario (M. Zhang et al.,2017). Para dar veracidad a esta idea de Hamburger y Salmon, años más tarde en 1997 Bonet y Dick definen unas células iniciadoras de leucemia, concretamente en la Leucemia Mieloide Aguda (AML). Esta idea es apoyada por Michael Clarke y colaboradores en modelos de tumores sólidos (cerebro, mama, hígado, páncreas, melanoma y colon).

Con todo esto, no es hasta el año 2003 cuando se reportan los primeros estudios confirmatorios por Al-Hajj y colaboradores, que identificaron un subconjunto de células tumorales de cáncer de mama (CSCs) utilizando, por un lado ratones inmunodeficientes a los que le inocularon tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama (modelos de xenoinjerto) y por otro, muestras

tumorales directamente de pacientes.

Tanto las muestras tumorales extraídas de ratones como las que habían tomado directamente de las pacientes, las sometieron a la técnica de FACS (Clasificación de células activadas por fluorescencia).

Para poder aislar esas células iniciadoras de tumor (CSCs), utilizaron marcadores de superficie CD44 y CD24. Una vez aislaron estas células CSCs, las inocularon en el tejido graso mamario de ratones inmunodeprimidos y observaron el crecimiento tumoral a partir de ellas.

A partir de aquí, se han seguido realizando investigaciones sobre el papel que juegan las CSCs en el desarrollo del cáncer de mama y de otros tumores, por diferentes grupos de investigadores y sus colaboradores.

Estas investigaciones sugieren que la expresión de los biomarcadores CD44 (receptor de ácido hialurónico) CD24 (glicoproteína marcador similar a la mucina de la superficie celular) y ALDH1 (Aldehído Deshidrogenasa 1) es el método más preciso para identificar CSCs a partir de poblaciones de cáncer de mama. Las CSCs que expresan los fenotipos CD44+ CD24 (-/bajo) y ALDH1(alto), enzima responsable de la oxidación de los aldehídos intracelulares, parecen tener distintos niveles de diferenciación y muestran un potencial tumorigénico más alto en ratones NOD/SCID (ratones diabéticos no obesos con inmunodeficiencia combinada severa que tienen mutaciones en la cadena gamma del receptor de IL-2 [Il2rg(-/-)]), no presentan células B ni T ni natural killers (NK). Este modelo murino se ha convertido en el más adecuado para aumentar la detección de células de melanoma tumorogénicas in vivo. (Luis Fernando Tume Farfán, 2014)

Recientemente se ha sugerido que la actividad enzimática de la ALDH es una característica medible de las CSCs mediante el ensayo de Aldeflúor®. ALDH1 y ALDH3 son, de las 19 isoformas de la ALDH expresadas en humanos, las que se creen responsables de la actividad de las CSCs. (Luis Fernando Tume Farfán, 2014).

El fenotipo más común que expresan las CSCs de cáncer de mama es CD44+/CD24-, estas expresan niveles altos de factores proangiogénicos en comparación con las que expresan el fenotipo CD44+/CD24+. Liu et al. (2007) ya habían identificado CSCs de mama que expresaban los biomarcadores EpCAM (moléculas de adhesión epitelial) y CD44, y tenían ausencia del CD24. Las células madre de cáncer de mama (BCSC), están involucradas en la iniciación, crecimiento y recurrencia del cáncer de mama. Los micro-RNA (mi-RNA), son RNA pequeños no codificantes formados por 19 a 23 nucleótidos, regulan la expresión génica a nivel postranscripcional y están involucrados en la progresión del cáncer. Éstos mi-RNA ejercen efectos sobre las características de las BCSC mediante oncogenes o genes supresores de tumores. Xuemei F. et al., 2017, realizaron un estudio referente a la implicación de los mi-RNA en las funciones de las BCSC, como la formación, autorrenovación y diferenciación pudiendo inhibir la invasión y metástasis de las BCSC. Este estudio pretende arrojar una mayor comprensión de la relación de los mi-RNA y de las BCSC para poder identificar nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento del cáncer de mama.

La transición epitelio-meséquima (EMT) se lleva a cabo por interconversión regulada por mi-RNA. Las CSCs que son similares a las células que forman parte de la EMT están la mayor parte de ellas en reposo, expresan marcadores de CSCs como CD24-, CD44+, CD49f o integrina $\alpha 6$ (glicoproteína transmembrana tipo I) (Paul H. Krebsbach et al., 2017) y son EpCAM-.

La EMT se caracteriza por la continua autorrenovación y la expresión de marcadores de las CSCs, ALDH, EpCAM+, CD49f+. Hay una subpoblación de células que expresan CD24-, CD44+ y ALDH estas representarían las células en la transición de los dos estados. (Y. Wang et al., 2011; Luis Fernando Tume Farfán, 2014; K.T. Yeung, 2017).

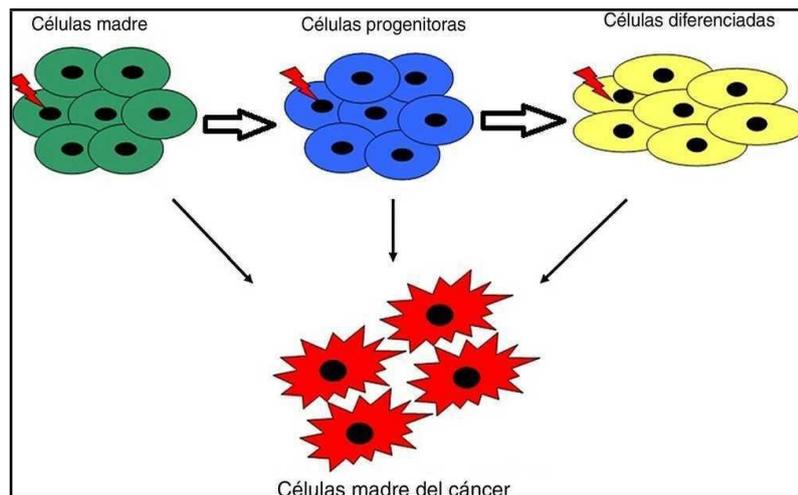


Figura 4. Modelo del origen de las Células madre del cáncer (CSCs).- Las mutaciones acumuladas en células madre, progenitoras y diferenciadas dan lugar a la formación de CSCs, las cuales han perdido la capacidad de regular su propia división celular, de ahí que sean responsables tanto de la iniciación, del crecimiento como de la invasión tumoral (metástasis). Inmunología 2014.

2.2 Células Mieloides Supresoras (MDSC)

Las MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) derivan de progenitores mieloides comunes. Su formación parece estar gobernada por los mismos factores de crecimiento que controlan el proceso de mielopoyesis en la médula ósea, como son el factor de crecimiento de colonias de granulocitos -macrófagos (GM-CSF), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor de estimulación de colonias de macrófagos. (Gabrilovich, 2017; Camilla Rydberg, 2017; S. Ostrand-Rosenberg et al., 2018).

En ciertas condiciones patológicas como el cáncer, las infecciones, las enfermedades autoinmunes, la sepsis, entre otras, (F. Veglia et al., 2018), se ha visto una elevación de los factores estimulantes de colonias (CSFs) que estimulan el proceso de mielopoyesis y compensan la demanda de células mieloides. Además, en estas situaciones puede haber una expansión de células mieloides inmaduras (IMC) desde la médula ósea al torrente sanguíneo y es aquí donde se convierten en células mieloides (MDSC) con características inmunosupresoras (Bond Almand et al., 2001; Camilla Rydberg et al., 2017).

Existe una hipótesis sobre la generación de las MDSC propuesta por Gajthilovich et al., conocida como el “modelo de las dos señales”. Según este modelo, se genera una primera señal en las stem cells hematopoyéticas (HSC), mediada por la vía de STAT3 y estimulada por factores de crecimiento (GM-CSF, G-CSF), citocinas (IL-6) y la prostaglandina E2 (PGE2), que moviliza a las células mieloides inmaduras (IMC) desde la médula ósea. A esta primera señal, le sigue una segunda señal activadora mediada por el factor de transcripción NF-κB que a su vez es estimulado por factores pro-inflamatorios como PGE2, LPS (lipopolisacárido abundante en la membrana externa de las bacterias gram negativas, potente estimulador de la respuesta inmune), Hsp 72 (proteína de choque térmico perteneciente a la familia de las HSP70), IL-1 (secretada por los macrófagos para combatir infecciones) e IFNγ (interferón, molécula secretada por los glóbulos blancos para combatir las infecciones y otras enfermedades como el cáncer) (Figura 5).

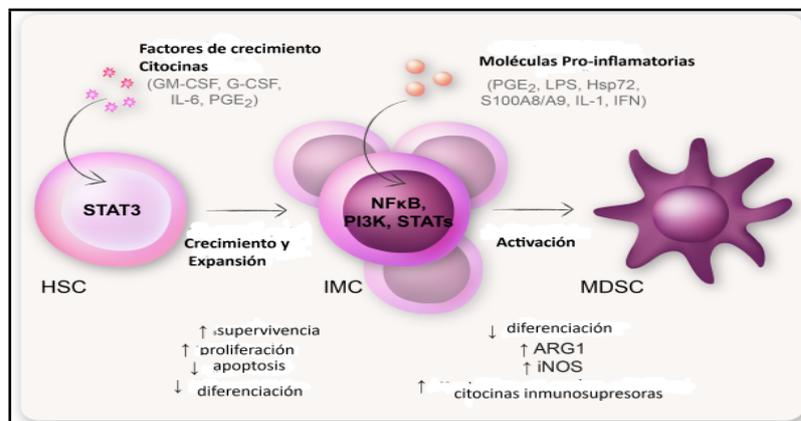


Figura 5: Generación de MDSCs según el modelo de las dos señales. Oncotarget 2017. (Adaptada de Camilla Rydberg et al.)

Según esta hipótesis, para dar lugar al fenotipo supresor de MDSC, las IMC adquieren una señal de activación para ello. Esto ocurre en la médula ósea donde se expanden y migran a sangre periférica como MDSC.

Las MDSC, se caracterizan por ser una población heterogénea, definida por su morfología, fenotipo superficial y sus funciones. Se definen dos grandes grupos de MDSC: un grupo tiene morfología y fenotipo de superficie típico de monocitos (M-MDSC) y el otro grupo se define por

presentar morfología y fenotipo de granulocitos (G-MDSC), también conocidas como polimorfonucleares (PMN-MDSC). (V. Bronte et al., 2016; Camilla Rydberg et al., 2017; Gabrilovich 2017; S. Ostrand-Rodenberg et al., 2018; Caroline Bergenfelz et al., 2020)

Las primeras investigaciones sobre MDSC se hicieron en ratón ya que fueron aisladas por primera vez en estos animales de experimentación. En cuanto a los fenotipos de superficie existen algunas diferencias con los humanos. En ratón, las MDSC son caracterizadas como Gr1+CD11b+. Existen dos subtipos que se distinguen por la expresión de Ly-6C y Ly-6G, las M-MDSC cuyo fenotipo de superficie es CD11b+Ly6ChighLy6G- y las G-MDSC (PMN-MDSC) que expresan CD11b+Ly6ClowLy6G+.

En humanos, las M-MDSC son caracterizadas por el fenotipo de superficie CD11b+CD14+CD33+HLA-DR-/low y las G-MDSC se caracterizan por el fenotipo CD11b+CD15+CD33+Lin-HLA-DR-/low . (V. Bronte et al., 2016; Camilla Rydberg 2017; Gabrilovich, 2017; Caroline Bergenfelz et al., 2020).

Las MDSC, se distinguen por su perfil inmunosupresor de la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos. La subpoblación M- MDSC, ejerce su carácter inmunosupresor actuando sobre los linfocitos T y las células NK, a través de la vía del NO (óxido nítrico)/iNOS, citocinas supresoras (IL-6, IL-10) y la PGE2. Ésta subpoblación se caracteriza por su alta plasticidad y potencial de diferenciación, de ahí que se hayan convertido en objetivo terapéutico potencial en el tratamiento del cáncer (E. Tcyganov et al., 2018). Mientras que la subpoblación G-MDSC, actúa inhibiendo a las células T por producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Ambas subpoblaciones expresan una enzima inmunosupresora, la Arginasa1 (ARG1). (Camilla Rydberg, 2017; Gabrilovich 2017; S. Ostrand-Rosenberg et al., 2018).

Otras funciones que se han descrito para las MDSC residen en la inducción de los Treg, modulación de la producción de citocinas por parte de los macrófagos y además tienen otras funciones protumorales de carácter no inmune como son la promoción de angiogénesis y metástasis debido a la producción de factores angiogénicos y proteasas en el tejido tumoral. (Gabrilovich, 2017).

J. Jan et al.,(2017), estudian las funciones del factor plaquetario 4 (PF4) o CXCL4, es producido por un subtipo de células mieloides Ly6G+ CD11b+. Ellos observaron que mientras los niveles de éstas células aumentaban en los pulmones pre-metastásicos, el nivel de expresión de PF4 disminuía en éstas células. Por lo tanto, en pacientes con cáncer la expresión de PF4 se correlaciona negativamente con el estadio del tumor y positivamente con la supervivencia del paciente.

2.3 Vías de señalización implicadas en la interacción de las MDSC y las CSC en cáncer de mama.

Para confirmar la correlación entre las MDSC con las CSC en cáncer de mama, se han desarrollado estudios, en los cuales se han utilizado modelos animales y muestras tumorales de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama. Se han analizado, tanto mecanismos moleculares como celulares involucrados en dicho proceso. Se constata que niveles elevados de MDSC en sangre periférica están asociados a un mal pronóstico de la enfermedad y que las CSC son responsables de la progresión tumoral y de la resistencia a los tratamientos quimioterápicos (A. Eguiara et al.,2012).

Según estos estudios, parece que las MDSC afectan al comportamiento biológico de las CSC. Para llegar a esta conclusión, se prepararon cultivos de células MDSC humanas con MCF-7 (línea celular de cáncer de mama) y se obtuvieron los siguientes resultados (Peng et al.,2016)

- a. La presencia de las MDSC promueve la formación de esferas a partir de la línea celular MCF-7. Estos ensayos de formación de esferas estiman el potencial de las células de cáncer de mama para comportarse como célula madre con alta capacidad de autorrenovación.
- b. Las MDSC aumentan el número de células de cáncer de mama stem cells que expresan ALDH⁺, estas se determinaron por FACS.
- c. Las MDSC estimulan la expresión de genes asociados a las CSC como son: OCT3-4, SOX2, NANOG y HIF1A. Estos fueron cuantificados por real-time PCR (RT-PCR).

Otro experimento llevado a cabo para ver la relación entre las MDSC y las CSC, fue directamente a partir de tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama. Por inmunohistoquímica se cuantificaron las células que expresaban CD33⁺ y las que expresaban ALDH⁺. Se observó que la mediana de células que expresaban CD33⁺ (MDSC) se correlacionaba positivamente con el número de células que expresaban ALDH⁺ (CSC). (Dongjun Peng et al., 2016)

Finalmente para evaluar la interacción entre las MDSC y las CSC, se utilizó el modelo de xenoinjerto, con hembras de ratón NOD-SCID IL2R γ , a las que se inoculó en tejido subcutáneo, células MDSC humanas junto con MCF-7 y a las que se les administró pellets de 17 β -estradiol. Se observó que las MDSC aceleraban la progresión tumoral y además en este modelo murino incrementaban la formación de tumores mamarios (Dongjun Peng et al., 2016).

Otro punto de asociación entre ambos tipos celulares es la relación con la transición epitelio-mesénquima (EMT), de modo que las CSC están ampliamente asociadas a este fenómeno. De igual manera las MDSC aumentan la expresión de genes asociados a EMT, lo cual pudo constatarse mediante técnicas de Western Blott y de Inmunofluorescencia (Dongjun Peng et al., 2016).

Con todo ello parece existir un vínculo biológico y clínico relevante entre las MDSC y las CSC en pacientes con cáncer de mama.

Las vías de señalización implicadas en la relación de las MDSC con las CSC, son las vías de STAT3 y NOTCH. Peng et al., en su trabajo de 2017, demostraron que las MDSC inducían a las CSC a través de ambas vías de señalización. Para ello diseñaron varios experimentos. Co-cultivaron líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 con MDSC. Comprobaron por Western Blot, que las MDSC inducían la fosforilación de la vía STAT3 en la célula tumoral.

Además vieron que la vía NOTCH era activada por las MDSC en la línea celular MCF-7, ya que se mostraba una alta expresión de genes de transcripción como NOTCH2, NOTCH3, CHERP, HEY1 y HEY2, esto se analizó por RT-PCR. También estaba aumentada la expresión del dominio intracelular de NOTCH (NICD), lo que se determinó por Western Blot.

Para demostrar la hipótesis, de que las MDSC activaban las vías de STAT3 y NOTCH, probaron a bloquear ambas vías en un cultivo de líneas celulares de cáncer de mama con MDSC y observaron que había además una disminución de los niveles de CSC (ALDH⁺) inducido por las MDSC.

Este dato indicaba que las MDSC activaban las vías de STAT3 y NOTCH e inducían a las CSC de cáncer de mama. Los niveles celulares de CSC se analizaron por FACS (Peng et al., 2017).

También estudiaron la activación de ambas vías de señalización a través de la IL-6 y del NO. La IL-6 se ha propuesto como activadora por fosforilación de la vía de STAT3 asociada al desarrollo tumoral. Peng et al., sugirieron finalmente que las MDSC pueden promover a las CSC a través de la activación de la vía STAT3 que a su vez es activada por la IL-6.

Las MDSC también parecían inducir a las CSC por activación de la vía NOTCH, lo cual se lleva a cabo por las especies reactivas del óxido nítrico (NO) (Peng et al., 2017)

Con estos resultados concluyen, que las MDSC en cáncer de mama, contribuyen a activar a la vía STAT3 de forma persistente y potente y con ello promueven al mantenimiento de un pool de CSC que además favorecería la metástasis a distancia a largo plazo.

Por lo tanto, todos estos estudios ponen de manifiesto que existe evidencia de un cross-talk entre las MDSC y las CSC en pacientes con cáncer de mama. De esta manera, se podría actuar farmacológicamente tanto sobre las MDSC como sobre las CSC, pudiéndose revertir la inmunosupresión de las MDSC y por otro la resistencia a los fármacos quimioterápicos.

2.4 Principales vías de señalización involucradas en la patogenia del cáncer de mama.

Las vías de señalización más relevantes que controlan las propiedades de las CSC en el desarrollo del cáncer de mama son: Wnt/ β -catenina, Notch, Hedgehog y STAT 3.

2.4.1 Vía de señalización Wnt/ β -catenina está involucrada en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de la homeostasis de tejidos adultos controlando numerosas funciones celulares, como la proliferación, la capacidad de autorrenovación, supervivencia y diferenciación celular (Logan and Nusse, 2004; MacDonald et al., 2009; Clevers and Nusse, 2012; Clever et al, 2014; Sedgwick and D'Souza-Schorey, 2016). La mutación o disfunción de dicha vía, está relacionada con el desarrollo de diferentes enfermedades como diabetes tipo II, Parkinson's, Alzheimer, y particularmente en cáncer. (Figura 6)

Esta vía a su vez se divide en 3 sub-vías: canónica, no-canónica/polaridad celular planar (del inglés planar cell polarity) (PCP) y no-canónica Wnt/Calcio. La activación de la vía canónica requiere de un ligando de Wnt que se une a la familia de receptores Frizzled y al co-receptor LRP5/6 (del inglés low density lipoprotein receptor-related protein 5/6), esto conduce a la fosforilación de la proteína Dishevelled (Dvl), que ejerce una regulación negativa sobre el complejo de degradación de la β -catenina, reclutando a otra proteína llamada Axin, inhibiendo así la interacción con otros componentes que forman parte del complejo de degradación. Con esto, la β -catenina queda libre en el citoplasma, pasa al núcleo donde activa genes de transcripción asociados a la vía de señalización de Wnt y se asocia tanto con factores de transcripción TCF/Left1 como a moléculas co-activadoras CBP (del inglés cyclic AMP response element-binding protein) y p300. Cuando esta vía se encuentra desactivada, disminuyen los niveles de β -catenina debido a la actuación del complejo formado por el gen supresor de tumores APC (del inglés Adenomatous Polyposis Coli), la proteína Axin y dos quinasas CK1 α (del inglés casein kinasa 1 α) y GSK-3 β (del inglés glycogen synthase kinase 3 β).

Las quinasas fosforilan a la β -catenina en varios residuos de serina y treonina en el extremo N-terminal. La β -catenina fosforilada es reconocida por la β -Transducin, ésta forma parte de un complejo de ubiquitina ligasa, lo que favorece la poli-ubiquitinación y la consecuente degradación de la β -catenina en el proteosoma (Y. Duchertre et al.,2016; N. Krishnamurthy et al.,2018).

La vía no canónica es iniciada por un tipo de ligando Wnt5a (Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a y Wnt11). Los ligandos de tipo Wnt5a, generan las vías de polaridad celular planar (PCP) o la vía Wnt/Calcio (Semenov et al., 2007; Liu et al., 2016), regulan la polarización y migración celular.

Estos ligandos Wnt, son reconocidos por los receptores Frz/ROR/RYK (Green et al., 2014). Ambas vías, tanto la canónica como la no canónica, regulan funciones celulares como supervivencia, apoptosis, proliferación, decisión en el destino celular, motilidad celular y reordenamientos del citoesqueleto. Un estudio reciente, sugirió que RYK podría estar implicado en la regulación del desarrollo de las NK de manera temporal y además se observó que la autorrenovación de las células madre hematopoyéticas en ratones deficientes en RYK estaba disminuida, en comparación con el grupo control, con lo que se indicó un nuevo papel de este receptor en la hematopoyesis.

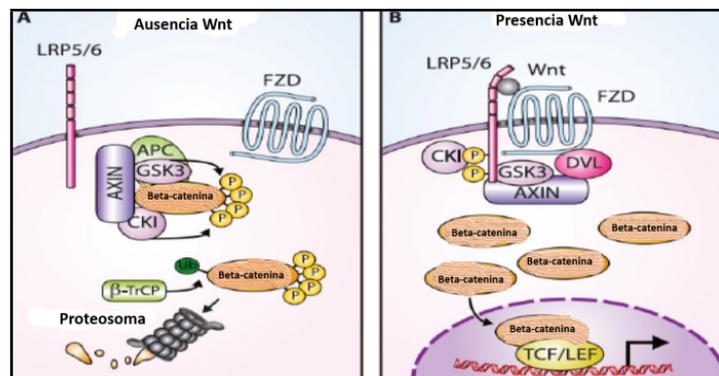


Figura 6. Resumen de la vía de señalización Wnt/β-catenina. British Journal of Pharmacology (2017). (Adaptada de Michael H Kagey and Xi He)

La vía de señalización Wnt juega un papel importante en la biología de las células mieloides M. (Haseb et al., 2019).

*Células dendríticas (CD): Participan en la respuesta adaptativa de forma selectiva. Tanto la vía Wnt como la vía de señalización Notch, promueven la diferenciación de este tipo celular tanto en modelos murinos como en humanos.

En estudios realizados con ratones, se ha reportado que la vía de la β -catenina media tolerancia inmunogénica en las CD, esto se debe a la expresión de la IL-10 y enzimas que metabolizan la vitamina A y que cooperan con otras moléculas de señalización PI3K/AKT, TLR, MAPK, Fas y PLC γ 2. Y otro mecanismo implicado en ello, lo hace a través de la E-cadherina (S.G.Pai et al., 2017 ; Wook-Jin Chae et al., 2018).

Un estudio realizado en ratones con melanoma, reportó que la tolerancia inducida mediada por las CD es a través de Wnt5a y se observó que esto impedía la eficacia de la inmunoterapia. En este estudio, Wnt5a, desencadena la oxidación de ácidos grasos en las CD a través de la vía de la β -catenina y PPAR γ , esto induce la tolerancia en estas células y promueve la generación de Treg. Inhibiendo la vía de la β -catenina en las CD, observaron que mejoraban los resultados de la respuesta a la inmunoterapia anti-PD1, utilizando la línea celular de melanoma BrafV600E Pten-/-, lo que sugiere que los ligandos Wnt, parecen ser una diana prometedora en la inmunología del cáncer. (Wook-Jin Chae et al., 2018).

Se han desarrollado estudios utilizando líneas celulares para el desarrollo de tumores en ratones, la EL4 (timoma murino), B16F10 (melanoma), entre otras y se observó que la pérdida del receptor LRP5/6 en las CD inducía mayor inmunidad antitumoral ya que generaba menos expansión de Treg y a su vez aumentaba las funciones de las células TCD8+ por aumento de granzima B, TNF α y expresión de INF γ . Con estos resultados, se pone de manifiesto que las CD son cruciales en la respuesta al tratamiento con inmunoterapia ya que modulan las respuestas a los LT (Wook-Jin Chae et al., 2018).

**Macrófagos asociados a tumor (TAM):* Los macrófagos se caracterizan por ser una población celular multifuncional y heterogénea. Se pueden originar a partir de células embrionarias dentro de un tejido o bien derivarse de las HSC a partir del linaje mielomonocítico. Sus funciones son como fagocitos, APCs, moduladores de la respuesta innata y adaptativa, remodelación de tejidos y participan en la inflamación. Adoptan dos fenotipos diferentes, con funciones diferentes, también.

Existen dos vías de polarización: los macrófagos M1, son proinflamatorios y antitumorales y son

activados por el INF γ y el lipopolisacárido. Llevan a cabo la respuesta inmune innata contra patógenos intracelulares.

Los receptores TLR, en concreto el TLR4, en los M1 desencadenan la activación de NF-kB, AP-1 y STAT1 y promueven la liberación NO y citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF α , IL-12, IL-6, INF γ y quimocinas CCL2 y CXCL10. Los M2, secretan citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF β . Protegen contra el daño tisular causado por la inflamación y promueven la reparación y remodelación tisular. Regulan de forma negativa la respuesta inmunitaria y están implicados en procesos de angiogénesis.

Los TAM, son importantes componentes del microambiente tumoral y tienden a adquirir el fenotipo M2. Diferentes estudios han demostrado que los TAM, pueden originarse a partir de macrófagos tisulares residentes o de monocitos infiltrantes de tumor. Utilizando muestras de pacientes y modelos animales revelan que los TAM, pueden promover el crecimiento tumoral ya que favorecen la angiogénesis, la remodelación de la matriz extracelular, proporcionando un nicho de CSC, favoreciendo así la invasión y metástasis.

Además, un alto número de TAM están asociados a un pobre pronóstico por su asociación con la invasión y la angiogénesis, suprimiendo la respuesta inmune adaptativa antitumoral.

En el subtipo basal-like de cáncer de mama, se asocian a un pobre pronóstico.

Tanto en modelos murino como en humanos, la expresión de Wnt7b en los TAM, favorece la angiogénesis y la metástasis pulmonar mediada por macrófagos. También se ha observado una alta expresión de Wnt7b en tumores mamarios humanos y se asoció con la presencia de TAM. En el modelo murino MMTV-PyMT, la inhibición del gen Wnt7b en células mieloides, dio como resultado la reducción tanto de la masa como del volumen tumoral mamario (J.Zhan et al., 2010).

Otros ligandos como Wnt5a en macrófagos se asocian a inflamación en sepsis, cáncer, obesidad y aterosclerosis. Aunque es posible que no siempre tengan este papel pro-inflamatorio en la lesión o

reparación de tejidos ya que se ha reportado que podría inducir macrófagos de tipo inmunosupresor. Wnt5a inhibe la diferenciación al fenotipo M1 por inhibición de la vía NF- κ B, mientras induce la producción de citocinas inmunosupresoras IL-10 y TGF β , dando lugar al tipo M2. En resumen, los estudios proponen que cuando se inducen los ligandos Wnt en macrófagos, pueden desempeñar funciones reparadoras en la lesión y reparación de tejidos, aunque no de forma universal. Por lo tanto, hacen falta más estudios para evaluar los mecanismos por los que actúa cada ligando y componente de esta vía de señalización para poder comprender sus roles en los macrófagos y si son específicos o no (Wook-Jin Chae et al., 2018)

*Linfocitos T (LT): El papel de las proteínas de la vía de señalización Wnt ha sido estudiado en el desarrollo y función de las células T, ya que esta vía es importante durante la timopoyesis. Hay estudios que proponen que la vía canónica Wnt puede desempeñar un papel vital en la biología de las células T. La actividad transcripcional del factor de células T (TCF) está inducida por asociación directa con la β -catenina y está formado por cuatro miembros: TCF1, TCF3, TCF4 y LEF1. TCF fue nombrado así por el papel que ejerce en el desarrollo de las células T y en la proliferación de los timocitos (Jorg van Loosdregt et al., 2018; Wook-Jin Chae et al., 2018).

El TCF1 está formado por dos isoformas, tanto la isoforma corta como la larga, poseen un grupo de motilidad alta. En modelos murinos se ha observado que tanto TCF1 como LEF1 son esenciales en el desarrollo temprano de los timocitos. Después de la selección positiva, ambos factores de transcripción interactúan con la β -catenina para ayudar a la diferenciación celular CD4CD8 doble positivo, en células T CD4+ con expresión positiva de Th-POK (regulador transcripcional del desarrollo de los LTCD4). Mientras, el desarrollo de las células TCD8+ está mediado por la interacción entre Runx3 y TCF1 y el silenciamiento del gen Cd4. Estudios en ratones han revelado también, que TCF1 y LEF1 son esenciales para establecer la identidad de las células TCD8 con actividad intrínseca HDAC, reprimiendo Cd4, Foxp3 y Rorc, esto sugiere una función novedosa de ambos factores de transcripción (Jorg van Loosdregt et al., 2018).

Dentro de los LTCD4+, se ha descubierto en un modelo murino con infección crónica por LCMV, que tanto las células Th1 de memoria como las Thf de memoria, dependen de las isoformas largas

del TCF1. Además, TCF1 puede inducir la isoforma Gata3-1b para favorecer la diferenciación de los Th2, parece ser que la deficiencia en TCF1 afecta al desarrollo de este tipo celular. En otro estudio con sangre de cordón umbilical humano, se observó que las células TCD4 naïve por acción de Wnt3a, se diferencian a Th2 a través del organizador de la cromatina SATB1 y de la β -catenina (Wook- Jin Chae et al., 2018).

También en modelos preclínicos, se ha observado que TCF1 y LEF1 participan en la diferenciación a Thf, manteniendo la expresión de IL-6R α y gp130. Esto a su vez facilitó la expresión del factor de transcripción Bcl6 de células Thf. En un estudio con ratones se desarrolló un tumor del tipo TRP (proteína relacionada con la tirosina), donde se logró el rechazo del tumor transfiriendo células Th17 específicas de TRP a ratones receptores. Estas células Th17 erradicaron el tumor de forma eficiente, eran de larga vida y tenían una firma molecular de células madre que se asemejaba a células T CD8+ de memoria, que expresaban altos niveles de proteínas Wnt, β -catenina y TCF7.

Parece ser que Wnt5a afecta a la migración de los LT. En un ensayo de quimiotaxis in vitro, la quimocina CXCL12 induce la expresión de Wnt5a en los LTCD4+. Según esto, los ligandos Wnt y las proteínas Wnt pueden regular la diferenciación de las células T, sus funciones efectoras y en algunos casos la migración (Wook- Jin Chae et al., 2018)

Los Treg, son un subconjunto importante de LTCD4+, que se generan tanto en la periferia (pTreg), como en el timo (tTreg). El TCF1 parece que regula de forma negativa en el timo la generación de los tTreg, un estudio mostró que la función de las células Treg, podría ser inhibida por agonistas de Wnt, como Wnt3a, en condiciones de inflamación en un modelo murino de colitis mediada por LT y en sangre de pacientes con artritis reumatoide.

La APC es un regulador negativo de la vía Wnt- β -catenina, la ablación específica de este regulador en las células Treg dio como resultado un fenotipo autoinmune con esplenomegalia y la mutación APC/Min+ en Treg alteró su función supresora promoviendo la tumorigénesis intestinal en ratones e implicando así a APC en el desarrollo y función de los Treg. (N. Krishnamurthy et al., 2017).

El factor de transcripción FOXP3 es esencial para el desarrollo y función de los Treg. Si analizamos el mecanismo molecular de la vía Wnt en estas células, se observa que TCF1 y FOXP3 se unen cerca del sitio de transcripción de una gran cantidad de genes. Según estos datos, en un modelo donde eliminemos esta vía, FOXP3 sería el regulador dominante de estos genes ya que TCF1 no sería activado por la β -catenina (Wook-Jin Chae et al., 2018)

En los linfocitos TC_{CD8+}, la vía de señalización Wnt tiene un gran papel en la generación de las células TCD8+ de memoria, que median las respuestas secundarias a la invasión de patógenos. Parece que TCF1 y LEF1 en el timo están implicados en el desarrollo de estas células de memoria, ya que TCF1 aumenta la expresión de la eomesodermina que a su vez mejora la expresión de IL-2R β , que es fundamental para el mantenimiento de estas células de memoria. Se ha reportado que se puede aumentar la estabilidad de la β -catenina tras la estimulación con TCR. La estimulación del TCR después de la infección primaria podría activar a TCF1 y posteriormente promover la generación de las células TCD8+ memoria. Además, se ha demostrado que las células TCD8+ efectoras con alta expresión de la vía Wnt produjeron mejor respuesta de memoria en comparación con las que demostraron una baja expresión de esta vía. También se ha revelado que los LTCD8+ con una alta expresión de TCF1, después de una infección, estaban menos agotados, menos diferenciados y mostraban tanto mayor supervivencia como mayor tasa de proliferación, en comparación con las que tenían una baja expresión de este factor de transcripción (Wook-Jin Chae et al., 2018; Jorg van Loodsdregt 2018).

Tiemesen y colaboradores, utilizaron ratones Axin2-LacZ y demostraron que la actividad de señalización Wnt es más baja en en las células CD8+ efectoras en comparación con las de memoria y esto además se correspondía con una baja expresión de TCF1.

Con todo esto, sería interesante conocer en qué forma TCF1 funciona como un factor de transcripción β -catenina independiente y si los niveles de este sólo regulan la diferenciación hacia célula efectora o de memoria, esto queda aún por determinar. Además, podríamos comprender mejor las señales extracelulares que regulan la expresión de TCF1 en las células TCD8+ vírgenes.

(Figura 7).

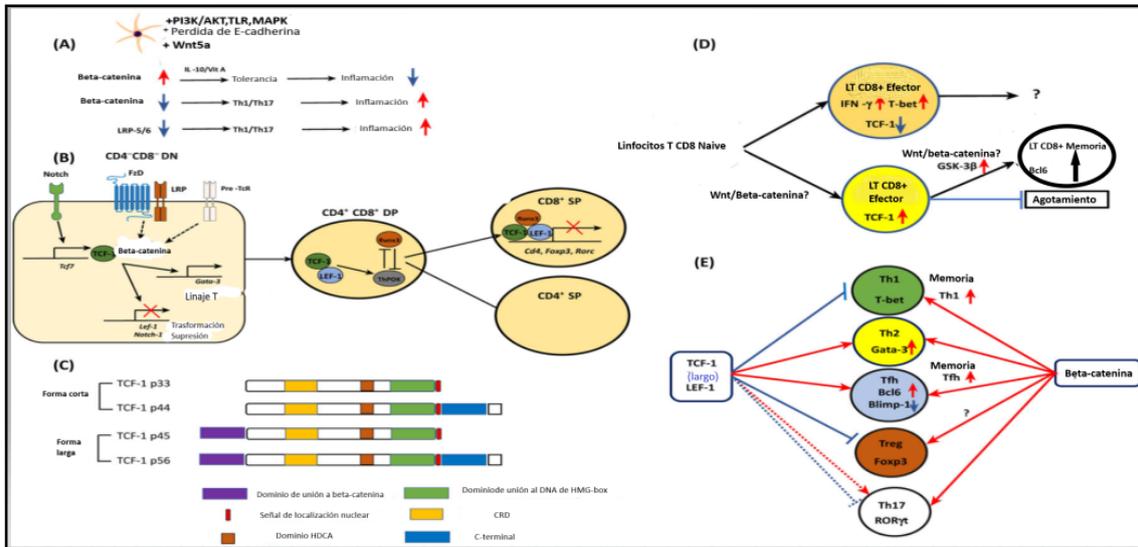


Figura 7. Papel de la vía Wnt en las células T y Células Dendríticas (DC s) en ratón y humanos. Trends Immunol 2018. (Adaptada de Chae and Bothwell).

Se ha descrito la mutación o aberración de esta vía como responsable del desarrollo de algunos tumores debido a que afecta al comportamiento de las CSC. Particularmente, la vía Wnt juega un papel crítico en la regulación de las células madres/progenitoras de la glándula mamaria(Charlota L.et al.,2007). Existe una fuerte evidencia que sugiere que la activación defectuosa de esta vía induce la formación de tumores de mama a partir de células madre progenitoras y ejerce su efecto oncogénico a partir de la activación mediada por LRP5/6 (del inglés low-density lipoprotein receptor) de la β-catenina y la vía de m-TOR (Yann Duchertre et al., 2016).

Se han realizado estudios con retrovirus aviar para introducir oncogenes en un pequeño subgrupo de células somáticas mamarias transformando a las células madres progenitoras, con lo cual esto demuestra que estas células son susceptibles a la transformación oncogénica. Esta vía se ha propuesto como un potente driver en el desarrollo de las metástasis óseas en cáncer de mama, concretamente la vía de señalización intracelular IL1β-NF-kB/CREB-Wnt, ya que favorece la colonización ósea por las stem cells tumorales (Rachel Eyre et al., 2019)

Se ha caracterizado un efector negativo de la vía Wnt/ β -catenina en las células tumorales, conocido como Dickkopf-related protein 1 (DKK1), pertenece a una familia de cuatro miembros (DKK1-4).

DKK1 es esencial en el desarrollo embrionario humano. Durante la embriogénesis, DKK1 es secretado y se une a los receptores LRP5/6, bloqueando así la interacción con la proteína Wnt, esto hace que la β -catenina sea degradada en el citoplasma y no pase al núcleo, con lo cual se para la expresión de genes asociados al factor de transcripción TCF (Bafico et al., 2001; Mao et al, 2001; Semenov et al.,2001). Este mecanismo de acción de DKK1 es importante para el desarrollo de la cabeza y de las extremidades (Glinka et al, 1998 ; Mukhopadyan et al, 2001).

La vía Wnt está hiperactivada en cáncer, DDK1 se le propuso como un supresor tumoral ya que inhibía esta vía, induciendo apoptosis, inhibiendo el crecimiento, la proliferación, la invasión y la angiogénesis (Lee et al.,2004; Maehata et al., 2008; Mikheev et al., 2008; Qiao et al., 2008; Hirata et al., 2011; Kim et al., 2012; Menezes et al., 2012; Qi et al., 2012). Paradójicamente, Mazon et al., 2016, relacionan a DKK1 con la promoción del cáncer ya que favorece el crecimiento tumoral. Kimura y colaboradores, 2016, confirman esto, ya que según ellos para promover el crecimiento del tumor se une al receptor CKAP4, ésta proteína interactúa con PI3K, así que al unirse a DKK1, activa la vía AKT, lo cual favorece la proliferación celular y el crecimiento.

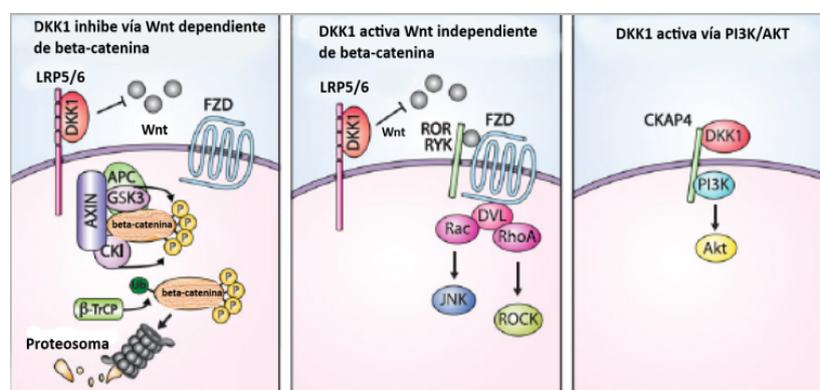


Figura 8. Vías de señalización reguladas por Dickkopf (DKK1). British Journal of Pharmacology (2017). (Adaptada de Michael H. Kagey and Hi Xe).

Hay grupos de investigación centrados en el estudio de la relación entre DKK1 y cáncer de mama ,

ellos han llegado a la conclusión, que puede ser un indicador pronóstico y diagnóstico de la enfermedad (W. Sun et al., 2019). Esto coincidía con tumores hormono-resistentes que se caracterizan por un peor pronóstico (M-A Forget et al., 2007).

Los niveles de expresión de DKK1 y de β -catenina han sido estudiados en muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama invasivo y están ampliamente relacionados sobre todo con el estadio tumoral y la afectación ganglionar. Por tanto, DKK1 se ha propuesto como biomarcador pronóstico en cáncer de mama (M-A Forget et al., 2007; Wenkai Sun et al., 2019).

En un trabajo llevado a cabo por el grupo de Guojun Bu et al., 2008, demostraron que la activación de la vía Wnt/ β -catenina y el aumento de expresión de DKK1 eran característico en las células tumorales de cáncer de mama. Además, observaron en líneas celulares de cáncer de mama, las cuales forman metástasis óseas osteolíticas, también mostraban alta expresión de esta vía y de DKK1. Parece ser que existe un vínculo entre DKK1 y los tumores de mama que dan lugar a metástasis óseas osteolíticas secundarias.

Recientemente, se ha demostrado en modelos murinos que DKK1 envía señales a las MDSC a través de la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina promoviendo así el crecimiento tumoral. Actúa favoreciendo la acción inmunosupresora de las MDSC, ya que facilita la producción de las especies reductoras del oxígeno (ROS) y suprimiendo la proliferación de los linfocitos T CD4+.

Aunque los mecanismos de acción de DKK1 no están completamente caracterizados, es cada vez más evidente que modula vías de señalización tanto en cáncer como en células del sistema inmune, promoviendo así el crecimiento tumoral y la metástasis. (Figura 9)

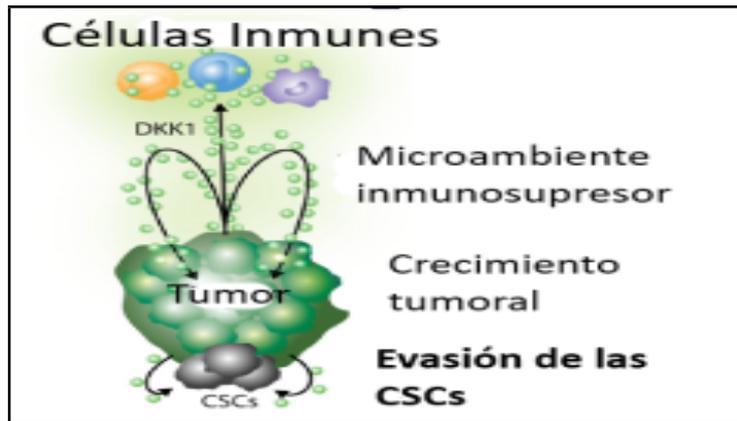


Figura 9. DKK-1 promueve la actividad cancerígena enviando señales a la célula tumoral y a las células inmunes, resultando un microambiente inmunosupresor, crecimiento tumoral, metástasis y evasión de las stem cells (CSC). British Journal of Pharmacology (2017) (Adaptada de Michael H. Kagey and Xi He).

2.4.2 Vía de señalización Notch Es una vía altamente conservada y crítica en la regulación de muchos procesos del desarrollo y en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. La desregulación de esta vía se asocia con el desarrollo de enfermedades autoinmunes y el cáncer (Chris Siebel et al., 2017).

En la última década se ha hecho evidente la participación de esta vía en los sistemas hematopoyético e inmunológico, participando en el desarrollo de células madre embrionarias hematopoyéticas e influyendo en la decisión del linaje a células linfoides y mieloides. Además, se ha puesto de manifiesto que esta vía es un importante modulador de la respuesta inmune mediada por células T (F. Radtke et al., 2010; Chiara F. et al., 2016).

Se caracteriza por una familia de cuatro receptores (Notch1- Notch4) y al menos cinco ligandos pertenecientes a las familias Delta y JAG/Serrate (DSL): JAG1, JAG2, Delta-like (DII-1, DII-3 y DII-4). Estos ligandos se dividen en diferentes grupos según la composición de su dominio. Los ligandos canónicos DSL (JAG1, JAG2 y DII1), son clasificados como proteínas de superficie celular tipo I y las proteínas Delta y OSM-11-like, conforman otro dominio que se denomina DOS, compuesto por repeticiones muy especializadas en tandem de EGF (epidermal growth factor) y motivos de EGF. Los otros subtipos que componen el dominio DSL, DII3 y DII4, carecen de los motivos EGF. Ambos

grupos de ligandos, tanto DSL como DOS, son cruciales para la unión al receptor (Janghorban et al.,2018)

El receptor Notch se genera en el retículo endoplásmico (RE) y es transportado a la membrana plasmática donde interacciona con el ligando de la célula adyacente, esto genera la escisión proteolítica del receptor llevada a cabo por una ADAM metaloproteasa, llamada TACE (TNF α converting enzyme) seguida del complejo α -secretasa, se libera el grupo carboxilo (COOH) terminal del receptor y el dominio intracelular de Notch (NICD o NIC) se trasloca al núcleo celular donde interacciona con una familia de factores de transcripción que se conocen por las siglas CSL, integrada por RBP-Jk (inmunoglobulina kappa J o CBP1/Su (H) Supresor of Hailess en *Drosophila*/Lag-1. (Figura 10)

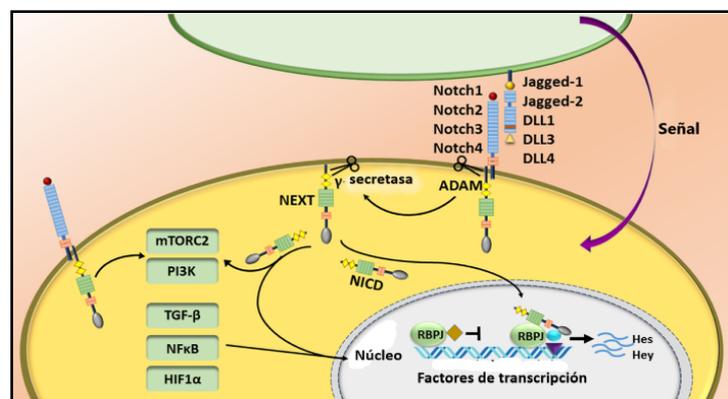


Figura 10. Regulación de la vía de señalización de Notch. *Frontiers in Immunology* (July 2018.) (Adaptada de Janghorban et al.)

Como se ha comentado anteriormente, la vía de señalización Notch, es una de las principales vías reguladoras de la hematopoyesis, participa en la diferenciación celular inmune, en la inflamación y en la inmunosupresión tumoral. Notch juega un papel importante en el control tanto de las células que participan en la inmunidad innata como: macrófagos, neutrófilos, mastocitos, MDSC, DC, y NK, como en las que componen la inmunidad adaptativa, linfocitos T, como los Th1, Th2, Th17, los Treg, las NKT y los linfocitos B.

* DC : Son células presentadoras de antígenos profesionales (APC) que reconocen, procesan y presentan antígenos al resto de células T, activando así la respuesta inmune antígeno-específica. La diferenciación de estas células a partir de células progenitoras hematopoyéticas (HPC), parece estar influenciada por la cooperación de las vías Notch y Wnt. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que dos subtipos de DC, las de estirpe mieloide que derivan de progenitores mieloides de médula ósea y una pequeña proporción de DC que derivan de progenitores linfoides, están directamente controladas por receptores y ligandos Notch. Weijzen et al., demostraron que Jagged1 podría inducir la maduración de las DC derivadas de monocitos. Otros estudios han manifestado que en el microambiente tumoral se segregan factores que dificultan la diferenciación y las funciones de estas células.

Además se ha observado que la vía Notch no sólo participa en la regulación de la diferenciación de estas células, sino que también es importante para la activación de las mismas, que son esenciales para la inmunidad tumoral.

Hay un subtipo de DC que tiene una alta expresión de DLL4, este tipo ha sido descrita recientemente. Parece ser que este subtipo DLL4+DC es esencial para una respuesta antitumoral efectiva. Se ha observado que a bajas dosis de antígeno el eje DLL4-Notch actúa como co-estimulador de la vía de PI3K dependiente de la señalización negativa de TCR-CD28, esto favorece que las células CD4+ produzcan una respuesta antitumoral más eficaz. Este subtipo celular se ha encontrado en sangre periférica bajo condiciones de inflamación y demuestra ser más eficaz en promover la diferenciación de Th1 y Th17. Su papel en pacientes con cáncer aún no ha sido dilucidado (Khosla et al., 2019).

* LT: En los últimos años se ha demostrado que la vía Notch regula múltiples procesos involucrados en el destino celular durante el desarrollo del sistema hematopoyético, esto parece ser mediado en su mayoría por la vía de señalización canónica Notch y mayoritariamente por Rbp-j. Juega un papel importante en el linaje de los LT en las etapas más tempranas del timocito, así como para el desarrollo de los LB.

Una vez los LT dejan el timo y pasan a sangre periférica ejercen sus funciones frente a múltiple patógenos. La diferenciación de las células T CD4+ naïve a los diferentes subtipos de células Th está regulado por el TCR y señales coestimuladoras como las citocinas.

De acuerdo al perfil de citocinas, las células T helper se clasifican en Th1, Th2 y Th17. La IL-12 secretada por las APC favorece la diferenciación de los LT CD4+ naïve en células Th1, las cuales participan en la inmunidad celular. Estas secretan citocinas como la IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27 e INF γ . Siendo la IL-2 y el INF γ las de mayor interés en la inmunidad antitumoral. Mientras las Th2 participan en la inmunidad humoral y las citocinas implicadas son la IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Khosla et al., 2019).

Aunque ciertos aspectos de cómo regula Notch la diferenciación de las células Th, son controvertidas, el consenso que se maneja, es que Notch es esencial para la diferenciación de las Th2 y que también influye en la respuesta de las células Th1. Las APC que promueven la respuesta Th1, muestran regulación positiva de los ligandos Notch DLL1 y/o DLL4 (Amsen et.al., 2004; Skokos and Nussenzweig, 2007; Junet et.al., 2008).

El destino celular entre Th1 y Th2 parece depender de los ligandos de unión a los receptores Notch. La expresión del ligando Jagged, pero no de DLL, en la superficie de las APC, demostró que inducía la diferenciación a células Th2, in vitro (Amsen et.al., 2004). Hay estudios que ponen de manifiesto, que el ligando asociado a la diferenciación a Th2 es Jagged2. Uno de estos estudios informó, que Jagged2 es inducido en las DC después de la estimulación con múltiples antígenos que activan a las Th2 como son los ácaros del polvo, PGE2, entre otros (Amsen et. al., 2004; Krawczyk et. al., 2008; Worsley et.al., 2008). Otro estudio llevado a cabo tanto por Krawczyk y colaboradores como por Worsley y colaboradores (2008), observaron que Jagged2 impulsaba la diferenciación de las células Th2 tanto in vitro como in vivo. Las respuestas inmunes eficientes llevadas a cabo por las células Th2, suelen ser inducidas después de la señalización de IL-4R, que a su vez activa a la vía STAT6 y aumenta la transcripción del gen GATA3, importante para la polarización de las células Th2 (Ouyang et.al., 2000).

Según esto, Notch puede regular directamente la expresión del gen GATA3. Los complejos de transcripción Notch-Rbp-j, se unen en su mayoría a GATA3 y por lo tanto regulan de este modo su expresión (Amsen et.al.,2007; Fang et.al., 2007). Todo esto aporta dos mecanismos moleculares por los que el complejo Notch-Rbp-j promueve la diferenciación de las células Th2. El primero sería favorecer la transcripción de GATA3, el incremento de los niveles de la proteína GATA3 genera a su vez un feed-back positivo que favorece su propia expresión (Fang et.al.,2007).

Y el segundo es que GATA3 favorece la expresión del gen de la IL-4 y de los niveles de proteínas. Por lo tanto, la IL-4 puede unirse al receptor IL-4R y favorecer la polarización de las Th2.

En cuanto a la implicación de la vía Notch en la generación de las células Th17, existen numerosos estudios que lo evidencian. Según Korn et.al.,2009, fueron identificadas como un subtipo pro-inflamatorio distinto a las Th1. Otros autores como Ito y Mukherjee y colaboradores (2009), reportaron que el ligando DLL4 expresado en las DC cuando se activa con ligandos del receptor tipo Toll (TLR) o antígenos de Mycobacterium pueden promover la generación de este tipo celular, mediante la activación del factor de transcripción ROR γ t. En la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), las Th1 y las Th17 se desarrollan en el SNC generando autoinmunidad.

El inhibidor de Notch, GSI, en este modelo de enfermedad favorece la disminución de los niveles de citocinas generadas por ambos tipos celulares (Jurynazyk et. al., 2008; Minter et.al., 2005). Estos resultados aportaron que los ligandos DLL en las DC, estarían involucrados en la promoción o generación de células patogénicas Th1 y Th17, mientras que los ligandos Jagged podrían suprimir la autoinmunidad.

Los Treg, son un tipo de linfocito CD4+ cruciales en el mantenimiento de la homeostasis inmune ya que llevan a cabo la supresión de la activación de los LT en respuesta a un antígeno. También promueven la evasión de la vigilancia inmune, esto se asocia con invasividad tumoral y pobres resultados clínicos.

Se tiene evidencia que la señalización Notch1 y TGF β cooperan regulando la expresión del gen

FOXP3, favoreciendo ésto la inducción periférica de los Treg. Notch3 y Notch4, se expresan en niveles más altos en tumores poco diferenciados, será importante dilucidar la asociación de Notch con los Treg durante la formación del tumor. También es importante comprender la regulación de los diferentes ligandos de esta vía en diferentes tipos tumorales y el reclutamiento de Treg. Tanto Jagged1 como Jagged2 aumentan la generación de Treg y ambos ligandos están altamente expresados por ejemplo en las células de cáncer de mama TNBC, en las CSC y en los clones resistentes a los tratamientos. En un modelo murino de cáncer de pulmón, se administró de forma sistémica formas multivariantes de DLL1 y se observó que la respuesta Th1 a través de STAT1/STAT2/T-bet resultaba en un aumento de TILs y células de memoria CD8+, así como una disminución de los Treg y de la vascularización del tumor (Koshla et al., 2019).

Varios estudios demuestran el papel de la vía Notch en la generación de un grupo de células T de memoria, denominadas Tscm (stem cell memory T cells) y las Tcm (central memory T cells), las cuales han demostrado tanto una capacidad de permanencia superior como una actividad antitumoral también superior comparada con la de las Tem (effector memory T cells) y con las Teff (effector T cells) (Q. Liu et al., 2020). Estos experimentos se han llevado a cabo en modelos preclínicos con ratones humanizados (Gattinoni et. al.,2011). Además, otros autores han propuesto que éstas células producen altos niveles de citocinas, por lo tanto tienen una actividad citotóxica muy fuerte, in vitro y por lo tanto una habilidad superior para erradicar tumores generados en ratones, comparadas con los LT efectores (Sallusto et.al., 1999; Klebanoff et.al.,2006).

Éstas células se generan a partir de células CD4+ y CD8+ activadas mediante co-cultivo con células estromales que expresan el ligando DLL-1. Además, tienen la capacidad de ser de larga duración con una alta capacidad proliferativa ya que pierden marcadores de células T agotadas como PD-1 y CTLA-4, mostrando alta capacidad antitumoral.

Los antígenos tumorales reprimen la vía Notch en los LT a través del receptor PD-1, es una estrategia para escapar de la vigilancia inmune.

Con todo esto, se podría proponer la vía de señalización Notch como diana en la inmunoterapia contra el cáncer ya que podría ofrecer beneficios terapéuticos al superar la inmunosupresión de las células T inducida por las células tumorales (Figura 11).

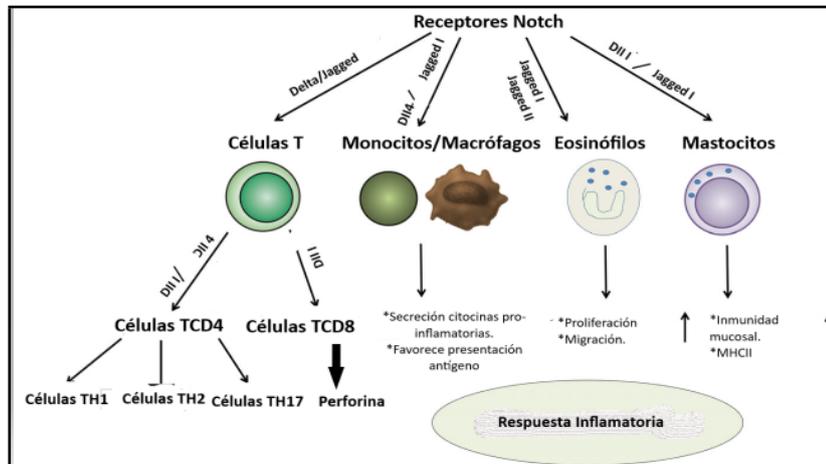


Figura 11. Expresión de los receptores Notch en las células inmunes y sus funciones. Scand J Immunol.2019. (Adaptada de Khosla et al.)

*Linfocitos B (LB): Otro papel bien caracterizado de la vía Notch es su implicación en el destino de las células B maduras, que se componen de dos subtipos principales, las células B foliculares y células B de la zona marginal del bazo (MZB) (Pillai and Cariappa, 2009). Los LB foliculares, son los más abundantes, participando en la respuesta a antígenos proteicos inmunodependientes de LT.

El subtipo MZB, son una importante línea de defensa contra patógenos que generan anticuerpos independientes de LT. Las MZB, expresan una alta cantidad de CD1d, una glicoproteína expresada en la superficie de varias células presentadoras de antígeno, por lo tanto les permite unirse a antígenos lipídicos en circulación y presentarlos a las NK invariantes, Va14.

En algunos aspectos las MZB se pueden considerar una población innata ya que exhiben constitutivamente un fenotipo activado similar a las NK, a las NKT y a las células T $\gamma\delta$. Parece ser que la vía Notch está implicada mayoritariamente en el destino de las MZB, en ello está involucrado Notch2 y DLL1. Esto se ha evidenciado en experimentos en ratón deficiente en Notch2 y en DLL1,

ya que tienen un número muy reducido de estas células (Hozumi et.al.,2004; Saito et.al.,2003).

Otros estudios que ponen de manifiesto esto, han utilizado ratones deficientes en otros componentes de esta vía como Rbp-j (Tanigaki et.al.,2002) o MAML1 (Oyama et.al., 2007; Wu et.al.,2007) y se ha observado que tampoco generan MZB. Estos experimentos de pérdida de función, concluyen, que la señalización a través de Notch2 y DLL1 controla la tasa de desarrollo de las células MZB.

Otro componente de la vía Notch que participa en el desarrollo de las células MZB, es la familia Fringe de glicosiltransferasas, actúan mejorando las interacciones de los receptores Notch y los ligandos DLL, añadiendo N-acetilglucosamina a residuos de fucosa en el receptor Notch. Dos miembros de la familia Fringe, Lunatic fringe y Manic fringe, cooperan para fortalecer la interacción entre Notch2 en las células MBZ o sus precursores y las células endoteliales que expresan DLL1, esto promueve el desarrollo del linaje celular MBZ (Tan et.al.,2009).

*MDSC: Se caracterizan por promover la progresión tumoral a través de la supresión de las células inmunes y favoreciendo la angiogénesis y la metástasis. El papel de Notch en la mielopoyesis sigue siendo controvertido,aunque varios estudios informan, que esta vía es muy importante para la actividad y funcionamiento de las MDSC (P. Grazioli et al.,2017). La actividad de Notch, concretamente la expresión de Hes1, es menor en estas células, concretamente en las PMN-MDSC, esto se ha observado en pacientes con carcinoma de células renales y en medios de cultivo de líneas celulares de cáncer de mama y de cáncer de pulmón. Parece que se debe a una fosforilación inhibitoria de NICD por la caseina quinasa 2 que interrumpe el complejo transcripcional de Notch.

Además, la inhibición de la vía Notch favorece a las PNM-MDSC sobre las M-MDSC (Gabilovich et.al.,). Otro estudio llevado a cabo en ratones transgénicos, por el equipo de Gibb et.al., demostró que la desregularización de la vía Notch puede generar mielopoyesis y expansión de MDSC, esto puede deberse a la acumulación del receptor Notch escindido de S2, pero no de S3,

por la acción de las metaloproteasas ADAM en el sitio S2 o la inhibición de la γ -secretasa.

Estos datos sugieren, que la regulación tanto temporal como espacial de la vía de señalización Notch, así como la presencia de citocinas específicas, estarían involucrados en la diferenciación mieloide y en la polarización de macrófagos durante el inicio del tumor. Otro grupo informó, que el bloqueo de esta vía inducía la generación de las PMN-MDSC, con menor función inmunosupresora y además se inhibía la producción de M-MDSC. También demostraron que las señales Notch-CSL, modulaban el proceso de diferenciación y las funciones inmunosupresoras de las MDSC. Un posible mecanismo por el cual la señalización Notch podría regular la diferenciación de MDSC, sería a través de miR-223, ya que este inhibe la diferenciación de las MDSC inducidas por el microambiente tumoral, regulando tanto su número como sus funciones inmunosupresoras (Hosseini et al., 2018).

Janghorban et al., han demostrado que las MDSC son reclutadas al microambiente tumoral a través de la vía m-TOR y por la producción de G-CSF. Por tanto, las MDSC inducen la vía Notch en las células cancerosas y promueven la capacidad de las CSC, se crea un feed-back positivo entre las células cancerosas, células inmunes y CSC. Las MDSC, promueven a las CSC a través de la activación del eje IL-6/STAT3 y del crosstalk NO/Notch (Peng et al.). Notch ayuda a mantener la señalización de STAT3. Además la activación IL-6/STAT3 favorece la expansión de las MDSC y de su circulación en varios tipos tumorales. Otra observación importante, es que las células tumorales incrementan la expresión de Jagged1 y Jagged2 en MDSC a través de la señalización NF- κ B-P65, lo cual genera tolerancia en las células T inducidas por tumores (Rodríguez et al., Miele et al.). El tratamiento con un anticuerpo bloqueante de Jagged1/2 demuestra actividad terapéutica en varios modelos murinos de carcinoma de pulmón que depende de la respuesta CD8+.

Con ello, se ha observado que esta terapia induce la aparición de unas células inmunomoduladoras similares a las MDSC, se conocen como MDSC-LC, las cuales tienen menor expresión de marcadores supresores de las MDSC, iNOS y ARG1.

Aunque no está claro si estas células derivan de la reprogramación de las MDSC o de la

diferenciación de novo de precursores mieloides de médula ósea tras inhibición de Jagged.

Estos hallazgos proporcionan una prueba preclínica para el uso de anticuerpos anti Jagged1/2 en la reprogramación de LT cuyas funciones han sido suprimidas por las MDSC y mejorar así la eficacia de la inmunoterapia en el tratamiento contra el cáncer. Resumiendo, parece ser que la vía Notch es un modulador importante de la biología de las MDSC, influyendo de diferentes formas, dependiendo de los receptores y ligandos involucrados y de las etapas de diferenciación de estas células.

* TAM: La vía Notch juega un papel importante en la diferenciación, polarización y activación de los macrófagos. Los mediadores de esta vía están regulados positivamente en macrófagos activados. Existen varios estudios que ponen esto de manifiesto. Wang et.al., observaron que la esta vía modulaba la polarización de los macrófagos M1, secreción de IL-12 y mejoraba la inmunidad tumoral. Además demostraron que la señalización canónica de Notch mediada por CSL/Rbp-j modulaba la polarización M1 vs M2 a través de SOCS3. El grupo de Xu y colaboradores demostraron que Notch1 favorecía la polarización de M1 a través de la vía canónica y mitocondrial.

Reedijk y su grupo, propusieron que la vía de señalización Notch en células tumorales regula la expresión de citocinas pro-inflamatorias, IL-1 β y CCL2 e induce el reclutamiento de TAM, esto lo observaron en cáncer de mama tipo basal-like. Además, observaron que la vía Notch regula la activación de las células tumorales mediada por TGF β a través de los TAM, lo que sugiere un feedback paracrino entre los TAM y las células cancerosas a través de esta vía de señalización.

Yu-Zhang et.al., 2019, analizaron muestras de pacientes de carcinoma micropapilar invasivo de cáncer de mama y vieron que Jagged1 modulaba la infiltración de TAM y estaba asociado con un pobre pronóstico.

Otro grupo investigador, Liu y colaboradores, encontraron que la expresión de Jagged1 estaba asociado con una alta concentración de M2 en el estroma, lo que reduce la supervivencia libre de

progresión y la supervivencia global en cáncer de mama primario.

También observaron que el infiltrado de M2 en las lesiones metastásicas era mucho más alto que en el tumor primario, en pacientes resistentes a los IA. Concluyeron con ello, que Jagged1 promovía la resistencia a los IA por favorecer la diferenciación de los TAM en pacientes con cáncer de mama. Guo and González-Pérez, describieron un nuevo crosstalk entre Notch, IL-1 y la leptina que induce angiogénesis en cáncer de mama. Parece ser que la leptina estimula receptores y ligandos en las células tumorales de cáncer de mama y esto depende de la señalización de la IL-1 (S.Perrier et al.,2009). A su vez Notch contribuye a la expresión de VEGF/VEGFR2, promoviendo así la angiogénesis. Esta relación es importante a tener en cuenta en aquellos tumores relacionados con la obesidad, ya que los niveles de leptina están aumentados en pacientes obesos. La inflamación asociada a la obesidad implica a los macrófagos M1, estos a su vez producen IL-1 y ello favorecería el crecimiento tumoral en parte a través de la vía Notch. En conclusión, Notch participa en la polarización de los macrófagos y modula su actividad. A su vez las citocinas secretadas por los macrófagos estimulan esta vía en las células tumorales, con lo que esta comunicación paracrina entre macrófagos y células cancerosas pueden promover la supervivencia tumoral. (Figura 12)

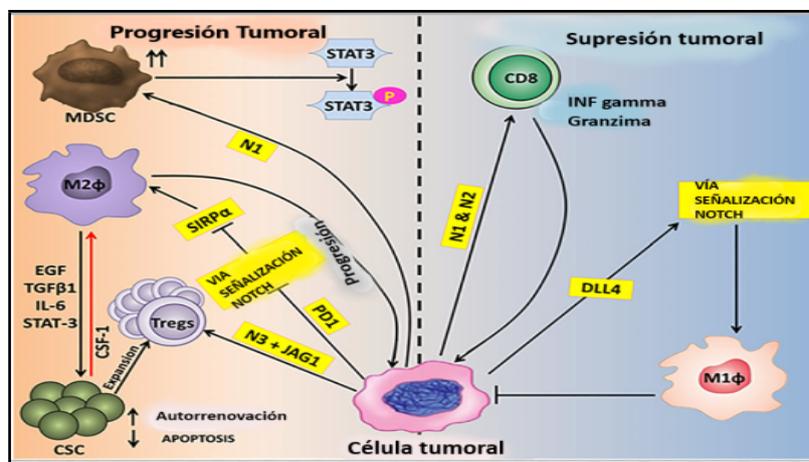


Figura 12. Vías de comunicación entre la vía de señalización Notch y las células inmunes en progresión y supresión tumoral. Scand J Immunol.2019 (Adaptada de Khosla et al.)

En cuanto a la relación de la vía de señalización Notch en el desarrollo del cáncer de mama, está cada vez más estudiada en una subpoblación celular denominada, breast cancer stem cells (BCSCs), ya que Notch está involucrada en el desarrollo mamario normal y a su vez en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. El mRNA que codifica para la proteína Notch1 está principalmente expresado en las células luminales del epitelio normal de la mama. Notch4 está expresado principalmente en la población basal y en las BCSCs. Esto sugiere que tienen diferente comportamiento con respecto a las diferentes subpoblaciones celulares que conforman el epitelio mamario incluyendo a las BCSCs. Según estos datos en modelos murinos se ha observado que la sola activación de Notch1 no sería capaz de generar tumores mamarios, mientras que la activación de Notch4 sí lo haría. Tanto Notch2 como Notch3 tienen vinculación con las BCSCs. Notch2 se expresa en tumores luminales ER+ y afecta a las células iniciadoras de tumor. Notch3 es crítico en la diferenciación de células progenitoras a células del linaje luminal (Shanchun Guo et al., 2011).

De los cuatro receptores Notch conocidos, Notch 1, es el mejor estudiado y el de mayor potencial en el desarrollo de la carcinogénesis mamaria. Esta implicación se observó por primera vez utilizando un modelo de ratón transgénico MMTVD-c-myc (mouse-mammary tumor virus).

MMTV pertenece a una familia de retrovirus que induce el crecimiento tumoral mamario en ratón a través del proceso de mutagénesis insercional.

Los genes de Notch 1 y Notch 4 son las dianas principales del MMTV. A través de estos procesos de inserción y reordenamiento se crearon mutaciones, las cuales generaban oncogénesis en las células epiteliales de la mama. Concretamente la oncoproteína int-3/Notch4, transforma a la célula epitelial en célula neoplásica e induce el desarrollo de adenocarcinoma en ratón. En el laboratorio se crearon estas mutaciones inyectando el provirus del MMTV en el locus del Notch4/int-3, para dar lugar a este tipo de tumores. Estos ratones desarrollaban tumores con un alto infiltrado de linfocitos T CD4+CD8+ y además se observó que Notch1 aparecía mutado en un alto porcentaje (52%) de estos tumores ya que es un importante colaborador de c-myc (E.N.Kontomanolis et al., 2018)

También se encontró que era mediador del oncogen Ras, que aparece mutado en estadios tempranos de la enfermedad de ahí que juegue un papel importante en el desarrollo de la misma (Shanchun Guo et al.,2011).

El cross-talk existente entre los estrógenos y la vía de señalización Notch, participa de forma importante tanto en el desarrollo tumoral como en la angiogénesis, ésto fue descrito por primera vez por Soares et.al.,(2004).

La expresión de Notch2 en cáncer de mama, a diferencia del resto de los miembros de la familia, parece estar asociada a una mejor supervivencia de estas pacientes ya que su alta expresión está relacionada con tumores muy bien diferenciados y por lo tanto poco agresivos (O'Neill y colaboradores).

La sobreexpresión de Notch3 en la glándula mamaria favorece el desarrollo de tumores, en modelos in vivo. También se le asocia con las metástasis óseas derivadas del cáncer de mama (Yamaguchi et al.)

Las alteraciones genéticas de Notch4 conlleva una desregulación de Notch4 NICD por presentar mutaciones de ganancia de función asociadas a la oncogénesis mamaria.

Los genes target de la vía de señalización Notch, como son los genes represores de la transcripción, Hes (1-7) y Hey, parecen estar involucrados en cáncer de mama, aunque su papel no queda claro aún. Hes1 actúa como supresor tumoral. Hes6, es un oncogen potencial que está sobreexpresado en cáncer de mama con funciones promotoras y proliferativas de tumores. Otros genes relacionados con esta vía y el cáncer de mama, son proteínas y factores que están relacionados con el ciclo celular como : p21WAF1/Cip1, Deltex , NF-kB, ciclina D1 y c-myc , su desregulación está presente en muchos tipos tumorales (Shanchun Guo et al., 2011)

Otros componente de esta vía que participan en la patogénesis del tumor mamario, es la survivina (BIRC5), proteína inhibidora de la apoptosis (IAP) (Rexhepaj et al., 2010).

El grupo del Dr. Alteri, descubrió que el eje de señalización Notch-survivina, está sobreactivado en fenotipos con alta tasa de proliferación (Ki67), por lo tanto tumores muy agresivos. Esto podría abrir nuevas expectativas de tratamiento con terapias individualizadas para pacientes propensas a recaídas que son las de peor pronóstico.

Stylianou et al.,(2006), investigaron la acción del gen Numb, inhibidor de la vía Notch, principalmente de Notch1 y Notch4. Numb se comporta como un regulador negativo de esta vía en la formación del sistema vascular que lleva a cabo la misma en los tumores de mama. Tanto Numb como Numb-like (NUMBL) se pierden en el 50% de los cánceres de mama debido a la ubiquitinación y degradación proteosómica de ambos.

2.4.3 Vía de señalización Hedgehog (Hh) juega un papel importante en la embriogénesis, en el mantenimiento de la homeostasis en tejidos adultos, reparación de tejidos durante los procesos de inflamación crónica y carcinogénesis.

La familia de proteínas Hh está formada por un grupo de ligandos, Sonic-SHH, Indian-IHH, Desert-DHH, los cuales se unen en la superficie celular a un receptor transmembrana Patched (PTCH).

Este inhibe la actividad de otro receptor transmembrana, la proteína Smoothened (SMO), pero cuando se une a los ligandos SHH, IHH y DHH, libera a SMO lo cual se traduce en un procesamiento postraduccional de GLI1 (oncogen asociado a glioma).

GLI1 es un gen que codifica a un miembro de la familia Kruppel de proteínas de dedos de zinc. El factor de transcripción es activado por sonic hedgehog a través de una cascada de traducción de señales que regula la proliferación de stem cells. La actividad y la localización nuclear de esta proteína están reguladas negativamente por p53.

En humanos se han identificado tres proteínas GLI, GLI1 y GLI2 que actúan como activadores

transcripcionales y GLI3 actúa como represor (Priyanka B. et al.,2019; Sandra Grund et al., 2019).

Esta vía se caracteriza por tener un componente canónico y otro no- canónico. Cuando se activa el componente canónico, los ligandos SHH, IHH y DHH, se unen al receptor transmembrana PTCH1 inhibiéndolo. PTCH1 a su vez estimula a la proteína SMO dando lugar a una cascada de reacciones intracelulares.

Cuando SMO está activada inhibe a SUFU (gen supresor) y esto implica la activación y liberación de las proteínas GLI1 y GLI2 que se translocan al núcleo y activan a los genes de transcripción diana de esta vía. En el citoplasma las proteínas GLI son degradadas en el proteosoma a través de la fosforilación de proteínas A kinasas como, caseína kinasa 1 y la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK3β). Los genes diana de esta vía juegan un papel importante en la regulación del ciclo celular (Ciclinas D1/2), en la proliferación (PDGFR, MYC), en la apoptosis (BCL2), en la angiogénesis (VEGF, ANG1/2), transición epitelio-mesénquima (MMP9, SNAIL) y en la regulación y autorrenovación de las stem cells (NANOG, SOX2).

La activación del componente no-canónico consiste en que la activación de los factores de transcripción GLI, lo hacen independientemente de los ligandos Hh, del receptor PTCH y de la proteína SMO. Ahora dependen de otras cascadas de reacciones como las que llevan a cabo MAPK, PI3K, TGFβ, Wnt y NF-kB (Figura 13).

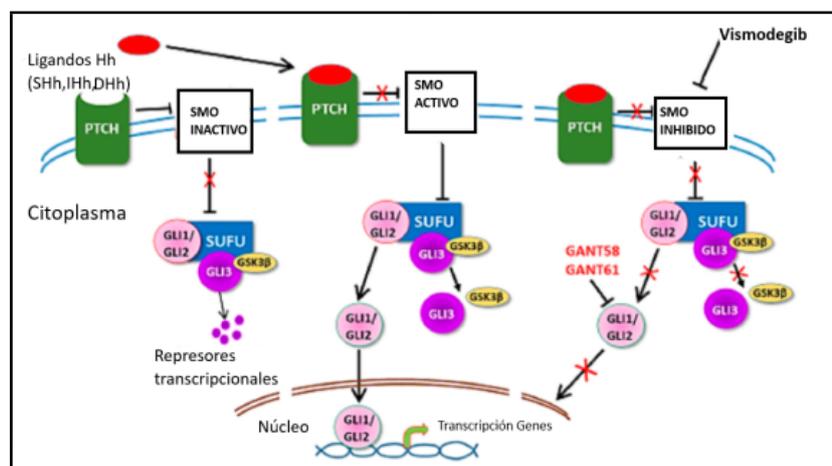


Figura 13. Vía de señalización Hedgehog. Cancers 2019 (Adaptada de Priyanka B. et al.)

La vía de señalización HH/GLI está involucrada en la inmunosupresión y en la evasión inmune. La aberración del eje HH/GLI está altamente desarrollado en el carcinoma basocelular donde está implicado en su desarrollo y crecimiento. Es un tumor con una alta carga mutacional, se expresan neoantígenos específicos del tumor y esto hace que las lesiones sean más inmunogénicas, de ahí que se pueda plantear que HH/GLI favorece la proliferación tumoral, la supervivencia e induce un ambiente inmunosupresor que impide una respuesta inmune antitumoral eficaz. La primera evidencia sobre esto, se observó en modelos murinos donde los queratinocitos oncogénicos que expresaban SMO, secretaba TGF β , esto reducía el número de LT efectores en el tejido tumoral. Además, la señalización del TGF β en células de médula ósea favorecían el crecimiento tumoral por favorecer el reclutamiento de MDSC a las lesiones tumorales de manera dependiente de CCL2.

Otro experimento que proporciona evidencia adicional al anterior, que la señalización HH induce mecanismos inmunosupresores como es el reclutamiento de las MDSC y la polarización de los macrófagos al fenotipo M2, fue proporcionado por un modelo de ratón de xenoinjerto donde se desarrolló un tumor mamario.

Cuando estos ratones se trataban con un inhibidor de SMO, como por ejemplo, vismodegib se observó que había una reducción en los niveles de MDSC, de macrófagos M2 y de Treg en las lesiones tumorales mientras aumentó el número de células TCD8+ y macrófagos M1, lo que además disminuyó el desarrollo de metástasis en estos ratones.

En un análisis de la pieza tumoral de carcinoma basocelular facial tratada con luz UV, reveló un aumento de los niveles de Tregs en las lesiones intra y peritumorales, donde se acumulaban en gran cantidad. Esto además se acompañaba de un aumento en la secreción de TGF β , favoreciendo de esta manera un ambiente inmunosupresor. En este contexto parece estar involucrado el eje HH/GLI2, el cual puede activar la expresión de TGF β en los Treg en humanos. El factor de transcripción GLI2 puede atenuar la activación y la función de las células T al alterar los perfiles de expresión génica en estas células. La activación de GLI2 parece alterar el TCR que a su vez puede alterar a los componentes principales de la vía de señalización de TCR, como NF κ B y AP-1 (Sandra

Grund et al., 2019).

Además la vía HH/GLI polariza la diferenciación de células T a Th2, induciendo la producción de IL-4, de este modo reduce la citotoxicidad de las células T en el contexto de inmunidad tumoral. Sobre los LT CD4 naïve induce la diferenciación a Treg por aumento en la expresión de FOXP3 y TGFβ (Sandra Grung et al., 2019)

En la inflamación y oncogénesis gástrica inducida por *Helicobacter pylori*, está inducida la señalización SHH mediante la activación de NFκB. Durante la inflamación gástrica crónica, la señalización HH/GLI apoya la polarización de las MDSC al fenotipo granulocíticas. SHH en células parietales ha demostrado que atrae MDSC que expresan SLFN4 (Schlafen 4)(L.Ding et al.,2016), desde médula ósea (J.L. Merchant et al., 2017).

Se ha observado que estas MDSC que expresan este gen producen INFα, inhibiendo así a los linfocitos infiltrantes de tumor, favoreciendo esto la transformación neoplásica y el crecimiento tumoral. El-Zaatari et.al., proporcionó evidencia a todo esto, utilizando ratones que habían desarrollado la infección por *H. pylori*, pero deficientes en GLI1, y observó que no había expansión de MDSC y que tampoco desarrollaban el tumor (Sandra Grund et al., 2019).

Finalmente, otro mecanismo de cómo las células cancerosas evaden al sistema inmunológico, es regulando negativamente al MHC-1, así las células T específicas de antígeno tumoral no son capaces de reconocerlo y por lo tanto no lo destruyen. Esto se ha demostrado mediante la inhibición de la vía HH en paciente con carcinoma basocelular utilizando inhibidores de SMO , da como resultado una alta expresión de MHC-1 en células tumorales junto con un aumento de LTCD4+ y CD8+ (Sandra Grund et al., 2019).

Con todo esto podemos concluir, que a partir de los estudios mencionados anteriormente, existe una creciente evidencia del papel inmunomodulador que tiene la vía HH/GLI tanto en ambientes inflamados como malignos. La activación de esta vía, crea un ambiente inmunosupresor a través de múltiples vías como es la activación de citocinas inmunosupresoras, regulación positiva de los

puntos de control o expansión y el reclutamiento de MDSC y Treg. Todo esto podría abrir las puertas para nuevas estrategias farmacológicas que actuarán sobre esta vía de señalización HH/GLI. (Figura 14)

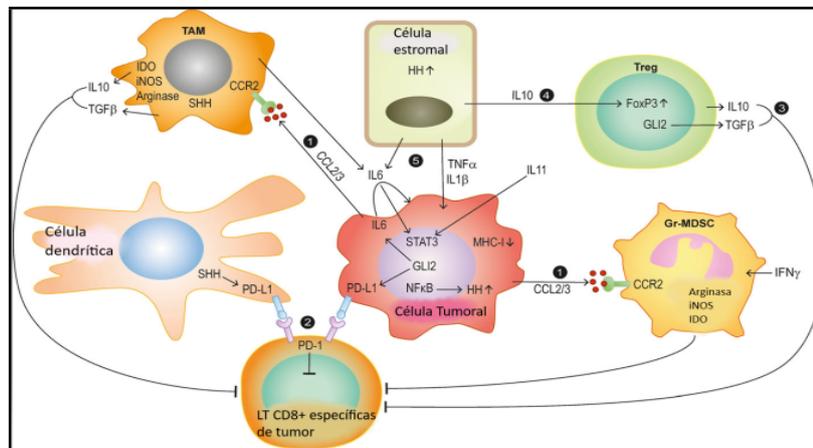


Figura 14. Mecanismos de modulación inmune a través de la vía de señalización HH/GLI en cáncer e inflamación. Cell communication and Signaling (2019) (Adaptada de Grund-Gröschke et.al.)

La vía de señalización Hedgehog está implicada en cáncer de mama con expresión de receptores hormonales, concretamente con el mecanismo de resistencia endocrino. El grupo de Ramaswamy et al., (2019), trabajaron en la resistencia de los tumores hormonales a tamoxifeno, vieron que esta vía está activada en estos tumores.

Además, demuestran que hay un cross-talk entre la vía PI3K/AKT y la vía Hedgehog (SHH, SMO y GLI1), responsables del desarrollo de resistencia tumoral a tamoxifeno, esto estaba relacionado con un fenotipo más agresivo, apareciendo micrometástasis a distancia en modelos murinos. Con estos resultados podemos decir que la vía PI3K/AKT y la vía Hh están activadas en tumores con resistencia endocrina (P. Bhateja et al., 2019).

La co-expresión de GLI1, EGFR y SNAIL1, están asociados con una pobre supervivencia libre de enfermedad en tumores hormono-dependientes.

GLI1 parece estar involucrado en la regulación de las cancer stem cells en varios tipos tumorales. Sun et al., encontraron que la expresión del receptor de estrógenos se correlacionaba con la

expresión de GLI1 y con el marcador de las cancer stem cells ALDH1, en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y HCC1438.

La vía Hh juega un papel importante en la progresión del carcinoma ductal in situ a carcinoma ductal invasivo. Souzaki et al., para verificar esto, se basaron en la ratio de tinción nuclear GLI1 o % de traslocación nuclear GLI1. Este % se relacionaba con la invasividad y además había un incremento de este de carcinoma ductal in situ a carcinoma ductal invasivo.

En TNBC, encontramos una elevada expresión de SHH, GLI1 y GLI2, esto se correlaciona con un pobre pronóstico de la enfermedad. En el tipo claudin-low, la regulación transcripcional aberrante de GLI1 activa a NF-kB. En el tipo basal-like, el factor de transcripción llamado Forkhead Box (FoxC1), regulador de la vía Hh, es inducido por NF-kB, a través de la regulación positiva de GLI2. En este tipo tumoral a través de GLI1, se pueden activar otras vías como PI3K-AKT-mTOR, K Ras, c-Myc, Wnt-βcatenina y TGFβ. Con esto podemos decir, que hay múltiples vías que interactúan y activan a la vía Hh a través de la regulación transcripcional directa de GLI1. La expresión elevada de GLI1 y GLI2 predomina en cáncer de mama triple negativo. Además, GLI1 participa en la formación de metástasis por la desregulación de MMP-11, favorece la angiogénesis a través de VEGF-A y junto con el NRP2, aumenta la expresión y señalización del eje Ras/MEK, que contribuye tanto al inicio como a la progresión tumoral.

Esto podría explicar utilizando modelos de xenoinjertos, la sensibilidad de estos a los inhibidores de GLI en modelos preclínicos (Priyanka B. et al., 2019).

La vía Hh destaca en el mantenimiento de la viabilidad de las células cancer stem cells de mama (BCSCs), con expresión de CD44+/CD24- y ALDH1, estas son especialmente resistentes a quimioterapia debido a su estado de quiescencia y contienen bombas de expulsión de fármacos.

Además parece que la activación de esta vía favorece el crecimiento de clones de estas BCSCs después del tratamiento quimioterápico, lo que hace mantener a esta población de stem cells. Otro mecanismo para promover a las BCSCs es a través de los CAF (Priyanka B. et al., 2019).

Concluyendo, hay estudios preclínicos que sugieren que la vía Hh es crítica en el mantenimiento del fenotipo de las BCSCs, de la activación de los CAF, del ambiente invasivo y de la angiogénesis en TNBC. El mecanismo más común de activación es la vía no canónica a través de la regulación transcripcional de GLI1 y GLI2 (Priyanka B. et al., 2019)

Se propone como diana terapéutica, un inhibidor selectivo de GLI1, GANT61 muy eficiente en cuanto a que disminuye el crecimiento celular dosis dependiente, incrementa la apoptosis y disminuye la población de stem cells en líneas celulares de TNBC (Priyanka B. et al., 2019).

2.4.4 Vía de señalización STAT 3 .- La familia STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), es una familia de factores de transcripción formado por citocinas y factores de crecimiento que intervienen en una gran variedad de procesos celulares. El papel de esta vía en el desarrollo y progresión tumoral está bien establecido. La desregulación de los microRNAs Let-7 y miR-629, podrían inducir la transición oncogénica de las células epiteliales y el desarrollo tumoral, se debería principalmente a la pérdida de la señalización inmunocompetente a través de esta vía.

Factores de crecimiento como VEGF y TGF, además de citocinas como IL-6, IL-17, IL-10, GM-CSF y LIF, producidos tanto por el estroma tumoral como por las células tumorales, promueven la activación de STAT3. Ésta vía se encuentra activada en distintas neoplasias como melanoma, mieloma múltiple, cáncer de mama, próstata, ovario y colon, por ello, es un importante objetivo terapéutico. Las primeras estrategias se centraron en inhibir la vía STAT 3, bloqueando la acción de las quinasas activadoras o secuestrando su capacidad de unión al DNA. Las más recientes se centran en técnicas de proteómica que han identificado y caracterizado nuevas proteínas que interactúan con STAT 3 (F. Laudisi et al., 2018).

Esta vía está ampliamente involucrada en el crecimiento tumoral y en la evasión inmune y además está ampliamente expresada en las células inmunes (Xinglong Qu et al., 2018).

* NK : El desarrollo, la maduración, activación y función de estas células están estrechamente regulados por citocinas como la IL-2 y la IL-15, ambas promueven la homeostasis, proliferación y función de estas células , a través de STAT5, mientras que la IL-12 media la activación de las NK a través de la activación de STAT1, STAT3 y STAT4, por producción de INF γ , perforina y granzimas.

La señalización INF α/β modulada por STAT1-STAT2, favorece la acción citotóxica de las NK (Gotthardt et al., 2019; K.L. Owen, 2019).

*MDSC: Parece ser que el desarrollo de estas células está relacionado con la aberración de algunas vías de señalización durante la hematopoyesis. Hay una serie de vías involucradas en el desarrollo de las MDSC como son PI3K, Ras, JAK/STAT y TGF β , en condiciones patológicas como el cáncer. La inflamación juega un papel fundamental durante la progresión tumoral , teniendo la vía JAK/STAT un papel central en la mediación de la respuesta inflamatoria.

El papel de STAT3 en la regulación de las funciones de las MDSC, ha sido demostrado y apoyado por multitud de estudios, tanto en humanos como en ratones. Uno de estos estudios en pacientes con cáncer de cabeza y cuello demostró que STAT3 puede controlar las funciones supresoras de estas células a través de la arginasa-1.

Un estudio con ratones demostró, que las MDSC aisladas de tumores mostraron altos niveles de expresión de STAT3 y del factor angiogénico VEGF y por el contrario, la inhibición de STAT3 redujo la angiogénesis tumoral.

En otra investigación utilizando un modelo de adenocarcinoma de pulmón se observó, que otra forma de activación de STAT3 es por sobreexpresión de API6 en células mieloides, lo que conlleva a una expansión de las MDSC, con ello a un aumento de la inflamación y proliferación del tumor. Además en las células alveolares, si la vía STAT3 está sobreexpresada, aumenta significativamente los niveles de MDSC, debido a un aumento de los niveles de citocinas inductoras de este tipo celular como la IL-6 y la IL-1 β .

En otros estudios se puso de manifiesto que la activación de STAT3 podía afectar a otras proteínas proinflamatorias como S100A8 y S100A9. Parece ser que la sobreexpresión de S100A9 inhibe la diferenciación de células dendríticas y macrófagos y promueve la formación de MDSC. Por el contrario, su inhibición reducía los niveles de las MDSC. Este mecanismo aún no se conoce con certeza.

Una investigación llevada a cabo por el grupo de Abrams, ha ayudado a descubrir el papel del IRF8, un factor de transcripción que desregula a STAT3 en el desarrollo de las MDSC.

Ellos demostraron que la sobreexpresión de este factor en ratones, conducía a una disminución de los niveles de MDSC tumorales. Además observaron una reducción en la expresión del IRF8 en tumores mamarios, con un aumento del número de MDSC en estas pacientes, de manera que ponen de manifiesto que IRF8 es un regulador negativo de estas células.

Otros miembros de esta vía también tienen su papel en la generación y desarrollo de las MDSC, como STAT1 que favorece la activación del INF γ y de la IL-1 β . Parece ser que las MDSC deficientes en STAT1 no inhiben la activación celular de los LT, debido a su incapacidad para regular al alza la actividad de la iNOS y de la arginasa.

La unión de la IL-4 y la IL-13 al receptor CD124, da como resultado la activación de STAT6 en las MDSC, que conlleva a su vez a la activación de la expresión de TGF β y arginasa. Estudios aportados por Rosenberg, explicaron el mecanismo a través del cual STAT6 suprimía el crecimiento tumoral.

Trabajaron con modelos murinos STAT6 $^{-/-}$, que desarrollaron tumores mamarios, y observaron una reducción en el número de MDSC, lo que resultó en una mayor respuesta de los LT y por lo tanto en una disminución del crecimiento tumoral. Además, estos ratones tenían mayor cantidad de macrófagos M1 productores de NO que ralentizaron dicho crecimiento.

Todos estos estudios destacan el papel de STAT3 y otros miembros de esta familia en la regulación de las propiedades inmunosupresoras de las MDSC (Eleni- Kyriaki Vetsika et al.,2019).

*LT: Dentro de los diferentes subtipos de células T, como los Treg, CTL y los T helper, sus funciones podrían ser reguladas por STAT3.

En cuanto a los T helper, sabemos que T-bet es el principal regulador transcripcional en la diferenciación a Th1, inducido por TCR y estimulado por la IL-12. GATA3 es el principal para la diferenciación a Th2, después de la estimulación por la IL-4. La IL-27, un componente de la familia IL6/IL12, producida por macrófagos y DC, favorece el equilibrio en la diferenciación de Th1/Th2 hacia Th1, regulando al alza a T-bet, independientemente de STAT1 y a la baja a GATA3, a través de un mecanismo dependiente de STAT1 y suprimiendo la producción de citocinas proinflamatorias como IL-2, IL-4 e IL-13.

En el caso de las Th17, STAT3 parece ser indispensable en su diferenciación, ya que la ablación de esta vía en los LTCD4 en ratones, resultó en la ausencia de diferenciación Th17. Estas células se caracterizan por la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y ROR α . En varios estudios in vitro, se ha demostrado que STAT3 puede ser activada a la baja por los receptores de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-21 e IL-23, lo que conduce a regular la expresión de ROR γ t, ROR α junto con el desarrollo y estabilización de las células Th17. El equipo de Cédric Rébé (2013), descubrieron que las células Th17 in vitro generadas con IL-6 y TGF β y las Th17 infiltrantes de tumor in vivo, expresaban ectonucleotidasas CD39 y CD73, componen una maquinaria catalítica que provoca la escisión de ATP extracelular dando adenosina que podría suprimir a las células T efectoras. La expresión de estas ectonucleasas depende de STAT3 y de Gfi-1 que es represor de la transcripción.

La expresión de CD39 en las células Th17, promueve el crecimiento tumoral, lo que sugiere que la expresión de ectonucleotidasas dicta el destino inmunosupresor de las Th17 en cáncer. Estas observaciones sugieren que STAT3 y Gfi-1 determinan el destino inmunoregulador de estas células a través de la regulación de las ectonucleotidasas (Lei Bao et al., 2013).

En el caso de los Treg, la vía STAT3 regula la expresión de FOXP3 y esta regulación depende del contexto. In vitro, la IL-2 induce la unión de STAT3 y STAT5 a un sitio situado dentro del primer

intrón del gen FOXP3 que conduce a la expresión positiva de FOXP3 en células T purificadas CD4+CD25+, pero no en CD4+CD25-, esto se observó en los Treg infiltrantes de tumor.

Tanto en pacientes con tumores metastásicos como con leucemia mielógena crónica después de un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, resultó en un aumento en los niveles en sangre periférica de células CD4+CD25+ y expresión de FOXP3 en células TCD3+. En los Treg, STAT3 y FOXP3 activados interactúan juntos y regulan los genes de IL-6 y TGFβ1 que probablemente doten a los Treg de capacidad para suprimir la inflamación mediada por las células Th17. La IL-21 activa a STAT3, pero no a STAT5 y por lo tanto no tiene ningún efecto sobre la habilidad, activación o función de los Treg. Por el contrario, en células T vírgenes inducidas a diferenciarse a Treg in vitro, la IL-6 y la IL-27 inhiben la diferenciación al linaje Treg dependiente de STAT3 e independiente de STAT1.

En otro contexto, STAT3 se une a un elemento silenciador dentro del locus de Foxp357 y también podría inhibir la unión de STAT5 a su elemento de unión en el promotor del gen FOXP3 y así ambos inhibir la expresión de FOXP3. Un inhibidor de STAT3, como es WP1066, se ha visto que mejora la citotoxicidad de las células T en melanoma, a través de la inhibición de FOXP3+Treg, lo que sugiere que STAT3 es requerido para las funciones inmunosupresoras de Treg (Lei Bao et al.,2013).

*TAM: Cheng y colaboradores, fueron los primeros en demostrar que la interrupción de la señalización de STAT3 en macrófagos y en DC derivadas de médula ósea, hace que estas APC sean capaces de restaurar la capacidad de respuesta de las células T tolerantes en ratones portadores de tumores, lo que sugiere una implicación importante en la inmunoterapia del cáncer. También encontraron en estos ratones que los macrófagos del peritoneo tenían alteración de la vía STAT3 y estos eran más propensos a producir mediadores inflamatorios como RANTES, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, IP-10, IL-6 o IL-12, apunta a la señalización STAT3 como una vía reguladora negativa para estas células. Esto podría deberse a una activación de STAT1 que conduce a una alta producción de factores inflamatorios como RANTE o IL-12 o la falta de producción de IL-10.

También ha sido propuesto el papel antitumoral de STAT3 en macrófagos. Esto se generó en estudios que investigaron la importancia de STAT3 en macrófagos de forma indirecta, utilizando ratones knockout SOCS3 en macrófagos.

Estos macrófagos presentaron una activación prolongada de STAT3, pero reducida de STAT1 y esto simultáneamente ejerce efectos antiinflamatorios a través de la regulación negativa de IL-6 y TNF α , así como efectos antitumorales a través de MCP2/CCL8 (Cédric Rébé et al., 2013).

En resumen, la activación de la vía STAT3 favorece el crecimiento tumoral, reducción de linfocitos, infiltración de NK, neutrófilos y macrófagos. El bloqueo de esta vía genera actividad citostática contra las células tumorales.

*DC: La primera evidencia que se tiene que la vía STAT3 es importante en el destino de estas células, se observó en ratones que carecen de la expresión de STAT3 en progenitores hematopoyéticos, estos animales tienen una profunda deficiencia en DC, con eliminación de los efectos de Flt3L en el desarrollo de las mismas.

Sin embargo, estos mismos ratones portadores de tumor, presentan una función mejorada de las DC, LT, NK y neutrófilos incluso con disminución de la progresión tumoral. Parece ser, que las DC deficientes en STAT3, podrían activar de forma eficiente a las células T, según un estudio realizado por Kortyeewski y colaboradores.

De hecho, los ratones que carecen de esta vía en mieloides que forman parte del estroma tumoral, incluyendo DC y macrófagos, muestran una reducción en el número de Treg infiltrantes de tumor CD4+CD25+/Foxp3+Lag3+, esto además fue acompañado por un aumento de los niveles de LTCD8+. Por otro lado, la expresión reducida del MHC clase II y de moléculas co-estimuladoras, debido a la activación de STAT3 en las DC tumorales, contribuye a la expansión de los TregFOXP3 infiltrantes de tumor. Finalmente, la IL-6 ha demostrado ser un supresor tanto de la activación como de la maduración de las DC derivadas de médula ósea y un regulador de la diferenciación de las DC in vivo a través de la fosforilación de STAT3. Por lo tanto, el eje IL-6/gp130/STAT3 controla

la diferenciación y maduración de las DC y puede ser crítico como diana para el control de la respuesta inmune mediada por LT. Podría ser una estrategia prometedora para mejorar la eficacia de la inmunoterapia para el tratamiento del cáncer (H. Kitamura et al., 2017).

Con ello, la IL-6 puede ser generada por las células tumorales e impactar en la activación de STAT3 en las DC. En un modelo de cáncer de páncreas, las células tumorales liberan factores solubles como IL-6 y G-CSF, que son responsables de inhibir la diferenciación y la activación de las DC respectivamente de manera dependiente de STAT3 (Figura 15).

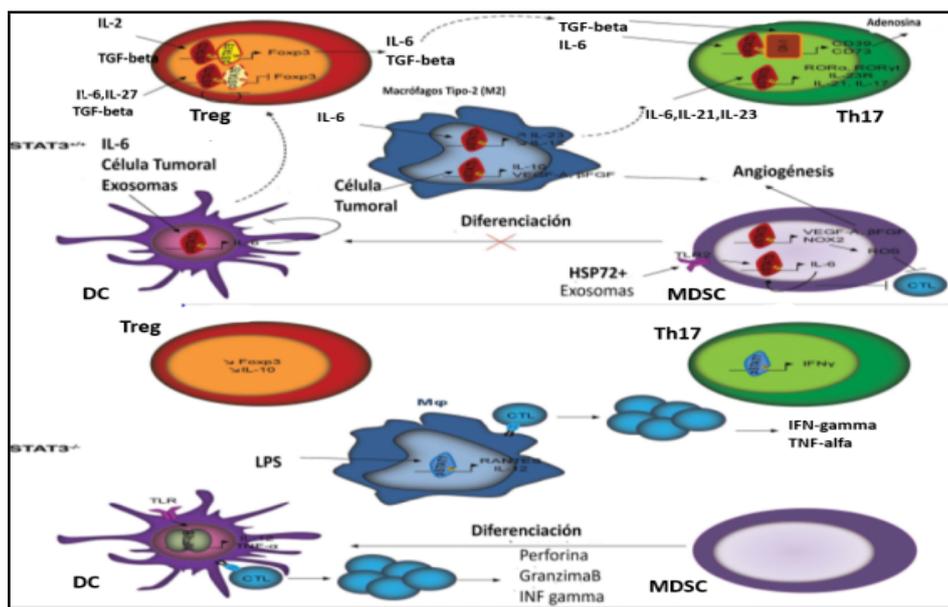


Figura 15. Efectos de la vía STAT3 (STAT3 +/+ o STAT3-/-) en las células inmunes. Adaptada de Rébé C. et al. JAK-STAT 2013.

STAT 3, es uno de los siete miembros que constituyen esta familia (STAT 1, STAT 2, STAT 3, STAT 4, STAT 5 α , STAT 5 β y STAT 6). Está involucrada en todos los subtipos de cáncer de mama, teniendo mayor asociación con el subtipo triple negativo. La hiperactivación de esta vía promueve la expresión de genes involucrados en proliferación celular (Ciclina D1, c-Myc, Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, survivina), supresión inmune (IL-10), inflamación (COX2, IL-6, IL-17A), angiogénesis (HIF1 α , VEGF), transición epitelio-mesénquima (Vimentina, TWIST, matrix metalloproteinasas [MMP-7, MMP-9]) (Charles V.C et al., 2004; K. Banerjee et al.,2016).Un patrón diferencial de la expresión de genes diana de esta vía se observa en cáncer de mama, lo cual indica que STAT3 es un regulador específico de la malignidad del tumor. La vía IL-6/JAK2/STAT3, está activada preferentemente en

células de cáncer de mama con características stem cells, las cuales expresan CD44+CD24-, más que en células CD44-CD24+, que están más diferenciadas.

La inhibición de varios genes que dependen de esta vía, IL-6, PTGIS, HAS1, CXCL3 y PFKFB3, reducen la activación de dicha vía en estas células (Kasturi Banerjee et al., 2016).

En la activación de STAT 3 a través de la liberación de citocinas, una de las más importantes, es la IL-6. La familia de citocinas IL-6 integra a la IL-6, IL-8, IL-11, oncostatina, entre otras, todos juegan un papel importante en la patogénesis del cáncer de mama, estando la IL-11 y la oncostatina, involucradas en el proceso de metástasis, principalmente. El microambiente tumoral formado por células derivadas de médula ósea como adipocitos, fibroblastos, células cancerosas, son liberadoras de estas citocinas inflamatorias. Estas se pueden liberar de forma autocrina y paracrina y son responsables de la activación de la vía STAT 3 en cáncer de mama, de esta manera son promotoras del desarrollo tumoral. En el subtipo triple negativo, el mecanismo de activación de esta vía es a través de la producción autocrina y paracrina de la familia de IL-6, tanto de la IL-6 como de la IL-8, ambas son críticas para el crecimiento y la resistencia a la apoptosis (Kasturi Banerjee et al., 2016).

La activación paracrina de la vía JAK/STAT 3, es inducida por factores solubles secretados por las células epiteliales del tumor y por los fibroblastos, asociado con una elevada fosforilación de la vía.

La IL-6 está implicada en la regulación de la autorrenovación de las CSC, promoviendo así la supervivencia y proliferación de las BCSCs, además están activadas las vías Notch, Wnt, Hedgehog y TGF β .

En general, la familia de IL-6 juega un papel importante en la progresión del cáncer de mama dependiente de la activación de STAT 3 (Kasturi Banerjee et al., 2016)

Otras citocinas activadoras de esta vía e implicadas en la patogénesis de cáncer de mama, son la IL-10 y IL-32. La IL-10 se caracteriza por ser inmunosupresora y anti-angiogénica. La alta expresión de esta, se asocia con un bajo número de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs).

Su efecto inmunosupresor se asocia con una baja actividad de los linfocitos T citotóxicos ya que hay una regulación negativa de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I y II, lo que disminuye la probabilidad de que se presenten péptidos antigénicos generados por el tumor y por lo tanto escapan de la vigilancia del sistema inmune. Además, promueve la resistencia a la apoptosis.

La IL-32 β , es pro-inflamatoria e induce la producción de TNF α e IL-6 por los monocitos y macrófagos. Por inmunohistoquímica (IHC), podemos determinar la expresión de la IL-32 β en muestras tumorales de cáncer de mama y esto se correlaciona con el tamaño tumoral, número de ganglios, metástasis y estadio tumoral. Esto se demostró en experimentos in vitro y se observó que las células de cáncer de mama que expresaban IL-32 β mostraban mayor migración e invasión, lo que se asoció con una mayor secreción de VEGF que activaba la vía STAT3. Por lo tanto, el eje IL-32 β -VEGF-STAT3 favorece la migración y evasión de las células tumorales tanto en condiciones normóxicas como hipóxicas (Kasturi Banerjee et al., 2016).

La vía STAT3 también es activada por receptores con actividad tirosina- cinasa , como la familia del receptor de crecimiento epidérmico EGFR/HER/ErbB y la familia del factor endotelial vascular (VEGFR). Estudios tanto con muestras tumorales como en líneas de cultivo celular muestran la importante conexión entre la vía STAT3 y el receptor EGFR/HER1/ErbB1, dando lugar a tumores más agresivos ya que esta activación favorece la expresión del gen TWIST involucrado en la EMT.

El segundo miembro de esta familia de receptores, HER2/Erb2/neu actúa como co-activador de STAT3, favoreciendo la expresión de genes de Ciclina 1. Hay estudios con muestras tumorales y líneas celulares que ponen de manifiesto que la sobreexpresión de HER2 activa vías promotoras de la inflamación y que afectan a la secreción de IL-6 y por lo tanto a la activación de STAT3. Parece ser que el eje HER2-IL-6-STAT3 está asociado con cambios transcripcionales celulares y por lo tanto con el crecimiento tumoral (Kasturi Banerjee et al., 2016)

El eje de señalización VEGF/VEGFR-2 es una vía de supervivencia para las células tumorales de mama. Altos niveles de VEGF en muestras tumorales, se corresponden con la expresión de genes

como Myc y Sox2, estos favorecen la autorrenovación celular.

La expresión de VEGF/VEGFR-2 puede estar vinculada a la activación de STAT-3 mediada por leptina, involucrada en la proliferación y angiogénesis, por lo tanto, altos niveles de leptina están asociados a metástasis y baja tasa de supervivencia en pacientes con cáncer de mama. Si unimos todo esto, tenemos tumores con características más agresivas (Kasturi Banerjee et al., 2016).

En la activación de STAT3 hay involucradas otras moléculas como **Src**. Hay estudios que ponen de manifiesto que la actividad elevada de STAT3 y Src está relacionada con la respuesta patológica y la progresión de la enfermedad. **PKCE**, aumenta la expresión de genes relacionados con ello y además interactúa con otras vías de señalización como la de las MAPK (Raf-1, MEK1/2 y Erk ½).

La activación de la vía STAT3 y la expresión de **GIV** están relacionados con progresión en cáncer de mama.

Esta vía también está regulada por factores negativos como las **proteínas tirosinas fosfatasas (PTPs)**, la función de estas es desfosforilar la vía e inactivarla. Concretamente TCPTP (PTPN2), es una proteína supresora de tumor, se han visto bajos niveles de esta proteína en un alto % de tumores de mama triples negativos

Supresores de señalización de citocinas (SOCS), en cáncer de mama, la expresión reducida de SOCS-3 se relaciona con metástasis en ganglios. Hay que tener en cuenta que el gen promotor de SOCS-3 está silenciado en tumores de mama y esto permite el crecimiento celular y por lo tanto mal pronóstico.

Proteína inhibidora de la activación de STATs (PIASs) son inhibidores endógenos de STAT. PIAS-3 controla la actividad de esta vía en células normales y bloquea su función oncogénica. Su expresión está suprimida en las células cancerosas lo que favorece los efectos tumorales de STAT3.

La participación de esta de esta vía en cáncer de mama está bien establecida de ahí el interés por

seguir investigando sobre ella. (Figura 16).

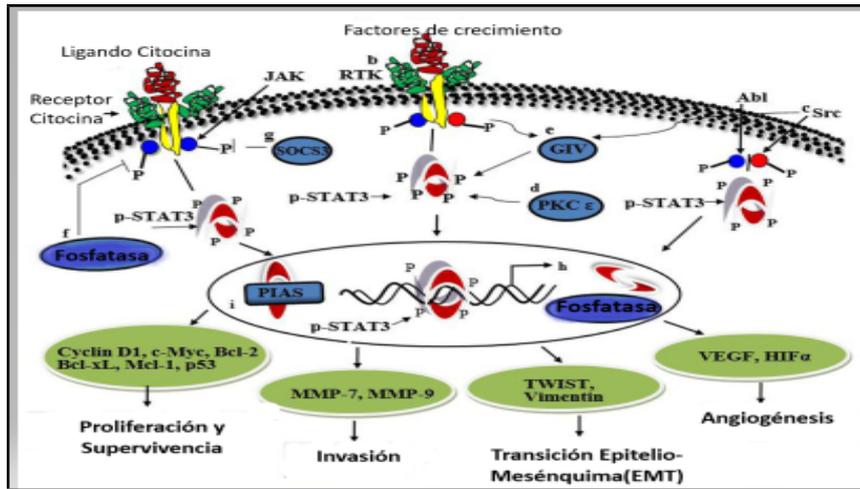


Figura 16. Activación de STAT3 y sus vías. Int J Cancer. 2016. (Adaptada de Banerjee and Resat).

2.5 Factores moleculares implicados en la patogénesis del cáncer de mama.

2.5.1 Factores de crecimiento.

2.5.1.1 HER/ErbB: La familia del receptor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), está formada por cuatro miembros que se caracterizan por ser receptores de superficie celular, ErbB 1-4. Sus funciones son la transmisión de señales que controlan el crecimiento celular normal y la diferenciación. Estos cuatro receptores HER se caracterizan por estar formados por un dominio extracelular de unión al ligando rico en cisteína, un dominio lipofílico transmembrana y un dominio intracelular catalítico con actividad tirosina quinasa.

Un segmento carboxi-terminal con capacidad de autofosforilación que parece ser la parte responsable de la traducción de señales intracelulares cuando el ligando se une al receptor. Estos receptores forman homo y heterodímeros.

A HER1 se unen seis ligandos: factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento

transformante α (TGF α); anfiregulina; factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina; betacelulina y epiregulina.

A los receptores HER3 y HER4 se unen neuregulinas (NGFs), una familia de proteínas estructuralmente diversas. La señalización de estas proteínas se hace a través de la vía de las MAPK (Mitogen-activated protein kinasa).

El receptor HER2, es conocido como “receptor huérfano” ya que no se conocen los ligandos que se unen a él. Los heterodímeros formados por HER2 generan señales celulares más potentes que el resto de los miembros del grupo. Las células del tejido normal tienen pocas moléculas HER2 en su superficie por lo que forman pocos heterodímeros y las señales intracelulares son débiles.

Cuando HER2 se sobreexpresa es capaz de formar múltiples heterodímeros y la señal intracelular es más fuerte, esto hace que tenga mayor capacidad de respuesta a los factores de crecimiento y de crecimiento maligno.

El gen que codifica para este receptor, HER2/neu está implicado en varios tipos tumorales, siendo particularmente relevante en cáncer de mama. Su amplificación se da aproximadamente en el 20-25% de los cánceres de mama y se asocia con un tipo tumoral agresivo y de pobre pronóstico (I.Rubin et al., 2001; Jennifer L. Hsu et al., 2016).

2.5.1.2 PDGF/PDGFR: El factor de crecimiento derivado de plaquetas, pertenece a una familia de moléculas que se caracterizan por estar formadas por 4 cadenas polipeptídicas codificadas por diferentes genes que dan lugar a cuatro isoformas, PDGFA, PDGFB, PDGFC y PDGFD, las cuales se combinan para formar homo y heterodímeros.

Estos ligandos se unen a sus correspondientes receptores PDGFR α y PDGFR β con actividad tirosina-quinasa para ejercer sus funciones.

Tanto las isoformas del PDGF como los receptores, juegan un papel importante durante la

embriogénesis, especialmente en el desarrollo de varios tipos de células mesenquimales en diferentes órganos. En el adulto estimulan la cicatrización de heridas y regulan la homeostasis tisular.

Esta familia está involucrada también en el crecimiento tumoral ya que estimulan las células del estroma tumoral, promueven la angiogénesis así como el desarrollo de los fibroblastos asociados a tumor (CAF), que a su vez promueven progresión tumoral (C-H.Heldin et al., 2018; Michael B. et al., 2018).

En cáncer de mama, diferentes estudios ponen de manifiesto su relación con la vía de señalización de PDGFR α y PDGFR β . Una alta expresión de PDGFR α , está asociada a metástasis en ganglios linfáticos, alto grado histológico, receptores hormonales negativos y un índice de proliferación Ki67 alto. Esto puede estar asociado tanto al cáncer de mama triple negativo como al subtipo HER2 positivo, por lo tanto a tumores con peores factores pronósticos. En cáncer de mama inflamatorio también está sobreexpresada esta vía (Madhura J-J et al., 2017).

La expresión del ligando PDGF-CC se asocia al subtipo basal-like y se caracteriza por la expresión de genes relacionados con las células epiteliales basales como keratin 5, keratin 17, integrina β 4 y laminina.

La expresión de PDGFR β en el estroma tumoral está asociado también a un pobre pronóstico de la enfermedad.

La alta expresión de PDGFR α junto con la de PDGF-CC, aparece asociada a uno de los subtipos tumorales más agresivo, el triple negativo. Además, la alta expresión de PDGF-CC aumenta el riesgo de recurrencia a distancia a cinco años. De ahí que esta vía de señalización juegue un papel muy importante en la progresión tumoral.

Con todo lo anterior, se ha postulado que la medición de PDGF en suero, puede servir como nuevo biomarcador pronóstico del cáncer de mama (Madhura J-J et al., 2017; Sara Jansson et al.,

2018).

2.5.1.3 TGF- β : El factor de crecimiento transformante β , pertenece a una superfamilia formada por unas 40 proteínas como las activinas (A, AB, B, C, E); inhibinas (A, B); proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y factores de crecimiento y diferenciación (GDFs). En humanos, TGF β se caracteriza por ser un polipéptido de 112 aa y es codificado por un gen que se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13). Existen cinco isoformas del TGF β con un 60-80% de homología entre ellas (β 1- β 5) que son generadas por splicing alternativo (Mark A. Travis et al., 2014).

La isoforma TGF β 1 es secretada en forma de homodímero, de 25 Kda de peso molecular y en la forma inactiva. Se secreta como un complejo latente (LTGF β), formado por la citocina y por el péptido asociado a latencia (LAP) que contiene la secuencia señal para la secreción, ambos están unidos por un puente disulfuro. Para que esta citocina sea activa y ejerza sus funciones, tiene que liberarse del LAP.

La activación se produce a través de múltiples mecanismos que dan lugar a la liberación de TGF β para unirse a los receptores T β RI, II y III que pondrán en funcionamiento la cascada de señalización intracelular. Los ligandos de TGF β se encuentran en su forma latente depositados en la matriz extracelular (ECM) (Flaumenhaft and Rifkin 1991). Estos complejos LTGF β de la ECM son activados por la integrina α β 6, calpaina, catepsina D, quimasa, elastasa, endoglicosidasa F, matrix metalopeptidasa 9 (MMP9), calicreina, neuraminidasa, plasmina y trombospondina 1 (TSP1) (Abe et al. 1998; Akita et al. 2002; Lyons et al. 1998; Miyazono and Heldin 1989; Munger et al. 1999; Schultz-Cherry and Hinshaw 1996; Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich 1993; Taipale et al. 1995; Yu and Stamenkovic 2000) (Harold Moses et al., 2011).

Parece ser que la radiación ionizante y las ROS tienen capacidad de activar los complejos latentes LTGF β . (Barcellos-Hoff and Dix 1996; Jobling et al. 2006).

En la vía de señalización TGF β 1, participan receptores específicos para la actividad de

señalización de TGF β 1 en las células. Estos receptores, son proteínas diméricas, T β RI (53KDa), es también conocido como, ALK5 (receptor-like kinasa 5); T β RII (75KDa); T β RIII (280KDa), son receptores transmembrana con actividad intracelular serina-treonina quinasa.

La isoforma TGF β 1 se encuentra presente mayoritariamente en plaquetas, linfocitos T reguladores (Treg), macrófagos, monocitos, linfocitos, fibroblastos, células epiteliales y células dendríticas.

Juega un papel importante en el crecimiento, en la maduración y diferenciación celular, en la formación de la matriz extracelular, en la homeostasis tisular, en la plasticidad de las células endoteliales, en la inmunorregulación, apoptosis, angiogénesis y en la progresión tumoral (G.D.Kallioliás et al., 2015).

Hay un fenómeno conocido como la “paradoja del TGF β en cáncer”, por un lado, es un potente inhibidor del crecimiento tumoral ya que actúa inhibiendo la fase G1 del ciclo celular regulando la expresión de genes que promueven la detención del ciclo (Joanna Magdalena Zarzynska, 2014).

En células epiteliales normales, induce expresión de p15InK4b, el cual inhibe el complejo de las ciclinas D-CDK4/6 y de p21 que inhibe el complejo de ciclina E/A-CDK2 y además promueve apoptosis, con todo esto genera supresión tumoral tanto al inicio como a la progresión. Sin embargo, se conoce otra característica de esta citocina, y es que promueve la transición epitelio-mesénquima (EMT), por lo tanto se considera inductor de la metástasis (Joan Seaone et al.,2017).

Además en el microambiente tumoral suprime la actividad antitumoral de los linfocitos T, de las células NK, de los neutrófilos, monocitos y macrófagos.

Es crucial en la homeostasis y en la tolerancia inmunes, inhibiendo la expansión y función de un gran número de componentes del sistema inmunitario, regulando la generación de funciones efectoras de las células inmunes (Eduard Batlle et al., 2019). Ejerce control sobre la respuesta inmunitaria adaptativa, promoviendo directamente la expansión de los Treg e inhibiendo la

generación y función de los linfocitos T efectores y de las CD presentadoras de antígeno.

Controla también de forma similar la respuesta inmunitaria innata, inhibiendo las células NK y controlando el comportamiento complejo de macrófagos y neutrófilos. El mal funcionamiento de esta vía de señalización va acompañada del desarrollo de enfermedades inflamatorias y cáncer. Es fundamental en la supresión inmunológica dentro del microambiente tumoral, ya que participa en el mecanismo de evasión inmune tumoral, pudiendo dar estos resultados deficientes en el tratamiento con inmunoterapia.

Paradójicamente, se ha descrito también que esta citocina tiene características como supresor tumoral, ya que puede inhibir el crecimiento y favorecer la apoptosis de células premalignas.

El papel principal de la señalización del TGF β en la tolerancia inmunológica y la respuesta inflamatoria, se obtuvo por primera vez en modelos murinos con mutaciones en el gen TGF β 1, estos morían al poco de nacer por una inflamación multiorgánica que se asemejaba a un trastorno autoinmune (Kulkarni et al., 1993; Shull et al., 1992; Eduard Batlle et al., 2019).

Posteriormente, se reveló también por mutaciones de pérdida de función en los genes MHC de clase II (Letterio et al., 1996; E. Batlle et al., 2019) o genes de la β 2-microglobulina (Kobayashi et al., 1999; E. Batlle et al., 2019), lo que implica que la pérdida del TGF β 1 causa una respuesta de células T desenfrenada.

Como se ha puesto de manifiesto anteriormente, es una vía que participa en la evasión inmune y en la tolerancia inmune, actuando sobre las células del sistema inmunitario de forma positiva o negativa, dependiendo de su naturaleza.

**Linfocitos T efectores (Th):* El desarrollo experimental ha revelado cómo actúa esta citocina sobre el funcionamiento de este grupo de células inmunes. Se sabe que las respuestas mejor caracterizadas de las células T frente a tumores, están mediadas por las Th1. Cultivando linfocitos T vírgenes con TGF β , resulta en la no diferenciación al fenotipo Th1 (Sad y Mosmann 1994; E.

Batlle et al, 2019). Otro experimento con ratones deficientes en TGF β 2 en células T, mostraron respuestas Th1 mejoradas (Gorelik y Flavell, 2000; Li et al., 2006; Marie et al., 2006; Śledzińska et al., 2013; Zhang y Bevan, 2012; E. Batlle et al., 2019).

Parece ser, que la señalización de TGF β interviene en la etapa más temprana de la activación de los linfocitos T, amortiguando la estimulación inicial del TCR desencadenada por un flujo de calcio (Chen et al., 2003; E. Batlle et al., 2019). De acuerdo con esto, las células T mutantes en TGF β 2, tienen mayor sensibilidad a la estimulación de TCR (Śledzińska et al., 2013; E. Batlle et al., 2019). Asimismo, la señalización del TGF β ejerce un papel inhibitorio en la diferenciación de los linfocitos T, al silenciar dos factores de transcripción de las células Th1, el T-bet y STAT4 (Gorelik et al., 2002; Lin et al., 2005; E. Batlle et al., 2019). Sabemos, que si se bloquea la activación de STAT4, esto inhibe la producción de INF γ durante la diferenciación de las células T, mientras que la pérdida de expresión de T-bet, afecta a la producción del INF γ durante la re-estimulación de los linfocitos T, después de la preparación inicial (Gorelik et al., 2002; Lin et al., 2005; E. Batlle, 2019). El TNF β , además de bloquear la diferenciación de las células Th1, inhibe la proliferación y las funciones de las células T.

Los primeros estudios sobre esto, revelaron que durante la fase de preparación, esta citocina bloquea la producción de IL-2, la cual es la responsable de la proliferación de las células T CD4+ (Brabletz et al., 1993; E. Batlle, 2019).

Esto parece estar mediado por SMAD3 (Mckarns et al., 2004;) junto con SMAD4 y el cofactor TOB1 (Tzachanis et al., 2001). La respuesta citostática y apoptótica de los linfocitos T al TGF β , se ha relacionado también con el control de varios componentes del ciclo celular como c-Myc, p21Cip1 y p27Kip1 (Genester et al., 1999; Wolfrum et al., 2004). Experimentos in vivo con ratones modificados genéticamente, revelaron que la alteración principal de las células T CD4+ y CD8+, deficientes en TGF β 2, es una activación mejorada del TCR a una respuesta antigénica débil y además exhiben funciones y fenotipos efectoros también mejorados, como es la expresión del receptor KLRG1 y la producción de granzima B e INF γ (Śledzińska et al., 2003; Zhang y Bevan, 2012). En cuanto a la acción del TGF β sobre los linfocitos T CD8+, inhibe directamente su

acción citotóxica (Thomas y Massagué, 2005). El mecanismo involucrado en esto es a través de SMAD estimulados por TGF β , junto con el factor de transcripción ATF1, reprimen los promotores de los genes involucrados en la función citostática de estos linfocitos, que son los de la granzima B y los del INF γ . Existe evidencia que un TME rico en TGF β , suprime la respuesta antitumoral de los Th1. Utilizando modelos murinos transgénicos deficientes para TGFBR2 tanto en los linfocitos T CD4+ como CD8+, se observó que eran resistentes a la formación de tumores tras la inoculación de líneas celulares cancerosas singénicas, este fenómeno se asoció con una gran expansión de los linfocitos T CD8+ reactivas a tumores (Gorelik y Flavell, 2001) (E. Batlle et al., 2019)

También se sabe que la regulación negativa de los factores de transcripción T-bet y EOMES por el TGF β , está asociado con el fenotipo CD8+CD103+ (Mackay et al., 2015). El papel de este tipo celular en cáncer, aún no es bien conocido. Varios estudios han puesto de manifiesto que el TME rico en TGF β favorece este fenotipo de linfocitos T y que su abundancia confiere buen pronóstico (Mami -Chouaib et al., 2018). Además, el tratamiento con inmunoterapia, refuerza su función citostática, lo que conduce a mejorar la respuesta inmune antitumoral (Edwards et al., 2018; Mami- Chouaib et al., 2018) (E. Batlle et al., 2019).

Otro estudio, sin embargo, ha revelado que estas células CD8+CD103+ inducidas por TGF β presentes en los nichos tumorales, se caracterizan por un fenotipo tolerogénico que facilita la evasión inmunitaria (Gabriely et al., 2017).

También ha quedado demostrado que esta citocina regula negativamente la diferenciación de las células *Th2*, esto se debe a la inhibición por parte del TGF β del factor de transcripción GATA3, imprescindible en la diferenciación de estas células. También inhibe indirectamente a SOX4 que se une directamente a GATA3 e inhibe su actividad transcripcional. Además, SOX4 inhibe la producción de IL-5 producida por las Th2 (Travis et al., 2015).

En la última década, la investigación ha destacado el papel del TGF β en la mejora de la respuesta proinflamatoria de las células T, de ahí que sea importante en la inducción de las células *Th17*, productoras de IL-17 y del factor de transcripción ROR γ t. La inducción de las células Th17 por el

TGF β , requiere de la participación de citocinas proinflamatorias, como IL-6 e IL-1, que pueden tener funciones diferentes en la inducción de estas células. La IL-23, también es importante en dicha inducción, de hecho la IL-6 ha demostrado que induce la expresión, tanto del receptor de la IL-23 como de la IL-21, en las células T, mejorando esto la diferenciación de las células Th17. La importancia funcional del TGF β en la diferenciación de las células Th17 se ha demostrado en modelos murinos, in vivo. Se ha observado que los ratones que carecen de TGFBR2 en los linfocitos T, tienen un número reducido de células Th17 y estarían protegidos del desarrollo de EAE, la inyección local de anticuerpos antagonistas del TGF β , también protege contra dicha enfermedad, ya que la sobreexpresión de esta citocina en las células T induciría un SNC inflamado y por lo tanto una EAE grave.

Ha sido reportado, que además de TGF β 1, la isoforma alternativa TGF β 3, es crucial para la inducción de su función efectora, lo que sugiere que los efectos específicos de las isoformas pueden ser importantes en la diferenciación de estas células. Con todo esto, los mecanismos de señalización de TGF β en la diferenciación de las células Th17, son controvertidos, ya que no queda aún claro la participación de la señalización de SMAD.

Se requieren más estudios para aclarar el papel de la señalización de SMAD en la inducción de las células Th17 (Travis et al.,2015).

Otro subconjunto de linfocitos TCD4+ proinflamatorios inducidos por la acción del TGF β , son los *Th9*, que secretan IL-9 y pueden provocar inflamación. La inducción de estas células requieren TGF β que actúa sobre el factor de transcripción PU.1, e IL-4. Se ha observado que la adición de IL-4 a cultivos in vitro, bloquea la inducción de Treg mediada por el TGF β , a favor de la producción de IL-9. El TGF β también puede sesgar las células Th2 hacia un fenotipo Th9. Utilizando un modelo de ratón reporter de IL-9, se observó que la mayor cantidad de IL-9 la producían las células de linfocitos innatas, ILC2. Con estos datos se considera hacer más estudios sobre el papel mediado por el TGF β en la producción de IL-9 (Travis et al., 2015)

En cuanto a los Treg, el TGF β junto con la IL-2, dan lugar a un fenotipo supresor en células T

vírgenes ex vivo, al desencadenar la expresión de FOXP3, el factor de transcripción principal de los Treg (Chen et al., 2003 ; Fantini et al., 2004). De acuerdo con esto, la delección génica de SMAD2 y SMAD3, resultó en la pérdida de la regulación positiva de FOXP3 por TGFβ (Takimoto et al., 2010). Los SMAD cooperan junto con el factor de transcripción NFAT en la unión a un elemento regulador distal en el locus de FOXP3 (Tone et al., 2008). Examinando datos transcriptómicos de melanoma y cáncer de mama, se ha dilucidado que la expresión de FOXP3 se relacionan con los niveles de TGFβ (Ravi et al., 2018). También se ha puesto de manifiesto que un entorno rico en TGFβ, característico de los tumores en etapas avanzadas , promueve la diferenciación de las células T en un fenotipo Treg (M. Liu et al., 2018).

Igualmente, el TGFβ junto con la prostaglandina E2, desencadenan la diferenciación de Th17 a Treg en tumores (Downs-Canner et al., 2017).

Por el contrario, la inhibición de la señalización de TGFβ y VEGF, reduce el número de Treg y restaura la sensibilidad al tratamiento con anti-PD-1 y anti-CTLA4 (Courau et al., 2016).

Los Treg utilizan el TGFβ para suprimir las respuestas inmunitarias antitumorales (Chen et al., 2005; Mempel et al., 2006). De hecho, los Treg transportan TGFβ1 latente en su superficie, unido por enlace disulfuro a una proteína transmembrana, GARP, con esto parecen tener un fenotipo supresor mejorado que se asemeja con respuestas antitumorales de las células T más deterioradas (Kalathil et al., 2013).

*CDs : Este tipo celular es central en la regulación de las respuestas inmunitarias mediadas por Th1 y Treg, generadas a través de la señalización del TGFβ. Estas células son las más importantes en cuanto a la presentación de antígenos y son claves en la inmunidad tumoral. El TGFβ inhibe la capacidad de presentación de antígenos por estas células in vitro, al suprimir la expresión de genes de MHCII (Nadan y Reiner 1997; Piskurich et al., 1998). Utilizando modelos tumorales, se ha observado que las células cancerosas favorecen la secreción de TGFβ por parte de las células dendríticas, lo que promueve la adquisición de un fenotipo de Treg por parte de las células TCD4+ (Dumitrin et al., 2009; Ghiringhelli et al., 2005). Por lo que, el TME favorece la diferenciación de

las CD a un fenotipo inmunosupresor de célula mielóide inmadura con potentes funciones inmunosupresoras, este cambio de fenotipo está mediado por un regulador transcripcional, ID1, componente de la vía de señalización del TGF β (Papaspyridonos et al., 2015). La tolerancia inmune de las CD está mediado en parte, por la acción de moléculas inmunosupresoras comoIDO y la arginasa a través del TGF β (Belladonna et al., 2008; Pallota et al., 2011). En modelos de cáncer de mama y melanoma, la señalización de TGF β media la evasión inmune regulando al alza IDO en las CD plasmocitoides y a la quimocina CCL22 en las CD mieloides, de manera que éstas CD facilitan la infiltración de Treg y favorecen un ambiente inmunosupresor (Hanks et al., 2013).

*NK: La señalización de TGF β bloquea la función de éstas células a múltiples niveles. Silencia la expresión de INF γ y de TBET, inhibiendo así la respuesta Th1 (Laouar et al., 2005; Yu et al., 2006).

Este mecanismo es contrarrestado por señales inflamatorias que disminuyen los niveles de TGFBR2 y suprimen también la señalización de SMAD en éstas células (Yu et al., 2006).

El TGF β silencia la expresión de dos receptores de superficie de las células NK, NKG2D y NKp30, involucrados en el reconocimiento de células transformadas en malignas (Castriconi et al., 2003). De hecho se ha observado que existe una correlación inversa entre los niveles de TGF β 1 y de NKG2D en cáncer de pulmón, en colorrectal y glioblastomas (Crane et al., 2010; Lee et al., 2004). Además los niveles de DAP12, un adaptador de varios receptores citotóxicos, incluido NKG2D, están regulados negativamente por miR-183, inducido a su vez por TGF β (Donatelli et al., 2014).

Según Cortez y colaboradores (2016), éstas células se caracterizan por ser plásticas de ahí que puedan cambiar de fenotipo en respuesta a TGF β , independientemente de SMAD4. El análisis de modelos tumorales reveló que un TME rico en TGF β facilita la evasión inmune al favorecer la diferenciación de las células NK a células linfóide innatas tipo 1 (ILC1), que carecen de acción citotóxica (Gao et al., 2017).

*Macrófagos: Estas células son unas de las principales en la producción de TGF β , concretamente por los macrófagos asociados a tumor (TAM). Esta citocina interviene sobre el linaje de

monocitos/macrófagos dependiendo del estado de diferenciación y del contexto. Los primeros estudios sobre esto evidenciaron que el TGF β , actúa como quimioatrayente para los monocitos en los sitios inflamados y regula positivamente las moléculas de adhesión que permiten la unión de los monocitos a la ECM (Allen et al., 1990; Wahl et al., 1993). Un mecanismo similar a esto puede ocurrir en tumores, por ejemplo en tumores de cáncer de mama, estas células secretan TGF β que a su vez regula al alza a CXCR4 en los monocitos, mientras que CXCL12 secretado por los fibroblastos perivasculares atrae a estos monocitos a los nichos tumorales. Posteriormente los monocitos se diferencian a macrófagos perivasculares y facilitan la extravasación de las células tumorales al favorecer el paso a través de los vasos sanguíneos (Arwert et al., 2018).

La señalización de esta citocina en macrófagos, inhibe las respuestas antiinflamatorias mediadas por el factor de transcripción NF- κ B, en esto también están implicados los SMAD inhibidores como SMAD6 y SMAD 7.

El mecanismo implicado en esta función del TGF β es que promueve la degradación de MYD88, una proteína adaptadora utilizada por los receptores tipo Toll (TLR), excepto TLR3, que activa la señalización NF- κ B. SMAD6 induce la poliubiquitinación de MYD88, a través del reclutamiento de E3 ubiquitinas ligasas, SMURF1/2 en macrófagos peritoneales estimulados por TGF β (Lee et al., 2011; Naiki et al., 2005). SMAD6 también secuestra la proteína Pellino-1, que es requerida por IL-1R-TLR, para promover una respuesta inflamatoria (Choi et al., 2006).

TGF β 1 suprime el fenotipo inflamatorio de los macrófagos mediante crosstalk con la vía de señalización del TNF, a través de SMAD7 que bloquea la actividad quinasa de TAK1 inducida por el factor de necrosis tumoral (Hong et al., 2007). Estos mecanismos aún no han sido estudiados formalmente en el contexto del cáncer.

**Neutrófilos*: Representan alrededor del 80% de todos los leucocitos sanguíneos y juegan un papel clave en el control de las infecciones. Se sabe que los pacientes con cáncer pulmón, colorrectal y mama, tienen mayor número de neutrófilos circulantes, asociado con un mal pronóstico de la enfermedad (Gentles et al., 2015; Templeton et al., 2014). Análisis funcionales en modelos tumorales, han revelado un papel importante de estas células durante la progresión

tumoral (Coffelt et al., 2016). Paralelo al fenómeno de polarización de los TAM, los neutrófilos asociados a tumor (TAN), adoptan características antitumorales o protumorigénicas. En ratones portadores de mesotelioma, el tratamiento con antagonistas del TGF β , refuerza el fenotipo antitumoral de los TAN con actividad citolítica y expresión elevada de citocinas proinflamatorias (Fridlender et al., 2009).

Existe controversia sobre si los TAN son neutrófilos maduros o por el contrario representan células polimorfonucleares inmaduras. Está bien establecido que la infección crónica, la inflamación o el cáncer, inducen una estimulación persistente de la mielopoiesis que da como resultado, células similares en morfología a los neutrófilos y monocitos, pero con una potente capacidad inmunosupresora sobre la respuesta inmunitaria (Coffelt et al., 2016; Gabrilovich 2017). Esto hace referencia a las células supresoras de origen mieloide (MDSC).

*MDSC: Se caracterizan por su infiltración en tumores y por jugar un papel importante durante la evasión inmunitaria del cáncer. El 80% de ellas tienen un fenotipo polimorfonuclear (PMN-MDSC), similar al de los neutrófilos y pueden ser reconocidas por citometría de flujo mediante marcadores de superficies característicos de neutrófilos C11b+Ly6G⁺ (Coffelt et al., 2016; Gabrilovich, 2017). La señalización de TGF β en las MDSC favorece la progresión tumoral y por tanto la metástasis, en modelos animales. En modelos murinos con delección mieloide específica de TGFBR2, se observó que estos ratones, eran en gran medida resistentes a la formación de metástasis tras el trasplante de líneas celulares singénicas de cáncer de mama, pulmón y melanoma. Este efecto se relacionó con niveles bajos de citocinas tipo 2 en MDSC y el aumento de expresión de INF γ por los linfocitos T CD8⁺, lo que hizo mejorar las respuestas antitumorales (Pang et al., 2013). En este mismo estudio se pudo objetivar que el crecimiento del tumor primario no se vio afectado por la pérdida de TGFBR2 en las células mieloides, lo que supuso un papel específico para las MDSC activadas por TGF β en el nicho metastásico. En contrapartida a los efectos promotores de tumores debido a la señalización de TGF β sobre neutrófilos y MDSC, varios estudios han manifestado que la inhibición de la vía de señalización de esta citocina en células tumorales, da como resultado el reclutamiento de células mieloides inmaduras y MDSC al TME. En un modelo de ratón de cáncer colorrectal invasivo generado al inactivar Apc y SMAD4 en

el epitelio intestinal, mostró una fuerte infiltración de células mieloides inmaduras CCR1+, mediado por la regulación positiva del quimioatrayente CCL9 (Kitamura et al., 2007). Además, en este mismo estudio se objetivó que estas células mieloides inmaduras presentes en el TME expresaban metaloproteasas de matriz que facilitan la invasión de las células tumorales generando metástasis.

En un estudio llevado a cabo por el equipo de Cho-Rong Lee, probaron el efecto del TGF β en combinación con otras citocinas como la IL-6, IL-4, G-CSF sobre las MDSC, llegaron a la conclusión, independientemente de la acción del resto de citocinas, que el TGF β aumenta la población de M-MDSC, en general y disminuye el de G-MDSC. También se observó que dicha citocina aumentaba la expresión de moléculas inmunosupresoras generadas tanto por las M-MDSC como por las G-MDSC.

Con todo esto, la acción supresora de las MDSC sobre la proliferación de los linfocitos T CD4+ también aumentó por acción de esta citocina.

Es evidente que la respuesta inmunosupresora del TGF β permite la evasión de la respuesta inmune por parte de los tumores y por lo tanto se podría considerar a esta citocina como un atractivo terapéutico en el contexto de la inmunomodulación del cáncer (Li y Flavell, 2008) (Figura 17).

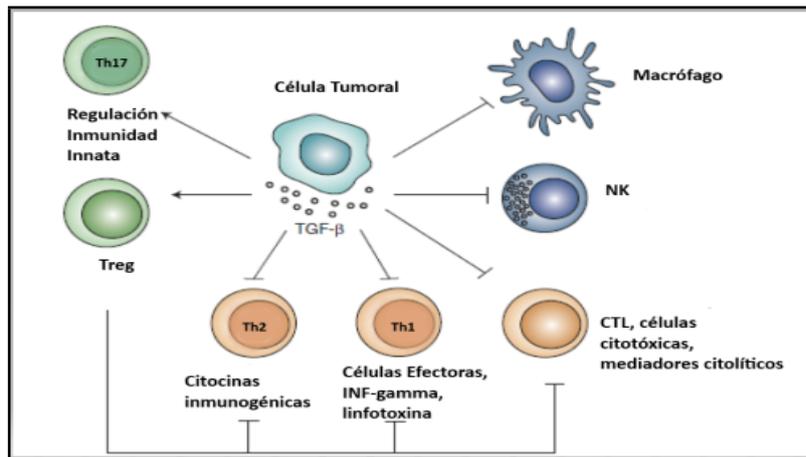


Figura 17. Efectos pleiotrópicos del TGFβ en el sistema inmunitario. Cold Spring Harb Perspect Biol 2017 (Adaptada de J. Seoane y R.R. Gomis)

La actividad del TGFβ1 sobre las células epiteliales de la glándula mamaria se conoció hacia 1987 por el grupo de Daniel y Silberstein, en un modelo murino demostraron que ésta citocina actúa sobre el crecimiento y morfogénesis de esta glándula. Más tarde el grupo de Lippman, demostró que TGFβ1 lo producían las células tumorales de cáncer de mama y además contribuía a la hormono-resistencia de este tumor (Knabbe et al. 1987). Durante el desarrollo de la glándula mamaria, el TGFβ estromal actúa como inhibidor de la proliferación y morfogénesis. En el tejido adulto, el TGFβ del epitelio mamario regula la respuesta a las hormonas, como a estrógenos y progesterona.

Las células epiteliales que expresan el receptor de estrógenos (ER) establecen una señal paracrina sobre aquellas que no lo expresan y TGFβ actúa restringiendo la proliferación de ambas.

La expresión aberrante del TGFβ en cáncer de mama genera un comportamiento invasivo de la célula tumoral a través de la transición epitelio-mesénquima. También favorece la angiogénesis y vasculogénesis tumoral favoreciendo la expresión de otras citocinas y reclutando células mieloides supresoras. Niveles altos en plasma de esta citocina, se correlacionan con el estadio de la enfermedad y se ha propuesto como predictor de respuesta a los tratamientos.

2.5.1.4 VEGF/VEGFR: Factor de crecimiento endotelial vascular. El más conocido es el VEGF-A. Pertenece a una familia de proteínas que incluye a VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y PLGF (factor de crecimiento placentario). Difieren en los patrones de expresión, en la especificidad por el receptor y en sus funciones biológicas. VEGF-A tiene un papel principal en la angiogénesis. VEGF-C y VEGF-D están principalmente implicados en la linfangiogénesis. En esta familia encontramos diferentes variantes que surgen por splicing alternativo y también difieren en la especificidad por el receptor y sus funciones (VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF183, VEGF189 y VEGF206). VEGF165 (VEGF164 en ratón) es la isoforma más frecuentemente expresada en tejidos y en tumores sólidos. Se conocen tres receptores con actividad tirosina-kinasa, VEGFR 1 (de Vries et al. 1992), también conocido como FLT1, VEGFR 2 (Terman et al.1992) conocido como FLK1 y KDR y VEGFR 3, conocido como FLT4, todos se expresan en células endoteliales y además es conocida su expresión en algunos tumores, lo cual se relaciona con parámetros clínicos.

La hipoxia es un importante regulador de la expresión de VEGF a través del factor inducible de hipoxia (HIF). HIF y otros genes regulados por hipoxia, factores como EGF, PDGF y mutaciones oncogénicas (vhl, Ras, Wnt-Kras) coordinan la expresión de VEGF y a su vez la señalización que lleva a cabo VEGF (Sementa 2000).

La vía canónica de VEGF a través de VEGFR1/2, regula la actividad de varias quinasas que llevan a cabo proliferación celular, migración, supervivencia y permeabilidad vascular durante la vasculogénesis y la angiogénesis. Todo esto está regulado a nivel molecular por la vía Notch.

Las funciones del VEGF no sólo se limitan a la angiogénesis y a la permeabilidad vascular, si no que se ha visto que afecta a las funciones de las células inmunes que forman parte del microambiente tumoral. Además, los receptores VEGFR pueden afectar las funciones de los fibroblastos que componen el estroma tumoral. Cabe destacar que la señalización autocrina y paracrina por parte del VEGF en las células tumorales intervienen en la tumorigénesis, especialmente sobre las células madre cancerosas independiente de la angiogénesis (H.L.Goel et al., 2013).

El VEGF expresado tanto en las células tumorales como en el estroma tumoral estimula la

proliferación y supervivencia de las células endoteliales lo que conlleva a la formación de vasos sanguíneos estructuralmente anormales (Ferrara 2010, Jain 2003, Nagy et al. 2009).

El ARNm que codifica para el VEGF está sobreexpresado en la mayoría de los tumores humanos y está relacionado con invasividad, densidad vascular, metástasis, recurrencia y mal pronóstico (Kerbel 2008).

A nivel del sistema inmune el VEGF puede tener efecto directo sobre células dendríticas, linfocitos T, linfocitos Treg y MDSC (Khan and Kerbel 2018). Puede afectar a la maduración de los progenitores mieloides impidiendo la diferenciación de las células dendríticas a células endoteliales y la activación de los linfocitos T (Gabrilovich et al. 1998). También puede afectar a la expresión de moléculas inmunológicas importantes en las células endoteliales como VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecula 1), la cual juega un papel importante en la adhesión e infiltración de los linfocitos T en el tumor. Asimismo, VEGF parece incrementar la expresión de FASL, favoreciendo la apoptosis de las células T en el lecho tumoral.

Tanto en modelos murinos como humanos (Wallin et al.2016) se ha visto que la inhibición de VEGF hace aumentar el número de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) (Hung et al. 2013; Shrimali et al. 2010). Y por el contrario, altos niveles de VEGF en el microambiente tumoral estimula la proliferación de Treg y MDSC ya que ambos expresan VEGFR (Hedge et al., 2018). El receptor involucrado en el desarrollo de las MDSC es principalmente el VEGFR2. La acción del VEGF, secretado por las células tumorales sobre las MDSC, es como quimioatrayente hacia el TME, favoreciendo esto la formación de nuevos vasos sanguíneos por el tumor y con ello la metástasis. Favorece la salida de éstas células desde la médula ósea a sangre periférica. Asimismo, la unión del VEGF a su receptor facilita genera mayor producción de ROS, a través de la vía JAK2/STAT3. Las propias MDSC pueden generar VEGF creando así un circuito de retroalimentación autocrina positivo (E-K Vetsika, 2019).

En el contexto del cáncer de mama, el VEGF se ha visto que juega un papel muy relevante en la progresión y en el pronóstico de la enfermedad. Estudios realizados en pacientes en estadios

tempranos de la enfermedad, objetivan que una alta expresión de VEGF está asociado a una baja supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. En tumores con sobreexpresión de HER2 y en triple negativo hay una elevada expresión de VEGF que está relacionada con una corta supervivencia global (Brian D. Lehmann et al., 2014).

Por estos motivos, el eje VEGF/VEGFR ha sido propuesto como diana antiangiogénica, entre los cuales el bloqueo de ligandos ha sido el más estudiado (Ricardo H. Álvarez et al., 2011; Hira L. G. et al., 2013; Elham F. et al., 2014).

2.5.2. Citocinas inflamatorias e inmunoreguladoras asociadas al cáncer de mama.

Las citocinas son moléculas de naturaleza peptídica secretadas por monocitos/macrófagos, DC, células endoteliales, leucocitos y fibroblastos. Son de naturaleza soluble, tienen bajo peso molecular y regulan la actividad celular a concentraciones muy bajas de nano o picomoles. Intervienen en la respuesta inmune tras el estímulo antigénico, participando así en las respuestas de tipo Th1 y Th2 (López-Martin JA et al., 2018).

2.5.2.1 Citocinas relacionadas con la respuesta tipo Th1

- **IL-2/IL-2R:** proteína globular glicosilada formada por 4 hélices, compuesta por 153 aa y con un peso molecular de 15.5 kDa. Cuando se descubrió por primera vez se le conoció como *factor de crecimiento de las células T (TCGF)*, ya que era un potente mitógeno y regulador del crecimiento de las células T in vitro.

El receptor de la IL-2 puede ser monomérico, dimérico y trimérico y está formado por tres polipéptidos: antígeno Tac, ahora conocido como CD25 o cadena α del receptor IL-2, IL-2R α , es la forma monomérica del receptor y está asociada a la membrana celular, aunque también puede estar en forma soluble.

Las formas diméricas de IL-2R integran a IL-2R β o CD122 y a la IL-2R γ , más conocida como γ c o CD132. Y las formas triméricas están formadas por CD25, CD122 y γ c. Destacar que CD122 también forma parte de la IL-15R, mientras que γ c es compartida también por IL-4, IL-7, IL-9, IL15 e IL-21.

El descubrimiento tanto de la IL-2 como de su receptor, fueron fundamentales para destacar la importancia de las citocinas secretadas para el control de la proliferación y diferenciación de las células T. De hecho se observó que la pérdida de la cadena γ c era la base molecular de la enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X (XSCID).

Los receptores de la IL-2 se unen a GTPasas citosólicas y a serinas/treoninas quinasas. Estos receptores utilizan para su funcionamiento los miembros de la familia JAK, para inducir la traducción de señales, la cadena IL-2R β se une a JAK1, la cadena γ c se une a JAK3 y esto da como resultado la activación JAK1/3. De esta forma, los inhibidores selectivos de JAK1 y/o JAK3 bloquean las respuestas proliferativas mediadas por la IL-2.

El descubrimiento de este eje de conexión IL-2/JAK condujo al conocimiento de que la IL-2 inducía fosforilación de tirosina y unión al ADN de una proteína de alto peso molecular de la familia del traductor de señales y activador de transcripción STAT. Esos residuos de tirosina estaban situados concretamente en el extremo C-terminal de las proteínas STAT5, STAT5A_Y694 y STAT5B_Y699. Además de la fosforilación de los restos de tirosina también se fosforilan restos de serina inducido por la IL-2 para regular la función transcripcional de STAT5. Estos residuos de serina son, STAT5 S127 y/o S128, pudiendo influir en la transcripción de dicha proteína. La IL-2 también puede regular a otras STAT e inducir fosforilación de STAT3 en Y705 y S727 y fosforilación en STAT1 en Y701 (Arenas-Ramirez N. et al., 2015; Sarah H. Ross et al., 2018).

La activación de STAT5 está mediada por JAK1 y JAK3 ya que éstas generan una serie de fosforilaciones de restos de tirosina de la cadena IL-2R β , concretamente Y338, Y392 e Y510 en el receptor humano, que en el receptor IL-2R β en ratón se corresponde con Y341, Y395 e Y498. La

fosforilación concretamente de los restos de Y395 e Y498, permite el reclutamiento de factores de transcripción STAT5A y STAT5B, a través de los dominios SH2, después de su fosforilación las proteínas STAT5 se disocian de la subunidad IL-2R β y forman dímeros a través de su dominio SH2, lo que induce activación transcripcional y la consiguiente translocación al núcleo. Estos dímeros STAT se pueden unir a secuencias de ADN activadas por secuencias GAS (gamma interferon activation site) para inducir la transcripción. Estos dímeros STAT5 pueden formar a su vez tetrámeros a través de interacciones entre residuos I28, F81 y L82, en sus regiones N-terminales. Los tetrámeros STAT5 se unen a secuencias GAS separados por un conector de 6 a 22 nucleótidos.

Estudios mutacionales demuestran que los dímeros y tetrámeros STAT5 son importantes para la expresión génica inducida por IL-2.

La activación de la vía IL-2/STAT5 es clave para las acciones biológicas de la IL-2. Los procesos transcripcionales mediados por STAT5 A/B han sido estudiados en ratones knockout y se ha visto que si son deficientes en STAT5 A/B no generan linfocitos Treg, lo que demuestra el papel crucial para el eje IL-2-JAK1/3-STAT5 en el desarrollo de los Treg. En humanos se ha visto también que la pérdida de función de STAT5, está asociada a la pérdida de Treg. Con esto queda claro, que tanto STAT5A y STAT5B son cruciales en la vía de señalización de la IL-2. Se han hecho análisis de los sitios de unión de STAT5 mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en linfocitos T CD4⁺ y han demostrado que varios factores de transcripción esenciales son genes diana directos de STAT5A y STAT5B, esto incluye a FOXP3, Tbx21 (T-bet), Maf y GATA3. Otros genes a los que se une STAT5 son: Il2ra, Ilrb2 e Il4ra. La IL-2 induce su expresión, manteniendo así su propia señalización y hacer que las células T sean susceptibles a otras citocinas y promover la diferenciación de las células Th1 y Th2.

Otro gen diana de STAT5 es SOCS3 que codifica una proteína que regula negativamente la vía de señalización de la IL-2 (Arenas-Ramirez N. et al., 2015; Sarah H. Ross et al., 2018)

No todos los sitios de unión de STAT5 están asociados a un aumento de la expresión génica ya

que la unión al locus *Il17a- Il17f* es represiva e inhibe la transcripción mediada por STAT3 del gen *Il17* y por lo tanto suprime la diferenciación de las células Th17. También se une al gen *Bcl6* reprimiendo su expresión en líneas hematopoyéticas y en células T CD4+. Hay otros mecanismos por los cuales STAT5 puede regular la expresión génica en linfocitos T, como es el reclutamiento de las ARN polimerasas II, proteínas co-activadoras o depresoras o enzimas de remodelación de la cromatina, estos aún no han sido dilucidados.

Otra vía clave en el mecanismo de señalización de la IL-2, es la vía Ras, mediada por SHC es fosforilado en el residuo de tirosina Y317 (Y313 en ratón) en respuesta a la activación del receptor de la IL-2. SHC fosforilado forma un complejo con el dominio SH2 del GRB2 que se une a través de sus dominios en tandem SH3 a la proteína SOS de intercambio de nucleótidos de guanina.

Este complejo cataliza el intercambio de GDP por GTP en Ras, permitiendo que Ras se acumule en su estado unido a GTP y active la cascada de quinasas MAP Raf-ERK.

Otra serina/treonina quinasa importante para la traducción de señales por activación del receptor de la IL-2, es la vía m-TOR. La mTOR quinasa está formada por complejos de quinasas diferentes, m-TORC1 y m-TORC2. Las subunidades centrales de m-TORC1 son: m-TOR, RAPTOR y m-LST8 y las de m-TORC2 son: m-TOR, RICTOR y m-LST8. La importancia del complejo m-TOR en la biología de las células T se pone de manifiesto con un inhibidor de m-TOR, la rapamicina que actúa como inmunosupresor de las células T. La diferenciación de los linfocitos T CD4+ en células Th1 es inhibida cuando la célula T carece de la m-TOR quinasa, RHEB y RICTOR lo que implica a los dos complejos m-TORC1 y m-TORC2 en el desarrollo de los Th1. Las Th2 parecen depender de la señalización de m-TORC2 ya que las células T deficientes en RHEB fueron capaces de diferenciarse en Th2, pero las células deficientes en m-TOR y RICTOR no. La IL-2 mediada por la activación de m-TORC1 está involucrada en suprimir la diferenciación de las células Tfh (Sara H. Ross et al., 2018).

En los linfocitos T CD8+, la IL-2 induce la activación de m-TORC1 que parece jugar un papel

importante en la configuración del proteoma de los CTL, en el control metabólico para generar energía, ya que requiere una fuente constante de aminoácidos como leucina, glutamina y arginina. Participa como transportador de estos aminoácidos, la molécula SLC7A5, que es un transportador de aminoácidos del sistema L, y que es considerado el transportador de leucina regulado por IL-2 más altamente expresado en los CTL. Además depende de la disponibilidad de glucosa. Los CTL detectan los niveles de glucosa a través de una proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Si los niveles de glucosa suministrados a la célula T son limitados, se activa la AMPK, esto desencadena una vía de retroalimentación negativa que disminuye la actividad de m-TORC1. De hecho si se pierde la señalización de m-TORC1, en los CTL disminuye la expresión de los transportadores de glucosa, de las enzimas glucolíticas y por tanto disminuye la tasa de glucólisis, mientras se mantienen las vías de fosforilación oxidativa.

También, se requiere la acción de m-TORC1 para mantener la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de colesterol como la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa. Por otro lado, la actividad de m-TORC1 puede suprimir algunas vías metabólicas en los CTL, como es el proceso de glutaminólisis (Sara H. Ross et al., 2018).

Otra función importante de m-TORC1 en los CTL, es controlar la expresión de moléculas efectoras como las perforinas, granzimas e INF γ . Un paso clave en la diferenciación de los CTL efectores es desactivar la expresión de los receptores de quimocinas y moléculas de adhesión como CD62L, CCR7 y S1P1 que dirigen a las células T naïves y de memoria hacia los órganos linfoides secundarios. Esto es importante para promover que los CTL se dirijan hacia los tejidos periféricos donde ejerzan su función que es la destrucción de células tumorales o células infectadas por patógenos. En el control de m-TORC1 sobre las funciones de los CTL interviene otra molécula que es el factor de transcripción HIF α , este forma un complejo con ARNT/HIF1 β para regular la expresión génica. HIF1 α controla una serie de genes regulados por m-TORC1, incluidos los transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT3), genes implicados en la glucólisis y el piruvato y el gen que codifica para la perforina. La vía de HIF1 es crítica para que m-TORC1 reprima la expresión de las moléculas CD62, CCR7 y S1P1 en los ganglios linfáticos (Sara H. Ross et al., 2018).

La IL-2 también está implicada en el control de la vía de señalización de PI3K en los CTL. Las actividades de las serinas/treoninas quinasas que se unen a la PI(3,4,5)P3, juegan un papel importante en la diferenciación de los CTL. PDK1 controla la actividad de AKT en estos linfocitos a través de la IL-2, PI(3,4,5)P3 facilita que PDK1 fosforile a AKT en T308, activándola. El eje PI3K/AKT es clave para la diferenciación de los linfocitos T efectores debido a la capacidad de AKT para fosforilar y reprimir las actividades de otros factores de transcripción como FOXO1/3. FOXO1/3 regula el destino de los linfocitos T ya que por un lado induce la expresión de moléculas linfoides y por otro reprime la expresión de moléculas efectoras de los CTL, dirigiendo así la diferenciación de las células T CD8+ efectoras/ memoria, de ahí que la activación del eje PI3K/AKT sea fundamental para la diferenciación de los linfocitos T efectores (Sara H. Ross et al., 2018).

La IL-2, es una citocina inmunomoduladora que permite la proliferación de las poblaciones de células T. Influye en la diferenciación de los linfocitos T efectores y es determinante en el destino de éstos una vez que son activados por el antígeno. Los linfocitos CD4+ α/β se diferencian después de la activación inmune en subpoblaciones efectoras que se diferencian en la producción de citocinas, en la expresión de reguladores transcripcionales específicos y en los requisitos de citocinas. Las células Th1 producen INF γ y dependen de las señales de IL-12 con lo cual estas células dependen de la expresión del receptor de IL-12R, que está formado por IL-12R β 1 e IL-12R β 2 y de la activación de los factores de transcripción STAT4 y T-bet. Las células Th2 producen las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 y dependen de las señales de la IL-4 y por lo tanto de la expresión de su receptor, IL-4R α y γ c y de los factores de transcripción STAT6 y GATA3. Las células Th17 se caracterizan por llevar a cabo el control sobre las funciones de los neutrófilos y además actúan sobre la integridad de la barrera epitelial. Producen IL-17A, IL-17F e IL-22 y dependen de las señales de la IL-6 junto con TNF β , IL-23 e IL-21. Estas señales activan a la vía de STAT3 y al factor de transcripción ROR γ t para promover la diferenciación de las células Th17. Finalmente, las células T foliculares (Tfh) apoyan la respuesta inmune mediada por los linfocitos B y la formación del centro germinal en el bazo. Estas células requieren IL-21 e IL-6 para su desarrollo. El gen Bcl6 actúa como regulador de la diferenciación de los linfocitos Tfh (Sarah H. Ross et al., 2018)

La IL-2 tiene un papel fundamental en el destino de los linfocitos T CD4+ una vez son activados por el antígeno. Por un lado, promueve la diferenciación a Th1 y Th2 y por otro, suprime la diferenciación a células Th17 y Tfh. Esta citocina controla el destino de los linfocitos T CD4+ a través de receptores claves de citocinas, factores de transcripción, reguladores de la cromatina y citocinas efectoras. De esta manera, por ejemplo, la IL-2 induce la expresión de eomesodermina, T-bet (Tbx21) y Blimp-1, mientras suprime a Bcl6 (Arenas-Ramirez N. et al., 2015; Sarah H. Ross et al., 2018).

Además puede regular cómo las células pueden responder a otras citocinas proinflamatorias por estimulación de la expresión de las cadenas del receptor IL-12R, IL-12R β 1 e IL-12R β 2 y del receptor IL-4R α y por otro lado suprime la expresión del receptor IL-6R α y gp130 y del receptor IL-17R.

Sobre los linfocitos T CD8+ favorece sus funciones, ya que cuando estos se ponen en contacto con el antígeno proliferan y se diferencian a linfocitos citotóxicos efectoras (CTL) produciendo citocinas proinflamatorias como INF γ y adquieren la capacidad de matar a las células infectadas, la IL-2 lo que hace es inducir la expresión de INF γ , TNF α y linfotóxina α y también de moléculas citolíticas como la granzima B y la perforina, promoviendo así la muerte celular ((Arenas-Ramirez N. et al., 2015; Sarah H. Ross et al., 2018).

La IL-2 controla también el tamaño de los CTLs mediante la regulación de la absorción de aminoácidos y síntesis de proteínas. La mayoría de estas células mueren una vez eliminan al patógeno, sin embargo un número pequeño de ellos sobrevive como célula T de memoria, así la IL-2 controla el equilibrio entre células T efectoras y células T de memoria. Altos niveles de IL-2 conduce al fenotipo de linfocito T efector ya que promueve la expresión de moléculas efectoras citolíticas y citocinas secretadas por los linfocitos T CD8+. En este caso induce la expresión de Blimp-1 mientras suprime la expresión de Bcl6, de la cadena α del IL-7R α (CD127) y de la L-selectina (CD62L). Por el contrario, dosis bajas de IL-2 dan lugar al fenotipo de memoria en las células T CD8+ y a un fenotipo similar a Tfh o de memoria en las células T CD4+. Dosis bajas de IL-2 favorecen la expresión de Bcl6, IL-7R α y L-selectina, estas a su vez bloquean la expresión de moléculas citolíticas permitiendo así la maduración de las células de memoria (Arenas-Ramirez N.

et al., 2015; Sarah H. Ross et al., 2018).

Algunos estudios ponen de manifiesto el papel que juega la IL-2 y su receptor en la etiopatogenia del cáncer de mama.

Ridings et al., realizaron un estudio inmunohistoquímico in vivo con muestras de carcinoma ductal infiltrante y encontraron que la cadena β del receptor de la IL-2R se expresaba mayoritariamente en este tipo tumoral y que sólo el 10% de las muestras eran positivas para la expresión de la cadena α del receptor.

García-Tuñón et al.,(2004), desarrollaron un estudio cuyo objetivo consistió en caracterizar el patrón de expresión de la IL-2 y de las tres cadenas del receptor (α , β y γ) por inmunohistoquímica en muestras quirúrgicas de pacientes con carcinomas in situ y con tumores infiltrantes y elucidar el papel de esta citocina en la progresión y metástasis del cáncer de mama. Este estudio analizó las muestras post-cirugía de 52 pacientes diagnosticadas de adenocarcinoma de mama. De estas, 17 desarrollaron carcinoma in situ (8 lobular y 9 ductal), 1 de estas 17 mujeres tenía ganglios positivos al tiempo de la cirugía. El resto, 35 mujeres habían desarrollado carcinoma infiltrante (15 lobular y 20 ductal), 13 de estas 35, tenían ganglios positivos al tiempo de la cirugía. 7 de estas 13 mujeres, desarrollaron metástasis a distancia entre 7-24 meses después de la cirugía. Todas estas muestras post-cirugía fueron comparadas con biopsias de mama de 13 mujeres, las cuales habían desarrollado lesiones fibroquísticas benignas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1. En los 3 grupos de muestras (lesiones fibroquísticas, tumores in situ y tumores infiltrantes) por inmunotinción, se observó que la IL-2 se expresaba en el citoplasma de las células epiteliales, mientras que las tres cadenas del receptor IL-2R (α , β y γ) se expresaban tanto en la superficie celular como en el citoplasma. Aunque esa inmunotinción fue más débil en las muestras benignas y más intensa en ambos tipos tumorales.

2. Por inmunoreacción vieron que la IL-2 se encontraba expresada en el 38.5% de las lesiones fibroquísticas, en el 41.2% de los tumores in situ y en el 82.9% de los infiltrantes.

3. La inmunoreacción a IL-2R α estuvo presente en el 53.8% de las lesiones benignas, en el 35% de los tumores in situ y en el 60% de los infiltrantes. La inmunotinción en este caso fue más débil también en las lesiones fibroquísticas, más intensa en las muestras in situ y mucho más intensa en los infiltrantes.

4. La inmunoreacción a IL-2R β fue observada en el 30.8% de las lesiones benignas siendo muy débil la señal en estas muestras. Mientras que en ambos grupos tumorales fue más intensa, se detectó en el 35.3% de los tumores in situ y en el 80% de los infiltrantes.

5. La inmunoreacción a IL-2R γ se observó en el 46.1% de las muestras benignas. En este caso la inmunotinción fue más intensa que en los dos casos anteriores. Se observó también en el 41.2% de los tumores in situ, en los cuales la inmunotinción fue más intensa. Y mucho más intensidad se observó en los tumores infiltrantes y la inmunoreacción apareció en el 80% de ellos.

6. En el grupo de pacientes con carcinoma infiltrante y además ganglios positivos (13 mujeres), 10 (76.8%) de ellas presentaron inmunoreacción positiva tanto para la IL-2 como para las tres cadenas del receptor. En el grupo sin afectación ganglionar, 22 mujeres, sólo 10 de ellas (45.5%) presentaron inmunoreacción a IL-2 y a las cadenas del receptor.

Estudios inmunohistoquímicos realizados en muestras de tejido humano sano como mucosa oral y células epiteliales de próstata, así como en fibroblastos murinos, pusieron de manifiesto que la IL-2 estaba involucrada en el control del equilibrio entre la proliferación y la apoptosis. En estos tejidos sanos se observó, que la expresión tanto de la IL-2 como de su receptor era muy débil.

Estos datos estarían de acuerdo con los encontrados por el equipo de García- Tuñón en las lesiones fibroquísticas benignas de la mama. La alta expresión de la IL-2 y de IL-2R en células de cáncer de mama puede estar contribuyendo al desarrollo tumoral por aumento de la proliferación y/o inhibiendo la apoptosis, junto con otros factores anti-apoptóticos como los productos generados por la familia de la que forma parte el gen Bcl6, como ocurre en otros tumores.

De esta forma, Lelle y colaboradores pusieron de manifiesto que el índice de proliferación aumentaba de la lesión benigna de la mama a la lesión tumoral.

Reicher y colaboradores encontraron en líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello que cuando se encontraban en las fases G₀, G₁ y S del ciclo celular se mostraba una expresión yuxtannuclear de la IL-2 y cuando se encontraban en fase G₂ y mitosis la localización era citoplasmática. Azzarone y colaboradores encontraron esto mismo en varias líneas celulares de cáncer de mama.

La expresión de la IL-2 y de IL-2R es mayor en los tumores infiltrantes que en los in situ, esto pone de manifiesto el papel que tiene la IL-2 en el proceso de proliferación tumoral y de ahí que los tumores infiltrantes sean más agresivos que los in situ. En este contexto, Querzoli y colaboradores pusieron de manifiesto que los tumores infiltrantes tenían un índice de proliferación más alto que los in situ.

Por estudios de inmunofluorescencia, Ridings y colaboradores mostraron que en el carcinoma ductal infiltrante se expresaba mayoritariamente IL-2R β y en menor medida IL-2R α . García-Tuñón et al., encontraron que los tumores infiltrantes expresaban un 80% de la cadena β y de la γ y un 60% de la α . IL-2R β y IL-2R γ son necesarias para la forma activa del receptor por lo tanto con esto demostraron que los tumores infiltrantes expresaban receptores funcionales que respondían a la estimulación por la IL-2. Y también en este tipo tumoral se observa expresión de la cadena α con alta afinidad por la IL-2 .

Los datos proporcionados por todos estos estudios sugieren que el desarrollo del cáncer de mama se asocia a una alta expresión de la IL-2 y de las tres cadenas de su receptor y además esta expresión va asociada al grado de malignidad tumoral.

- **INF γ /INF γ R** : Los interferones juegan un papel muy importante en la comunicación intracelular durante la respuesta innata y adquirida, en la defensa contra las infecciones virales y bacterianas así como en la vigilancia tumoral. Hay dos tipos de INFs, tipo I y tipo II. Se diferencian en su capacidad inmunomoduladora y en las propiedades moleculares de la superficie celular.

Dentro de los de tipo I están el INF α y β y la señalización se lleva a cabo a través del receptor tipo I. El INF γ es de tipo II y es estructuralmente y funcionalmente diferente a los de tipo I. Se caracteriza por tener su propio receptor formado por dos subunidades, INF γ R1 e INF γ R2. La forma biológicamente activa del INF γ es un dímero antiparalelo que interacciona con el dominio extracelular del receptor INF γ R1. Cuando se une el ligando se activa la subunidad INF γ R2 y se genera la transmisión de la señal intracelular. Las tirosinas quinasas JAK1 y JAK2 fosforilan al receptor después de la unión al ligando, creándose sitios de unión para el traductor y activador de la transcripción STAT, concretamente STAT1. Esta fosforilación favorece la translocación al núcleo de los homodímeros de STAT1 uniéndose a GAS (del inglés gamma activated sequence) en los promotores de los genes diana. Uno de los principales genes de respuesta primaria activado por la vía de señalización JAK/STAT activada por el INF γ , es el factor de transcripción IRF1 (del inglés transcripción factor interferon response factor1). Éste activa a otros genes de respuesta secundaria. La activación de STAT1 está regulada negativamente por las fosfatasas, concretamente por la acetilación de lisina a través de la histona acetiltransferasa, lo que hace que salga del núcleo al citoplasma. La vía INF γ /JAK/STAT está regulada negativamente por un supresor como SOCS ya que bloquea la actividad de JAK. La actividad transcripcional de STAT1 está favorecida por otras quinasas como MAPK, PKC y PI3K/AKT. Algunos trans-activadores independientes de STAT1 son activados por INF γ como STAT3, STAT5, AP1 y NF κ B.

Las funciones biológicas del INF γ contemplan, la regulación inmune, la defensa contra infecciones

víricas y bacterianas, apoptosis, inflamación y respuesta inmune innata y adaptativa. Una de las funciones principales de esta citocina es que regula positivamente a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHCI) en la presentación de antígenos a las células presentadoras de antígenos. Regula también la diferenciación y función de otras células del sistema inmune. Está íntimamente relacionada con la respuesta Th1 mediante la diferenciación, activación y homeostasis de las células T e inhibe el desarrollo de las células que participan en la respuesta Th2, aunque se ha observado que promueve el desarrollo de los linfocitos Treg (M. Raza Zaidi et al., 2011).

INF γ activa macrófagos e induce la secreción de citocinas, favoreciendo el reclutamiento de células efectoras a los sitios de inflamación.

Su actividad inmunomoduladora ha generado aplicaciones en enfermedades como la enfermedad granulomatosa crónica, infecciones fúngicas, enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus y en cáncer. El INF γ participa en la vigilancia tumoral mejorando la inmunogenicidad de las células tumorales, a través de sus efectos positivos sobre el MHCI. Esto se observó en melanoma y en adenocarcinoma de pulmón donde se objetivan mutaciones en componentes de la vía del INF γ , lo que planteó la insensibilidad del tumor al INF γ y su evasión de la vigilancia tumoral. La vigilancia tumoral consiste en el reconocimiento y la eliminación por parte de los linfocitos T citotóxicos (CTL) de las células tumorales a través de las señales de quimocinas inducidas por la acción del INF γ (M. Raza Zaidi et al., 2011).

Se le atribuye también al INF γ un efecto pro-tumorigénico, Schreiber et al., la consideraron como la molécula central de su modelo de “inmunoedición del cáncer”.

Este modelo contempla que la mayoría de las células tumorales son reconocidas por el SI y son a su vez eliminadas por éste, pero como es bien conocido esto no siempre ocurre así, ya que se cree que las células tumorales emplean estrategias para sobrevivir y quedarse en estado latente.

Una serie de estudios con células tumorales de melanoma, han puesto de manifiesto los mecanismos inmunosupresores del INF γ ya que favorece el desarrollo de los Treg y suprime las funciones de los CTL a través de la IDO (indolamina 2,3 dioxigenasa). La presencia de M-MDSC y G-MDSC en el microambiente tumoral, dependientes del INF γ suprimen la respuesta de los linfocitos T. Además las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, HLA-G y HLA-E, están reguladas por el INF γ y están implicadas en la resistencia a la respuesta de los CTL y de las NK lo cual facilita el escape inmune en variedad de tumores (M. Raza Zaidi et al., 2011).

El INF γ está involucrado en el desarrollo del cáncer de mama. Hay estudios que han evaluado tanto su expresión como la del INF γ -AS1 (antisentido), un RNA largo no codificante (lncRNA) localizado cerca del gen que codifica para el INF γ que regula la expresión de éste. Los lncRNAs son conocidos como reguladores principales de la expresión de genes tanto en cáncer como en desórdenes inmunológicos (Hajar Yaghoobi et al., 2018).

Si tenemos en cuenta el importante papel del SI en el cáncer, estas moléculas regulan tanto células inmunes como tumorales, de esta forma cobran importancia como biomarcadores tumorales o como dianas terapéuticas. Los lncRNAs son considerados como puntos de control fundamentales ya que participan en la expresión del INF γ en las células Th1 (Hajar Y. et al., 2018).

El INF γ participa tanto en la patógenesis del cáncer de mama como en la respuesta a los tratamientos. En un primer escenario se le reconoce su papel antitumoral a través de la polarización y activación de las células Th1, linfocitos T citotóxicos y células dendríticas. Sin embargo, en ciertas condiciones favorece la progresión tumoral, esto parece ser que lo hace a través de la regulación negativa del MHCI o la sobreexpresión de PD-L1.

En un estudio desarrollado por Nakayama et al., (2019) utilizando líneas celulares de cáncer de mama como MRK-nu-1, BT-549, MCF-7 y MDA-MB-231 y muestras quirúrgicas de 111 pacientes con estadios II/III, se analizó la expresión de p-STAT1 por IHC, en relación a la expresión de PD-L1 y HLA clase I en linfocitos T CD8. Usando la base de datos, The Cancer Genome Atlas (TCGA), analizaron la correlación de la firma del INF γ con la expresión de PD-L1 en tejidos de carcinoma

invasivo . Como resultado se observó que la vía JAK/STAT a través del INF γ estaba involucrada principalmente en la expresión de PD-L1 en la líneas celulares utilizadas. La IHC reveló que los niveles de expresión de PD-L1 y los de HLA clase I, estaban significativamente aumentados en los casos positivos de p-STAT1. Por lo tanto, el análisis TCGA indicó que la expresión PD-L1 y la firma INF γ tenían una correlación positiva. Estos hallazgos sugieren que PD-L1 y HLA clase I se co-expresan en células de cáncer de mama p-STAT1 positivas inducidas por INF γ secretado por las células infiltrantes de tumores.

Además la expresión de p-STAT1 puede ser un potencial biomarcador para selección de pacientes que vayan a ser tratados con inmunoterapia, anti-PD1/anti-PD-L1. Por otro lado, la sobreexpresión de genes relacionados con la vía INF γ /STAT1 se ha propuesto como biomarcador de respuesta a quimioterapia en el subtipo ER negativo.

En la mayoría de los tumores de mama también se observa que el MHC-I está metilado por la DNA-metiltransferasa con lo cual está suprimida su expresión en los linfocitos T CD8 citotóxicos.

Na Luo et al.,(2018) diseñaron un estudio con líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 (ER+), BT474 (HER2+), HCC1395 (triple negativo), y (claudin- low) BT549 y modelos murinos, donde probaron el tratamiento con un inhibidor de la DNA-metiltransferasa, la guadecitabina, un agente hipometilante, que aumenta la expresión del MHC-I en las células tumorales y promueve la movilización de linfocitos T CD8+ al microambiente tumoral. Estos agentes inmunomoduladores podrían estar implicados en la regulación de la presentación de antígenos clase I y potenciar la respuesta de las células T CD8+.

Esto podría ser interesante para potenciar la inmunidad antitumoral y la respuesta a la inhibición del punto de control sobre todo en tumores de mama refractarios al tratamiento con inmunoterapia.

Yaghoobi et al., (2018) evaluaron los niveles de transcripción tanto del INF γ como de INF γ -AS1 en tumor de mama y en tejido sano adyacente al tumor, encontrando una regulación positiva de

INF γ -AS1 en el tejido tumoral comparado con el tejido sano. La expresión del INF γ también fue más alta en tejido tumoral que en tejido sano, aunque no se encontró diferencias estadísticas. Además encontraron que la expresión del INF γ era más alta en los tumores HER2 negativos que en los HER2 positivos y también era más alta en tumores de grado 1 que en los de grado 2. Estos datos ponen de manifiesto la participación de ambos en la patogénesis del cáncer de mama, aunque se necesitan más estudios que afiancen esta idea.

Garcia-Tuñón et al., evaluaron la expresión del INF γ en lesiones fibroquísticas benignas, CDIS y carcinoma infiltrante. Los datos obtenidos pusieron de manifiesto la alta expresión de esta citocina en CDIS más que en lesiones benignas y carcinoma infiltrante. Además también obtuvieron mayor expresión en los tumores de grado 1 más que en los de grado 2, por lo que ante este hallazgo, este grupo propone que posiblemente la célula tumoral disminuya la expresión de esta citocina para poder evadirse de la vigilancia del SI, ocurriendo más frecuentemente en los tumores HER2 negativo que en los HER2 positivos. Lo que no encontraron fue asociación con el estatus del ER y PR.

El INF γ participa en el desarrollo del cáncer de mama a través de la regulación de algunos genes. A partir de aquí existen varios estudios que lo ponen de manifiesto.

Khalkhali-Ellis et al., (2008) desarrollaron un estudio en el cual examinaron la participación del INF γ en la regulación de la expresión de genes en las células epiteliales mamarias. Concretamente, fueron los genes Maspin, miembros de la superfamilia de inhibidores serinas proteasas y Catepsina D (CatD) que pertenecen al grupo de las aspartil endopeptidasas lisosomales. Las proteínas productos de estos genes participan en la regulación de multitud de funciones biológicas en los diferentes estadios del desarrollo y remodelación del tejido mamario. La expresión de Maspin está regulada negativamente en cáncer de mama primario y se pierde en el estadio metastásico. CatD es producido en exceso y además de forma aberrante en células de cáncer de mama. Las células epiteliales mamarias expresan el receptor del INF γ y la traducción de señales se hace a través de STAT1 esto parece ser que está implicado en la disminución del pH vacuolar y estos cambios de pH parece que alteran la secreción de CatD y a la vez incrementan

los de Maspin. Este estudio pone de manifiesto que las células tumorales mamarias desprovistas de Maspin son refractarias a las acciones del INF γ con respecto a los cambios en el pH vacuolar y CatD. Si se transfectan células tumorales de mama con Maspin, estas se sensibilizan al INF γ , lo cual podría tener nuevas implicaciones terapéuticas (Junho K. Et al., 2020).

Otro genes regulados por el INF γ en cáncer de mama es p63 y la isoforma Δ 133p53. La familia TP53 consta de tres conjuntos de genes, TP53, TP63 y TP73, los cuales expresan múltiples variantes de RNA e isoformas de proteínas. TP53 se encuentra mutado en el 25-30% de los tumores mamarios. La mayor prevalencia de la mutación en TP53 se da en el subtipo TNBC si lo comparamos con otros subtipos (Mehta et al., 2018).

Mehta et al.,(2018) investigaron la asociación entre las mutaciones de TP53, la expresión de las isoformas de TP53 y la expresión de otros genes de la familia, en cuatro subgrupos diferentes según el estatus de ER y el estatus de mutación de TP53, esto se analizó utilizando herramientas de bioinformática. Se identificaron las vías de señalización asociadas a la expresión de TP53 y sus miembros.

Los resultados mostraron que la vía del INF γ aparecía sobreexpresada y asociada con el RNA TP63 en tumores wild type TP53 (wtTP53), ER negativo. Y el RNA Δ 133TP53 se asoció a tumores mutantes TP53 (mTP53) y ER positivo.

Parece ser que los tumores con baja expresión de INF γ se asociaron con pacientes de peor pronóstico, independientemente del subtipo.

Estos datos ponen de manifiesto que diferentes miembros de la familia TP53 pueden impulsar la transcripción de genes involucrados en la señalización del INF γ en diferentes subtipos de cáncer de mama.

Otras moléculas involucradas en la patogenia del cáncer de mama a través del INF γ , son los factores reguladores del interferon, tanto el IRF1 y el IRF2. Ambos son factores de transcripción

que participan en la vía de traducción de señales del INF γ , con funciones opuestas. Hay trabajos realizados tanto en modelos tumorales murinos como humanos que ponen de manifiesto que el IRF1 es un supresor de tumores mientras que el IRF2 tiene el efecto contrario, es oncogénico. Se ha visto que las alteraciones en la expresión tanto de IRF1 como IRF2 pueden ocurrir en tejido tumoral mamario comparado con el tejido sano y entre los diferentes subtipos tumorales de mama (G.M. Doherty et al., 2001; Michaele J.A. et al., 2015).

Doherty et al., diseñaron un estudio con 33 pacientes con DCIS y 49 pacientes con carcinoma ductal invasivo. Y de 31 de estas pacientes además estudiaron el tejido sano adyacente al tejido tumoral. Los resultados obtenidos por IHC fueron que IRF1 se expresaba mayoritariamente en el tejido sano y no había expresión de IRF2. Las pacientes con DCIS de alto grado y carcinoma invasivo con ganglios positivos tenían menos expresión de IRF1 que el tejido sano y más de IRF2.

Estos datos determinaron que la expresión de IRF1 y 2 está alterada en cáncer de mama comparado con el tejido sano.

La pérdida de expresión de IRF1 y la sobreexpresión de IRF2 está relacionada con la activación oncogénica, esto apoyaría la hipótesis que esta vía está involucrada en la patogénesis del cáncer de mama y que podría tener implicaciones tanto en el pronóstico como en el tratamiento. Concluyeron con este estudio que la vía INF γ /JAK/STAT/IRF contribuye al desarrollo y progresión de algunas neoplasias de mama.

Otro estudio llevado a cabo por John H Yim et al., demostró que el TNF α y el INF γ inducían la expresión del IRF1 en células de cáncer de mama y favorecía la muerte celular programada o apoptosis, ya que el IRF1 aumenta la apoptosis mediada por el TNF α en dichas células. La ruta del IRF1 involucra al factor de transcripción NF κ B.

TNF α e INF γ disminuyen la presencia del NF κ Bp65 en el núcleo de las células tumorales mamarias.

Además la expresión ectópica de IRF1 en estas células cancerígenas daba como resultado la escisión de la caspasa 3, 7 y 8 inhibiendo así la actividad de NF- κ B y por lo tanto suprimiendo la actividad de las moléculas que conforman esta vía. Estos datos mostraron que IRF1 participa en múltiples redes de señalización, incluida la muerte celular intrínseca y extrínseca y regula negativamente las moléculas participantes en la vía NF- κ B. Las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas para estos experimentos fueron MCF-10F, MDA-MB-468 y SK-BR-3 y de tejido sano HMEpC (Carmen Ruiz-Ruiz et al., 2004)

Otra acción protumorigénica que tiene el INF γ en cáncer de mama ,es la producción de ROS, que conduce al estrés oxidativo celular (Cadwallader 2002), esto lo hace a través de la NADPH oxidasa (NOX) (Lambeth 2004), por lo que puede modificar vías de señalización intracelular, afectando tanto a quinasas como a fosfatasa (Trachootham et al. 2008; Sundaresan et al. 1995).

Las ROS son principalmente generadas por metabolismo oxidativo (Halliwell 1999) generando moléculas altamente reactivas y tóxicas (Buechter 1988). Las células cancerosas producen ROS en altas cantidades a través de la cadena de transporte electrónica mitocondrial, del citocromo P450 y la más importante la NADPH oxidasa (NOX). Desde que se conocen estas moléculas siempre han estado asociadas al daño celular. Actualmente, se les ha descrito como importantes reguladores de la actividad y de la expresión de factores de transcripción y proteínas involucrados en la supervivencia celular y la respuesta al estrés (Trachootham et al.,2008). La sobreproducción de ROS y cambios en los niveles de sustancias antioxidantes intracelulares pueden conducir a efectos patológicos y citotóxicos (Sesti et al.,2012). Si se mantiene la homeostasis de las especies radicales del oxígeno a través de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, podremos mantener el crecimiento celular normal y la supervivencia (Droge 2002). Lo que hace la célula cancerosa es aumentar la producción de ROS y disminuir su capacidad de eliminación, con lo cual esto ayuda al crecimiento tumoral (Toyokuni et al., 1995) y además por otro lado mantienen la homeostasis celular activando enzimas de eliminación de estas moléculas oxidantes (Pervaiz 2004).

Un estudio realizado por K. Zibara et al., 2016, utiliza la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y

se observa como ROS media la fosforilación de Src inducida por el INF γ a través de la vía Raf/ERK. El estudio consistió en tratar esta línea celular con INF γ y observaron que aumentaba la fosforilación de STAT1, Src, Raf, AKT, ERK1/2 y p38, sobre todo aumentaba más rápidamente la de Src y Raf, involucradas en las primeras etapas de señalización del INF γ . Si se inhibían las quinasas de la familia Src daba como resultado una disminución significativa de la fosforilación de Raf y ERK1/2, pero no de p38 y AKT.

Por otro lado, observaron que el INF γ favorecía la generación de ROS, produciéndose principalmente H₂O₂, mientras que utilizando un inhibidor de ROS, NAC (N-acetil-L-cisteína) inhibidor selectivo de la NADPH oxidasa (NOX1), esto provocaba una disminución significativa de la fosforilación de AKT, ERK1/2, p38 y STAT1.

Por lo que ROS es un regulador positivo de la fosforilación de AKT, ERK1/2, p38 y STAT1 y activa la vía de señalización de INF γ en esta línea celular MCF-7. Esta vía de señalización activa la producción de H₂O₂ que sigue la ruta Src/Raf/ERK en lugar de la ruta PI3K/AKT. En conclusión, al aumentar la producción de ROS esto puede dar lugar a modificaciones en las vías de señalización intracelular y por ello podría participar en el desarrollo del cáncer. Si se inhibe la producción de ROS a través de la vía del INF γ , esto podría ser una estrategia interesante para el tratamiento en cáncer de mama (Kazem Z.et al.,2017).

- **IL-12:** En un principio se identificó como NKSF (del inglés natural killer- stimulating factor) por el grupo de Trinchieri en 1989 y por el grupo de Gately en 1990 como CLMF (del inglés cytotoxic lymphocyte maturation factor), respectivamente.

Está formada por dos subunidades, p40 y p35 e induce proliferación de células NK y linfocitos T y producción de citocinas, principalmente de INF γ . También favorece la generación y actividad de los linfocitos CTL a través de la activación de STAT4. La IL-12 es esencial para la diferenciación de células Th1, lo cual es necesario para generar inmunidad celular tipo 1 frente al cáncer y las infecciones. El INF γ producido por la acción de la IL-12, aumenta la expresión de MHC de clase I y II, moléculas de adhesión como ICAM-1 y factores de transcripción como Tbox expresado en las

células T (T-bet). Además, la IL-12 modula la actividad inmunosupresora de las MDSC inhibiendo dicha actividad, por lo que pudiese tener implicaciones terapéuticas (Catherine E. S. et al., 2011).

Esta citocina induce también la producción de quimocinas y monocinas antiangiogénicas, favorecido esto a su vez por la acción del INF γ , como la IP-10, CXCL10 y la MIG, CXCL9, en las células endoteliales.

Por todo ello, la producción endógena de INF γ es necesaria para el efecto antitumoral de la IL-12 (Mingli X et al., 2010).

La familia de la IL-12 está compuesta por citocinas heterodiméricas que incluyen además de la IL-12 a las IL23 e IL-27 (Wojno et al.,2016). La IL-27 es estructural y funcionalmente similar a la IL-12, ésta fue identificada por el grupo de Kastelein en 2002.

Está formada por dos subunidades, la subunidad EB13 y la subunidad IL-12p35. Activa a STAT1 y STAT3 a través de las subunidades del receptor IL-27R, WSX-1 y gp130, favoreciendo la proliferación de las células T CD4+ naïves. La IL-27 promueve la diferenciación temprana de las células Th1 a través de la regulación positiva de ICAM-1 y T-bet y suprime la diferenciación de Th2 y Th17 y la producción de citocinas proinflamatorias. Un posible mecanismo supresor de esta citocina se da a través de la IL-10, además la IL-27 junto con el TGF- β , favorecen la producción de IL-10 por los linfocitos Tr1.

La IL-27 se caracteriza por tener actividad antitumoral. Hisada et al. (2004), fueron los primeros en evaluar la eficacia antitumoral de esta citocina y elucidaron que lo hacía a través de los linfocitos CD8+, de las células NK y de los ADCC (del inglés antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), además vieron que era antiangiogénica, induciendo la producción de quimocinas como IP-10 y MIG y que suprimía directamente el crecimiento tumoral e inhibía la expresión de la COX2 y que esto a su vez dependía de las características individuales del tumor, es decir, si eran tumores altamente inmunogénicos o poco inmunogénicos. Utilizando un modelo murino de cáncer de colon, transfectaron las células tumorales con un vector de expresión del gen de la IL-

27 y demostraron la reducción del tamaño tumoral, lo cual se vio que estaba mediado por los linfocitos T CD8+, INF γ y el factor de transcripción T-bet. Sobre los linfocitos CD8+, la IL-27 induce la expresión de los factores de transcripción T-bet y eomesodermina (EOMES), también conocida como proteína cerebral T-box2 (Tbr2) y aumenta la generación de CTL a través de la expresión de moléculas efectoras como granzima B y perforina.

Existen diferencias en los mecanismos moleculares que inducen efectos antitumorales entre las IL-12 e IL-27. Como se ha comentado anteriormente, la IL-27 utiliza varios mecanismos para inducir sus efectos antitumorales dependiendo de las características individuales de cada tumor. En los tumores altamente inmunógenos que expresan MHC de clase I, la IL-27 actúa a través de los CD8+.

Sin embargo, en los tumores pobremente inmunógenos, la falta de expresión del receptor IL-27R le dificulta actuar a través de los linfocitos CD8+, esto también le dificulta la producción de INF γ y por lo tanto de regular la expresión de MHC clase I. En este caso su acción antitumoral, la ejerce a través de las células NK y de sus efectos antiangiogénicos.

Por el contrario, la IL-12 ejerce sus efectos antitumorales facilitando una alta producción de INF γ por las células NK y los linfocitos T CD4+. Esto conduce a su vez a efectos tóxicos a nivel sistémico, de ahí que la utilización de la IL-12 en clínica sea limitado. En este sentido, la IL-27 es mucho menos tóxica, ya que tiene menos capacidad para producir INF γ por las células NK, por ello, la IL-27 puede ser candidata a ser aplicada en inmunoterapia contra el cáncer.

El otro componente de la familia de la IL-12, es la IL-23, que fue identificada por el grupo de Kastelin en el año 2000. Se compone de dos subunidades la IL-23p19 y la IL-12p40. Esta citocina activa STAT3 y actúa preferentemente sobre los linfocitos T CD4+ memoria induciendo su proliferación y producción de citocinas IL-17 e IL-22. Se considera que la función fisiológica de la IL-23 es sólo expandir y mantener las células inflamatorias Th17 y favorecer la producción de TGF β e IL-6, necesarios para la diferenciación de dichas células.

A diferencia de las otras dos citocinas de la misma familia, la IL-23, tiene efecto protumorigénico. Utilizando modelos murino deficientes en IL-12 e IL-23, se observó que la deficiencia en IL-12 aumentaba la incidencia y el crecimiento rápido del tumor. Por otro lado, un nivel bajo de IL-23 o del IL-23R, no sólo reducía la incidencia tumoral sino que también reducía el crecimiento tumoral. En el microambiente tumoral, la IL-23, no sólo favorece características inflamatorias a través de las MMP, la angiogénesis e infiltración de macrófagos, sino también reduce la vigilancia inmune antitumoral suprimiendo la presencia de los linfocitos T CD8+.

Cabe destacar que en la mayoría de los tumores se sobreexpresa IL-23p19 y IL-12p40, pero no IL-12p35. Este efecto protumoral también lo ejerce a través de la activación de la vía STAT3, presente en numerosos tipos tumorales.

Esta activación favorece la proliferación de las células tumorales al ejercer efectos antiapoptóticos, mediados por la desregulación de p53 y por inducir factores que conducen a la angiogénesis y metástasis, como el VEGF y las MMPs. Además favorece la producción de citocinas inmunosupresoras como la IL-10. En los TAMs la expresión de la IL-23 está mediada por STAT3 por activación transcripcional directa del gen IL-23p19 junto con NF- κ B/RelA (p65). De otra parte, STAT3 inhibe la activación del gen IL-12p35 dependiente de NF- κ B/c-Rel en DC, esto posiblemente se deba a que la inducción de STAT3 sea dependiente de un supresor transcripcional ETS, concretamente ETV3 y de un correpresor de la familia helicasa SBNO2 (del inglés strawberry notch homolog 2). Por lo tanto, STAT3 promueve la respuesta inmune protumoral mediada por la IL-23, mientras inhibe la inmunidad antitumoral dependiente de la IL-12 (Mingli X.et al., 2010).

- **TNF α :** La historia de esta citocina está ampliamente relacionada con el desarrollo de la inmunoterapia tumoral (S.F.Josephs et al.,2018). A principios de 1900, el médico William Coley observó que varios de sus pacientes con cáncer entraban en remisión después de haber sufrido infecciones bacterianas. A partir de aquí desarrolló varios experimentos que consistieron en emular infecciones bacterianas administrando combinación de patógenos a estos pacientes. Una de estas mezclas estaba compuesta por *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens*, a

lo que se conoció como la “toxina de Coley”. En 1960 se empezaron a estudiar los mecanismos moleculares por los cuales *Serratia marcescens* inducía regresión tumoral, observándose que aparecía una sustancia que era la responsable de ello. Y es en 1975 cuando se le da el nombre de factor de necrosis tumoral, por inducir necrosis hemorrágica en tumores a altas concentraciones. Más tarde se vio que estaba involucrado en una gran cantidad de procesos celulares (Remco van Horssen et al., 2006).

El TNF α es expresado por macrófagos, monocitos, NK, linfocitos T, neutrófilos y mastocitos y también por células no inmunes como fibroblastos, células endoteliales, miocitos cardíacos y neuronas (Amit K. Menta et al., 2018).

Su expresión es inducida transcripcionalmente por NF- κ B, c-Jun, AP1 y por el NFAT. El gen que codifica para el TNF α se encuentra localizado en humanos en el cromosoma 6, cerca de los genes que codifican para el CMH. El gen se caracteriza por tener 4 exones y 3 intrones, la mayoría de los productos están codificados en el último exón, mientras que los primeros contienen la información de la secuencia del péptido líder. Esta citocina es sintetizada como una proteína de membrana de tipo II con un peso molecular de 26 kDa que forma un homodimero que se conoce como TNF α transmembrana (tmTNF α), el cual puede funcionar como receptor o como ligando y unirse al receptor tipo II (TNFR2). El tmTNF α en la superficie celular puede unirse a receptores en la célula diana y modular sus respuestas tanto fisiológicas como patológicas. En este caso participa en la defensa del huésped, regulando la actividad citotóxica celular y tumoral, favoreciendo la secreción de las inmunoglobulinas por los linfocitos B, activación de los linfocitos T y NK y estimulando a los monocitos para la producción de citocinas, entre otras funciones. Cuando actúa como receptor se dice que “revierte la señal” al igual que otros miembros de la superfamilia de TNF α , CD30L (CD153, TNFSF8), CD40L (CD154) y CD137L (4-1BBL, TNFSF9).

El tmTNF α tiene un extremo C-terminal externo y otro N-terminal citoplasmático que se libera por escisión proteolítica a través de la enzima convertidora TNF α (TACE/ADAM17), dando un producto activo y soluble, el sTNF α , con un peso molecular de 17 kDa. sTNF α , es un monómero que puede formar homotrímeros de peso molecular 52kDa, con efecto autocrino, paracrino y

endocrino. Tanto el tmTNF α como el sTNF α se unen a los receptores de membrana, al TNF α receptor 1 (TNFR1/CD120a) de 55 kDa y al TNFR2/CD120b de 75 kDa. Esta unión genera su trimerización que es requerida para reclutar proteínas de señalización al citoplasma que activarán diferentes vías dependiendo de cual sea el receptor activado, el tipo de célula y el contexto celular en general. El TNFR1 y TNFR2 se caracterizan por la presencia de grupos de cisteína y son clasificados como proteínas de membrana de tipo I. El dominio extracelular de unión al ligando de cada receptor comparte sólo un 28% de homología, esto explica el amplio espectro de procesos que pueden controlar (S. Sethu et al., 2011).

Los dominios intracelulares de ambos receptores no tienen homología y tampoco actividad enzimática, por lo que la señalización se activa a través del reclutamiento de proteínas adaptadoras citosólicas. TNFR1 se expresa a bajos niveles en la mayoría de las células nucleadas y puede ser activado por sTNF α como por tmTNF α . TNFR2 se expresa principalmente en neuronas, oligodendrocitos, astrocitos, células endoteliales y subpoblaciones de linfocitos T, entre otras. Requiere para activarse a tmTNF α . La traducción de señales a través del TNFR1 puede inducir efectos opuestos, ya que por un lado puede estimular la supervivencia celular y la proliferación y por otro favorecer la apoptosis y la muerte celular dependiendo de la intensidad de la señal, esto se debe a que el TNFR1 se caracteriza por tener un dominio de muerte citoplasmática que recluta a la proteína TRADD (del inglés TNFR1- associated death domain protein) y a la proteína TRAF2 (del inglés TNF α Receptor Associated Factor 2). Esto a su vez puede formar dos complejos, el complejo I responsable de activar la supervivencia a través de la vía de señalización mediada por JNK, NF-kB, AP-1 y MAPK. Y el complejo II recluta a la proteína FADD (del inglés Fas-associated protein with death domain), también conocida como MORT1 y a pro-caspasas, lo cual genera la formación de un complejo que genera apoptosis. A diferencia del TNFR1, el TNFR2 participa principalmente en la activación celular, migración y proliferación. Este carece del dominio de muerte, pero puede reclutar a TRAF2 a través de TRAF1 (del inglés TNF α Receptor Associated Factor 1) pudiendo activar la vía canónica y no canónica de NF-kB. TNFR2 activa rutas comunes a TNFR1 como NF-kB, AP-1, JNK y MAPK reclutando proteínas como RIP-1 (del inglés Receptor Interactin Protein) y TRADD a través de TRAF2, esto conlleva a la activación de la apoptosis y a la activación de TNFR1 (George D. K. et al., 2016).

Resumiendo, la vía del TNF α está formada por dos receptores que se pueden encontrar en forma soluble o transmembrana y pueden activar cascadas de señalización intracelulares únicas o bien pueden converger dependiendo de las proteínas reclutadas. Además el TNF α también puede estar en forma soluble y transmembrana lo que explica los diferentes procesos celulares en los que está involucrado.

El TNF α juega un papel relevante en cáncer ya que los mediadores de la inflamación que componen el microambiente tumoral generados por las células tumorales o las células infiltrantes del tumor han sido considerados como un hallmark del cancer. Existen evidencias que tanto las citocinas pro-inflamatorias como los polimorfismos asociados a los genes que codifican para éstas, están asociados con la severidad tumoral. Mantovani y Balkwih, revisaron esto y llegaron a la conclusión que tanto las células tumorales como las células inmunes que secretaban citocinas inflamatorias eran detectadas en pacientes con cáncer y que además estaban asociadas a mal pronóstico. Como se ha comentado anteriormente, el TNF α es uno de los principales mediadores de la inflamación y se ha detectado en cáncer de ovario, mama, endometrio, oral, páncreas, gástrico, hepático, próstata, vejiga y colorrectal, así como en linfomas y leucemias. El TNF α parece ser un biomarcador importante de la progresión, invasión y metástasis tumoral y se propone como posible tratamiento de esta enfermedad (S. Niture et al.,2019).

Analizando en profundidad el comportamiento de esta citocina en cáncer de mama, se ha reportado que por un lado hay líneas celulares de cáncer de mama donde el TNF α inhibe la proliferación favoreciendo la apoptosis y de otra parte, hay líneas celulares que son resistentes a la apoptosis inducida por dicha citocina y que por lo tanto tienen una alta capacidad de proliferación, supervivencia y progresión. Esta diferencia parece que se debe a la expresión de TNFR, de la familia de Bcl-2, de la activación de caspasas entre otros. Ha sido demostrado el papel pro-metastásico del TNF α y su participación en la EMT, ya que induce la expresión de Twist-1 a través de la activación de la vía IKKB y NF-kB y la expresión de las MMP, concretamente la MMP9. En un estudio con una cohorte de pacientes con cáncer de mama inflamatorio, se

encontró la correlación entre los niveles de TNF α producido por los linfocitos T en sangre periférica y la detección de células tumorales circulantes que expresaban mediadores de la EMT.

Centrándonos en la implicación del TNF α por subtipos tumorales, el *subtipo luminal*, se caracteriza por la presencia de ER y/o PR, alrededor de 2/3 de los tumores de mama expresan ER para favorecer su crecimiento. Esta producción de estrógenos se lleva a cabo principalmente en los ovarios, músculos, hígado, mama y tejido adiposo (María Florencia Mercogliano et al., 2020).

En mujeres premenopáusicas la principal fuente de producción de estrógenos son los ovarios y en posmenopáusicas el tejido adiposo y el músculo. En cáncer de mama los niveles de esta hormona son más altos que en el tejido normal. El estradiol deriva de la testosterona, convirtiéndose en los metabolitos estrona y sulfato de estradiol por acción de la enzima aromatasa, de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la estrona sulfatasa, respectivamente. Algunas citocinas como TNF α , IL-6 y la prostaglandina PGE₂, estimulan la acción de la aromatasa, ya que se correlacionó los niveles de mRNA de la aromatasa con los mRNA del TNF α , IL-6 y de la COX2. Además se vió que el TNF α induce la expresión del gen de la aromatasa a través de c-fos y c-jun (Atul P. et al., 2001).

Frasor et al., pusieron de manifiesto que el tratamiento de células tumorales de cáncer de mama con TNF α y estradiol regulaban una serie de genes clínicamente relevantes ya que se podía distinguir pacientes con pobre respuesta al tratamiento endocrino. Además ambas moléculas juntas podían promover la supervivencia de las células tumorales y una progresión a un inmunofenotipo más agresivo. El TNF α favorece la proliferación celular a través de la vía mediada por TNFR1, el cual activa a JNK y a PI3K/AKT, lo cual estimula a NF-kB, induciendo a la ciclina D1. Y otra vía es a través de p42/p44 MAPK mediada por TNFR1 y TNRF2, independiente de NF-kB. Por tanto, esta citocina favorece el crecimiento tumoral, proliferación, supervivencia, progresión y metástasis.

En el *subtipo tumoral triple negativo*, el TNF α es responsable de promover la motilidad, la invasión celular y la EMT, induciendo a MMP9, AP1 y CDKN1/p21. Se ha descrito que las vías

p42/p44 MAPK y PI3K/AKT son críticas en la inducción de MMP9 y AP1 por el TNF α , desencadenando esto la expresión de ZEB2, un regulador de la EMT en líneas celulares de TNBC. Ésta citocina activa la vía inflamatoria IL-6/p-STAT3, favoreciendo la expresión de citocinas IL-6, IL-8, CCL5 y TGF β , con lo que se expresan biomarcadores que favorecen la EMT, contribuyendo a un fenotipo más agresivo con un alto potencial metastásico. Otras moléculas involucradas en la proliferación y metástasis en TNBC, es MUC4 y FAK (PTK2).

Esto pone de manifiesto, que las vías PI3K/AKT y p42/p44 MAPK, juegan un papel importante en la EMT e invasión celular en cáncer de mama. (María Florencia Mercogliano et. al., 2020).

En líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo, el TNF α activa a la proteína HER2 induciendo fosforilación Tyr877 a través de c-Src dependiente de PKC, favorece la formación del heterodímero HER2/HER3 que activa la vía PI3K/AKT, favoreciendo la proliferación mediada por NF-kB, induciendo la ciclina D1. El grupo de Mercogliano et al., demostró que la sobreexpresión de TNF α en la línea celular de cáncer de mama HER2+, favorece la activación de las vías AKT y NF-kB. Esto confiere una alta capacidad de supervivencia, un mayor potencial de colonización, incremento de la proliferación, lo que genera un aumento del potencial de metástasis.

2.5.2.2 Citocinas inductoras de respuesta tipo Th2

- **IL-6/IL-6R:** Fue identificada por primera vez en 1986 como factor estimulante de linfocitos B. Es también conocida como IFN β 2, factor estimulante de hepatocitos y factor de crecimiento del plasmocitoma/hibridoma.

Se caracteriza por ser una glicoproteína pequeña, compuesta por 185 aa y 25 kDa de peso molecular. Es secretada tanto por células del sistema inmune como no inmune, incluyendo a los linfocitos T y B, monocitos, células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, células mesangiales y adipocitos. Además es secretada por células tumorales de varios tipos tumorales como cáncer de mama, próstata, pulmón, ovario, entre otras (Z. Culig et al., 2011). Interviene en procesos

inmunes y fisiológicos como la generación de proteínas de fase aguda, inflamación, respuesta inmune antígeno-específica, hematopoyesis y metabolismo celular.

El receptor de la IL-6 (IL-6R), lo expresan los linfocitos T, B, neutrófilos, monocitos y hepatocitos.

Hay dos tipos de receptores, uno es transmembrana (mIL-6R) y se expresa en la superficie celular, tiene un pequeño dominio intracelular que no forma parte de la señalización que se genera después de la unión al ligando. También se conoce como IL-6 α , gp180 o CD126. El otro es soluble (sIL-6R) y se encuentra en circulación, siendo generado de dos formas, una es por splicing alternativo del mRNA del mIL-6R (10%) y la otra forma es a través de las proteinasas ADAM10 y ADAM17 (90%). Éste carece de dominios citoplasmáticos y transmembrana, pero contiene dominios esenciales para la unión al ligando.

Tanto el mIL-6R como el sIL-6R no generan señales intracelulares por ellos mismos, y necesitan de la participación de una proteína transmembrana que se conoce como glicoproteína 130 (gp130, IL6ST, IL6R β o CD130), con la que forman un complejo de baja afinidad formando homodímeros y mediando así la señal intracelular. Esta proteína es expresada por varios tipos celulares y participa en el desarrollo, crecimiento, supervivencia celular y homeostasis de los tejidos. La forma soluble de ésta (sgp130) se genera por splicing alternativo. Está presente en la circulación y se relaciona con la inflamación y el cáncer.

En la vía de señalización de la IL-6 están como intermediarios JAK y STAT3. La estimulación de la vía IL-6/JAK/STAT3 en las células cancerosas modula la expresión de genes que participan en la proliferación, supervivencia y transformación celular.

Ras es otra molécula que induce la unión de IL-6 con su receptor y puede hiperfosforilar y activar la vía de las MAPK. Ésta a su vez activa varios factores de transcripción involucrados en el crecimiento celular, síntesis de inmunoglobulinas y generación de proteínas de fase aguda.

Otra vía de señalización inducida por la IL-6 es la de PI3K-Pkb/AKT, que modula la expresión de genes de supervivencia celular. (Ali Masjedi et al., 2018)

La participación de la IL-6/IL-6R en cáncer de mama está muy estudiada y bien establecida. La sobre-expresión está asociada con un pobre pronóstico y baja tasa de supervivencia en estas pacientes. Además la vía STAT3 está activada en el 50% de los casos y la IL-6 es su principal activador.

Varios tipos celulares que forman parte del microambiente tumoral como son las propias células tumorales, macrófagos asociados a tumor (TAMs), células T helper (Th), MDSCs y los fibroblastos son considerados como la principal fuente de IL-6. En general las células tumorales utilizan la IL-6 como factor de crecimiento de forma autocrina. La capacidad de respuesta de las células tumorales de mama a la IL-6, depende de la expresión de o no de receptores hormonales, receptor de estrógenos y receptor de progesterona.

Las células tumorales hormono-sensibles responden mejor a la acción de la IL-6 que las hormono-resistentes. Además, se sabe que las hormono-sensibles expresan el receptor sIL-6R y las hormono-resistentes expresan el mL-6R.

La IL-6 aumenta los niveles de estrógenos circulantes ya que activa enzimas que participan en su metabolismo como la aromatasa, estrona sulfatasa y la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. La estrona sulfatasa está sobre- expresada en cáncer de mama, por lo que hay más sulfato de estrógeno en circulación que estrógeno, se comportaría este como un reservorio.

Se ha visto que en la línea celular MCF-7 que expresa receptor de estrógenos, la IL-6 actúa de mediadora en la conversión de estrona a estradiol por lo que esto puede explicar las altas concentraciones de estradiol en el tejido mamario.

Se ha estudiado también la implicación de los polimorfismos de la IL-6 en el riesgo de padecer cáncer de mama. Uno de ellos, es el polimorfismo de nucleótido simple (SNP), 174 G>C (rs 1800795). Otro polimorfismo es GG (rs1800795) implicado en la incidencia de metástasis en cáncer de mama primario. Y por último el polimorfismo rs1800797 AG o AA , relacionados con baja supervivencia libre de enfermedad.

El papel de la IL-6 en la metástasis tiene que ver con su participación en la transición epitelio-mesenchima (EMT) favoreciendo el reclutamiento de las células mesenquimales hacia células de cáncer de mama.

Asimismo, la IL-6 favorece la metástasis a hueso por sobre-expresión de CXCR4 a través de STAT3 y c-Jun.

En la línea celular MCF-7, la IL-6 induce el fenotipo EMT a través de la regulación positiva de N-cadherina, Snail, Vimentina y Twist y regulación negativa de E-cadherina. Además, el eje IL-6/STAT3 facilita la angiogénesis por regulación positiva de VEGF, MMP9 y bFGF en las células endoteliales asociadas al tumor, TAMs y las MDSCs.

Por último algunos autores han mostrado que el gen de la anhidrasa carbónica que proporciona resistencia a la hipoxia (CA-IX) está activado en cáncer de mama a través de la vía IL-6/Notch/JAG, lo que aumenta la capacidad de supervivencia de las células tumorales en condiciones de hipoxia con lo que aumenta la invasividad de estas células (Marta Lukaszewicz et al., 2007; Ali Masjedi et al., 2018).

- **IL-1 α y β /IL-1R** : La familia de la IL-1 está compuesta por citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 α , IL-1 β , receptor antagonista IL-1 (IL-1ra) y sus receptores. Hay dos receptores para la IL-1 que se encuentran en la superficie celular, el IL-1RI (receptor tipo I) y el receptor IL-1RII (receptor tipo II). El IL-1RI es una proteína de 80 Kda cuyo dominio citoplasmático está formado por 215 aa, es el único responsable de la señalización intracelular tras la unión de la IL-1. El IL-1RII es una proteína de 60 Kda con un dominio citoplasmático truncado de 29 aa, cuando la IL-1 se une a él evita la unión al receptor IL-1RI y no se genera señal intracelular. A este receptor se le conoce como “receptor trampa o cebo”.

Ambos receptores comparten similitud en sus dominios extracelulares que pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas, cada uno está formado por tres dominios de IgG. Estos

dominios extracelulares pueden encontrarse en forma soluble. Y sólo tienen un dominio transmembrana y otro citoplasmático. Tanto la IL-1 α como la IL-1 β se unen con la misma afinidad al receptor tipo I. La IL-1ra se une tanto al receptor tipo I como al II, pero no genera respuesta, su función es antagonizar competitivamente los efectos inflamatorios de la IL-1.

Una de las características más interesantes de esta citocina es que es la única citocina inhibidora, que al no inducir señal de traducción intracelular, tiene una actividad regulada por sus niveles de producción, que a su vez están controlados por moléculas inhibidoras y activadoras. La desregulación entre los niveles de IL-1 e IL-1ra influye en la susceptibilidad a algunas enfermedades como la sepsis, cáncer, enfermedades metabólicas y enfermedades autoinmunes. Un aumento en los niveles de IL-1ra en circulación retrasa la producción de IL-1 y esto a su vez sería un mecanismo preventivo de respuesta inflamatoria excesiva y a largo plazo (Stéphane P. et al., 2008).

La IL-1 α se conoce también con el nombre de alarmina y está presente en condiciones de homeostasis, mediando las primeras fases de la inflamación al activar rápidamente una cascada de varias citocinas y quimocinas. A diferencia de la IL-1 α , la IL-1 β no se encuentra en condiciones de homeostasis, a ésta también se le conoce como el guardián de la inflamación y es principalmente secretada por monocitos, macrófagos, células dendríticas y por las células de la microglía (Garlanda et al. 2013).

La síntesis de la IL-1 β ocurre tras la estimulación por los PAMPs (del inglés Pathogen-associated molecular patterns) y la activación se debe a estímulos secundarios como los DAMPs (del inglés Damage-associated molecular patterns) en presencia de patógenos invasores y ante señales de peligro (Brough et al. 2011, Baroja-Mazo et al. 2014).

La IL-1 β es procesada por el inflamasoma NLRP3 (del inglés NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3), el cual es un complejo de señalización constituido por múltiples proteínas intracelulares que se forman en el citosol a una respuesta inflamatoria inmune. La formación del inflamasoma permite activar a una proteasa inflamatoria, la caspasa-1, la cual inicia el proceso de piroptosis que es una forma de muerte celular y un mecanismo efector de la inmunidad

innata. Esto genera la escisión y activación de la IL-1 β y de la pro-IL-18. El complejo del inflamosoma está formado por el receptor NLR (del inglés Nod-like receptor), una proteína ASC (del inglés Apoptosis-associated speck like protein) y la caspasa-1.

En la piroptosis junto con la caspasa-1, participan otro grupo de proteínas llamadas Gasderminas D (GSDMD), su papel ha sido descrito recientemente y son las responsables de la formación de los poros durante el proceso de piroptosis para la secreción de la IL-1 β (Ding et al. 2016). Una vez liberada y activada la IL-1 β se une a su receptor IL-1RI lo que genera el reclutamiento de IL-1RacP (del inglés IL-1R- associated protein) y la activación de los dominios citosólicos tipo Toll y tipo IL-1R lo que conlleva el reclutamiento de Myd88 (del inglés myeloid differentiation primary response gene 88) y de IRAK4 (del inglés interleukin-1 receptor associated kinase-4). IRAK4 se autofosforila y a su vez favorece la fosforilación de IRAK 1 y de IRAK 2, esto favorece el reclutamiento de TRAF6 (del inglés TNF receptor- associated factor).

IRAK1/2 y TRAF6 se disocian del complejo y activan a NF κ B. NF κ B en el núcleo actúa como factor de transcripción de genes inflamatorios así como de citocinas y moléculas pro-inflamatorias, IL-6, IL-8, MCP-1 y de la COX2, iniciándose así el proceso de la inflamación (Weber et al.,2010).

Tanto la expresión como la distribución de los miembros que componen la familia de la IL-1 han sido bien estudiados en tejido tumoral de carcinoma de mama, ya que regulan la actividad tumoral dentro del microambiente del tumor.

Se ha observado que los niveles de IL-1 están significativamente incrementados en tejido de carcinoma ductal invasivo comparado con tejido sano. Está involucrada en la invasión, angiogénesis e inhibición de la apoptosis de las células tumorales. Además niveles altos de IL-1 β se correlacionan con tumores de alto grado, muy invasivos y por lo tanto más agresivos.

Los miembros de esta familia modulan la actividad hormonal de los estrógenos y sus receptores. Los tumores con receptores de estrógenos negativos (ER-), son en los que se observan mayor expresión de IL-1, son tumores más agresivos , con mayor grado de invasividad y por lo tanto de metastizar y están asociados a peor pronóstico.

La IL-1 regula negativamente la expresión de los ER en líneas celulares de cáncer de mama, mientras que se ha observado que los niveles de IL-1ra regulan positivamente la expresión de los ER, con lo que altos niveles de IL-1ra y bajos niveles de IL-1 está asociado con buen pronóstico de la enfermedad. Un estudio Coreano demostró que existe un polimorfismo raro en el gen de la IL-1ra (IL-1RN*2) lo cual reduce el riesgo de padecer o desarrollar cáncer de mama, especialmente cuando está asociado a un bajo Índice de Masa Corporal (IMC) (Stéphane P. et al., 2008).

El hueso parece ser el sitio preferido para metastizar las células de cáncer de mama, principalmente las que expresan ER+. Cuando la célula tumoral migra al hueso, utiliza una serie de mecanismos que controlan la interacción entre diferentes tipos celulares como son los osteoclastos, osteoblastos y células stem cells hematopoyéticas (HSC), alterando así la homeostasis del hueso, favoreciendo la supervivencia de la célula tumoral, su estado de latencia o inactividad y su proliferación (Mishra et al., 2011).

Durante el proceso de colonización se establecen intersecciones entre la célula tumoral que expresa E-cadherina y la célula ósea, principalmente las osteogénicas que expresan N-cadherina (Wang et al. 2015) y también se crean interacciones entre CXCR4 de la célula tumoral y CXCL12 expresada por los osteoblastos, las stem cells mesenquimales (MSCs) y las células reticulares adventicias (Sugiyama et al. 2006), intervienen en la migración y en la adhesión de las células tumorales al nicho óseo metastásico.

Se ha descrito el papel de la molécula CXCL12 expresada en el tumor primario, que está implicada en la generación de las metástasis órgano-específicas, ya que los fibroblastos asociados a tumor que forman parte del microambiente del tumor primario, son capaces de mimetizar el microambiente de la médula ósea por generar esta molécula, lo cual da lugar a clones celulares de cáncer de mama que sobreexpresan Src, lo que favorece su supervivencia en médula ósea (Zhang et al. 2013).

La IL-1 β está involucrada en la homeostasis óseas. Si se inhibe dicha citocina se previene la

osteoclastogénesis y la osteoblastogénesis por lo que afecta tanto a la resorción como a la formación de hueso (Nakamura & Jimi 2006; Ruscitti et al. 2015). Puede considerarse como un buen biomarcador para predecir las pacientes con cáncer de mama con más riesgo de recaída en hueso ya que esto se correlaciona con los altos niveles de expresión de esta citocina en el tumor primario (Claudia Tulotta et al.,2018).

Si se inhibe a OPG en líneas celulares de cáncer de mama, disminuye la invasión y metástasis al hueso.

La IL-1 β favorece la expresión de OPG vía p38 y p42/22 de las MAPK. Se induce así su secreción y se favorece la infiltración de macrófagos en el tumor primario. Esto explica el papel de la IL-1 β y de la OPG en la promoción de la metástasis y la inflamación en cáncer de mama.

OPG es una molécula que se expresa principalmente en los osteoblastos, es inhibidor natural de la osteoclastogénesis a través de la inhibición de RANKL/RANK (Boyce & Xing 2008, Le Pape et al. 2016; Clara Gómez-Aleza et al., 2020), lo que explica su efecto antitumoral en el hueso.

La IL-1 β controla la invasión tumoral se ha observado en experimentos in vitro con la línea celular MCF-7 de cáncer de mama , esto puede ser debido a que esta citocina estimula la producción de la MMP-9 a través de la FAK (Focal adhesion kinasa 1) y del proto-oncogen tirosina-protein quinasa Src (Mon et al. 2017).

La IL-1 también está involucrada en el proceso de la angiogénesis, uno de los hallmark del cáncer, ya que se considera un potente activador de las células endoteliales (EC). Concretamente la IL-1 β regula la sobreexpresión de VEGF y de su receptor en la EC. A través de IL-1RI puede provocar la migración de la EC y favorecer la formación de vasos por activación de la p38-MAPK y de la MAPK – activated protein kinase 2.

El microambiente tumoral juega un papel importante en la resistencia a fármacos antiangiogénicos ya que las células inmunes que forman parte de él son una gran fuente de moléculas angiogénicas.

Se ha visto que la inhibición de la IL-1 β disminuye el reclutamiento de células inmunes al microambiente del tumor y esto limita la producción de sustancias pro-angiogénicas. La IL-1ra inhibe la angiogénesis y por consiguiente la progresión tumoral. Por lo tanto, la inhibición de la vía de señalización de la IL-1 en combinación con terapias antiangiogénicas, podría ser eficaz en el tratamiento de la progresión tumoral (Voronov et al. 2003).

Como hemos visto anteriormente la vía de señalización de la IL-1 β está fuertemente conectada con el mecanismo de la inflamación. Además la inflamación juega un importante papel en el proceso de progresión tumoral. El balance entre la IL-1 β y la actividad de la IL-1ra es muy importante en el control de la inflamación ya que la sobreexpresión de IL-1 β o de la IL-1ra, supone un aumento o una reducción de la inflamación respectivamente. El microambiente inmune del tumor juega un papel importante en el proceso inflamatorio. En modelos murinos deficientes en IL-1R hay una disminución del reclutamiento de MDSCs, por lo tanto disminuye el desarrollo del tumor primario.

En otros modelos de ratones con IL-1ra no funcional se demuestra aumento del proceso inflamatorio caracterizado por un rápido reclutamiento de las MDSCs. Esto sugiere que la inflamación se asocia a la progresión tumoral por aumento de los mecanismos inmunosupresores (Bunt et al. 2007).

Estudios in vitro han demostrado recientemente, que un co-cultivo de células de cáncer de mama del tumor primario y monocitos, genera un incremento de moléculas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-8 y MMPs (Espinoza-Sánchez et al. 2017), esto hace pensar que la inflamación junto con el reclutamiento de células inmunes favorecen el desarrollo del tumor mamario en estadios tempranos.

Es bien conocido que los efectos pro-inflamatorios de la IL-1 β promueven la metástasis. En un modelo in vivo de células de cáncer de mama se observa que las células tumorales inducen sistemáticamente inflamación por producción de IL-1 β , lo cual estimula también la liberación de IL-17 por parte de los linfocitos T $_{\gamma\delta}$. La IL-17 lleva a cabo la producción de G-CSF que favorece la

expansión y polarización de los neutrófilos hacia células T CD8+ con fenotipo supresor a través de la vía de iNOS, favoreciendo esto un ambiente inmune inmunosupresor y con ello las metastasis a distancia, principalmente a pulmón y ganglios linfáticos (Coffelt et al. 2015).

Además, la IL-1 β promueve la movilización de las MDSCs tanto en el tumor de mama primario como en las metastasis (Karki et al. 2017).

Con todo esto se puede concluir, que inhibir la vía de señalización de la IL-1 β podría suponer una nueva estrategia terapéutica, permitiendo por un lado bloquear la angiogénesis y por otro la inflamación ambos procesos involucrados principalmente en metástasis óseas en cáncer de mama (I.Holen et al., 2016).

- **IL-10/IL-10R.**- Juega un papel muy relevante en la patología del cáncer de mama. Es una citocina que se caracteriza por tener efectos pleiotrópicos tanto en la inmunorregulación como en la inflamación a través de las citocinas y células implicadas en la inmunidad humoral Th2, linfocitos T reguladores y de los monocitos/macrófagos. Por otro lado, disminuye la expresión de las citocinas que intervienen en la inmunidad celular Th1, antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y moléculas coestimuladoras de macrófagos.

Su baja expresión se asocia con un pobre pronóstico de la enfermedad.

El gen de la IL-10 está localizado en el cromosoma 1 q31-32 y está formado por cinco exones y abarca alrededor de 4.7 kb (Namazi et al., 2018; Sheikhpour et al., 2017). La proteína codificada por este gen tiene 160 aa y un peso molecular de 18 kDa y funciona como un dímero.

La vía de señalización de la IL-10 se caracteriza por enviar señales a través de un complejo de receptor transmembrana tetramérico compuesto por dos proteínas IL-10RA, también conocida como IL-10R1 y dos proteínas IL-10RB, conocida como IL-10R2. Estos receptores pertenecen a una familia de receptores de clase II, formados por un dominio extracelular, transmembrana e intracelular. El receptor IL-10RA tiene más afinidad por la IL-10 que el IL-10RB. Cuando la IL-10 se une al dominio extracelular de IL-10RA, conduce a la fosforilación de JAK1 y TYK2. A su vez JAK1

fosforila a STAT3, una vez fosforilada se trasloca al núcleo y activa la transcripción de genes anti-apoptóticos y de progresión del ciclo celular. La expresión de la IL-10 se regula por el balance entre STAT3 y un gen supresor de citocinas SOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3). El silenciamiento de STAT3 disminuye la expresión de IL-10.

La IL-10 humana tiene hasta un 73% de homología con la murina. Es producida por los macrófagos, linfocitos T y células NK. Es una citocina inmuno-reguladora multifuncional ya que es inmunosupresora y además tiene funciones antiangiogénicas, participando en la regulación de la respuesta inmune, infecciones, autoinmunidad, tolerancia al trasplante y en la tumorigénesis. Es conocida también como *factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF)*, al inhibir la síntesis de: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18, TNF α , factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) en células T y macrófagos, IFN γ en las células T helper (Th) activadas y en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Finalmente también, induce la proliferación de los mastocitos.

En estudios en modelos murinos se ha observado que la disminución del nivel de IL-10, está asociado a un incremento de la IL-1, citocina pro-inflamatoria implicada en el crecimiento tumoral (Elnaz S.et al., 2018).

La IL-10 colabora con la α 2-macroglobulina formando un complejo. La α 2-macroglobulina es una glicoproteína homotetramérica que se encuentra en el plasma y en los espacios extracelulares actuando como inhibidor de proteasas.

Se une de forma no covalente y transporta citocinas, incluida la IL-10, por lo tanto, la formación de este complejo incrementa las concentraciones de estas citocinas en sangre, aumentando su vida media en plasma, ya que esta unión las protege de la proteólisis y facilita su reclutamiento hacia los sitios inflamados donde induce su respuesta antiinflamatoria. La alteración de estos complejos promueve la inflamación y el desarrollo tumoral.

En cáncer de mama la IL-10 ejerce dos efectos contrapuestos, por un lado, es pro-apoptótica y por otro anti-apoptótica. El ARNm de la IL-10 está presente en el 50% de las muestras tumorales.

También se observa una alta concentración en el suero de pacientes comparada con la población sana y esto se asocia con un mal pronóstico de la enfermedad ya que promueve la proliferación y metástasis e inhibe la función y proliferación de los linfocitos T. Parece que la expresión de la IL-10 por células tumorales metastásicas puede desregular la respuesta inflamatoria mediada por células y ser un potente biomarcador de predicción y pronóstico en cáncer. Está involucrada en la inmunosupresión a través de la sobreexpresión de TNF, IL-1 e IL-12 y desregula la expresión de moléculas co-estimuladoras superficiales como CD80 y CD86 en las células tumorales, evitando además, que las APCs tengan acceso a los antígenos tumorales. Con todo esto, parece ser que los factores que contribuyan a favorecer la producción de IL-10 tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama. Otro efecto pro-tumoral de la IL-10 es a través de la estimulación de TIMP (Tissue inhibitors of metalloproteinases) o inhibición de la expresión de MMP (Matrix metalloproteinase), esto afecta a la angiogénesis. Otros estudios ponen de manifiesto que esta citocina promueve los efectos pro-inflamatorios incrementando la liberación del IFN γ y citocinas inducidas por este como la IP-10 (Interferon gamma-induced protein 10) (Elnaz S.et al.,2018).

Los TAM secretan grandes cantidades de IL-10 lo que induce resistencia a los tratamientos contra el cáncer de mama. El mecanismo de resistencia parece ir asociado a un incremento en la expresión de BCL2 y a una desregulación de la vía STAT3 en la célula tumoral.

La familia de proteínas BCL2 regulan la vía apoptótica intrínseca y se dividen en dos grupos: anti-apoptóticas Bcl-2-A1, Bcl2, Bcl-xL, Bcl-w y Mcl-1 y pro-apoptóticas Bad, Bak, Bax, Bid, Bim, Hrk, Noxa y Puma. Entre ellas se dan interacciones complejas ya que regulan las decisiones de muerte celular. La mama se caracteriza por tener una naturaleza muy dinámica donde se llevan a cabo ciclos secuenciales de crecimiento y muerte celular para ello las proteínas Bcl-2 son esenciales en su desarrollo y en el mantenimiento de la homeostasis. La desregulación de este grupo de proteínas puede impedir el desarrollo de varios puntos claves de esto pudiendo dar lugar a la evasión de la muerte celular, un hallmark del cáncer. Con estos datos, en el contexto del cáncer de mama, la desregulación de este grupo de proteínas promueve la resistencia a los tratamientos tanto de forma innata como adquirida. Estas proteínas están involucradas tanto en el desarrollo mamario como en la tumorigénesis y la resistencia a los tratamientos. Los TAMs median la resistencia a los tratamientos a través de la vía de señalización formada por el eje

IL-10/STAT3/BCL2, de manera que esto podría ser un target para nuevos tratamientos. Parece que los TAMs interceden tanto en la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. La infiltración de macrófagos inducida por la quimioterapia suprime la síntesis de la IL-12 por las células NK, lo que hace a su vez inhibir la actividad de los linfocitos CD8+ y esto limitaría la eficacia del tratamiento quimioterápico. Los macrófagos son el grupo celular que expresan los niveles más altos de IL-10, entre los leucocitos infiltrantes de tumor, incluidos los linfocitos Treg, conocidos por ser la fuente principal de IL-10 en modelos murinos (Elnaz S. et al., 2018).

Esta citocina se caracteriza por su polimorfismo genético ya que esto juega un papel muy importante en el inicio y progresión del cáncer de mama. Las variaciones genéticas que afectan a la síntesis de la IL-10 determinan la susceptibilidad al cáncer de mama. Varios polimorfismos de nucleótido simple (SNP) han sido identificados en el promotor de la IL-10. Se han caracterizado tres de estos SNP, en el nucleótido 1082 (rs1800896) hay un cambio de adenina (A) por guanina (G), en el nucleótido 819 (rs1800871) se cambia timina (T) por citosina (C) y en el nucleótido 592 (rs1800872) la sustitución es de adenina (A) por citosina (C). Estos polimorfismos determinan las diferencias interindividuales de la IL-10.

Esto lo demuestran los estudios de Giordani et al., 2003 y Mansour Moghimi et al., (2018), entre otros.

El mecanismo antitumoral de la IL-10 se asocia a la inhibición de la angiogénesis a través de la desregulación del VEGF, IL-1 β , IL-6, TNF- α y MMP-9 sintasa, todos ellos necesarios para llevar a cabo este proceso. También es una potente estimuladora de los linfocitos B para la secreción de anticuerpos. IL-10 también inhibe el NF- κ B, inhibiendo así la respuesta pro-inflamatoria temprana. Con estas funciones, la IL-10 en el tumor suprime su crecimiento y promueve la respuesta inmune antitumoral a través de las CTLs antitumorales. La actividad antitumoral también se le atribuye por la activación de las células NK. En modelos animales se ha demostrado que la IL-10 puede activar a las células NK y así destruir a las células diana de manera dosis-dependiente. Otras investigaciones indican que el efecto antitumoral se debe a la función de los linfocitos T CD4+ y CD8+. Parece que la inhibición de la respuesta inmune mediada por la IL-10 puede tener implicaciones importantes en inmunoterapia en cáncer de mama (Elnaz S. et al.,

2018).

- **IL-4/IL4R**.- En el tejido normal, la IL-4 se une al receptor IL-4R α que se expresa en linfocitos T y B, eosinófilos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos de pulmón, células epiteliales bronquiales, MDSC y células del músculo liso.

Hay dos tipos de receptores para la IL-4 que controlan sus funciones fisiológicas. Están compuestos por dos subunidades proteicas que heterodimerizan al unirse la IL-4 al IL-4R α . El tipo I del receptor IL-4R se expresa predominantemente en células hematopoyéticas y está formado por la subunidad α (IL-4R α) y la subunidad γ c. El tipo II se expresa en células no hematopoyéticas y está formado por las subunidades IL-13R α 1 e IL-4R α . La mayoría de los tejidos normales no expresan el receptor IL-4R tipo II. Este se encuentra sobreexpresado en la superficie de las células tumorales de algunos tumores sólidos como: carcinoma de células renales, melanoma, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, cáncer de colon, en células del sarcoma de Kaposi asociado al VIH y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

Por esta razón se han ensayado moléculas dirigidas al tumor fusionadas con IL-4. La citotoxina IL-4-PE38KDEL, es un ejemplo que ha sido ensayada en varios tipos tumorales incluido el carcinoma de mama recurrente o metastásico, en cáncer de riñón y cáncer de pulmón de células no pequeñas (Katherine V.B. et al., 2015).

Ruxolitinib, es un inhibidor de la vía JAK1/2 por inhibición de la fosforilación de STAT6, fue aprobado por la FDA para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda, carcinoma colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y cáncer de mama. A diferencia del tipo I IL-4R, el tipo II puede unirse y ser activado por la IL-13, aunque se une con mayor afinidad la IL-4. Una de las funciones descritas en este sentido es la señalización de la IL-13 por unión al receptor tipo II de la IL-4R en las células epiteliales de las vías respiratorias que contribuye a la hiperreactividad de estas vías y a la secreción de moco en el asma (Katherine V.B. et al., 2015).

Otra acción común que llevan a cabo la IL-4 y la IL-13, ambas inducen la transcripción del gen de la isomerasa tipo 1, la 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa/ Δ -5-4-isomerasa (3 β -HSD) la cual está involucrada en la síntesis de esteroides, tanto en líneas celulares de cáncer de mama como en tejido mamario sano. Se sabe que los esteroides sexuales juegan un papel muy importante en el desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria normal y también en el desarrollo del cáncer de mama. Estos se sintetizan a partir de precursores derivados en la glándulas suprarrenales. Un estudio realizado por Sébastien Gingras et al.,(1999), publicado en la revista Molecular Endocrinology, documenta el potente efecto estimulante de estas citocinas en la actividad de la 3 β -HSD en varias líneas celulares de cáncer mama como ZR-75-1, T-47D, MCF-7, MDA-MB-231 y en la línea celular de tejido mamario humano HMEC. Estas citocinas actúan sobre los precursores en las glándulas suprarrenales que son la dehidroepiandrosterona (DHEA) y el 5-DIOL para la síntesis de 3 β -HSD. Este estudio pone de manifiesto otra vía a través de la cual tanto la IL-4 como la IL-13 están implicadas en el desarrollo del cáncer de mama.

Hay datos que demuestran que la IL-4 es responsable de inducir crecimiento pro-metastásico en células epiteliales con sobreexpresión en el microambiente tumoral de tumores como el de mama, próstata, colon y páncreas.

La vía de señalización IL-4/IL-4R se pone en funcionamiento cuando el ligando se une al receptor, ya que el receptor por sí sólo no tiene actividad quinasa.

Esa unión activa a la familia de proteínas JAK que fosforilan a IL-4R α y se crean sitios de acoplamiento para otras proteínas de señalización. Es sabido que IL-4R α , γ c e IL-13R α 1, activan a JAK1, JAK3 y Tyk2. JAK3 se acopla a la subunidad γ c, aunque es posible que no tenga un papel destacado en la señalización del receptor IL-4R tipo II en cáncer epitelial. Esto se observó en cáncer de colon donde la IL-4 induce la fosforilación de JAK1, JAK2 y Tyk2, pero no la de JAK3.

Hay dos vías principales activadas en células inmunes en respuesta a la acción de la IL-4, después de la fosforilación del receptor IL-4R α a través de JAK.

1. Vía insulín receptors substrate protein (IRS)/ PI3K/AKT.

2. Vía de traducción de señal JAK y activadora del factor de transcripción 6 (STAT6). Una vez que STAT6 es fosforilado por JAK se forman dímeros de STAT6, se trasloca al núcleo e inicia la transcripción de genes asociados a IL-4/IL-13.

La IL-4 también activa a la vía de m-TOR en los linfocitos T controlando así su diferenciación y activa a la vía ERK a través de IRK en varios tipos celulares no linfoides. Bankaitis y Fingleton han demostrado que la IL-4 activa las vías AKT, ERK y m-TOR y que esto favorece la capacidad de colonización de las células de cáncer de mama murino in vitro, y que la expresión de IL-4R α se asocia con una mayor activación de STAT6, AKT y ERK en tumores de mama que metastizan a pulmón.

Hay datos que demuestran que la IL-4 es responsable de inducir crecimiento pro-metastásico en células epiteliales y además se sobreexpresa en el microambiente tumoral de tumores como el de mama, próstata, colon y páncreas. Esta citocina actúa sobre células inmunes que forman parte del microambiente tumoral como los linfocitos T CD4+ y CD8+. Si se inhibe el IL-4/IL4R en poblaciones linfoides pro-tumorales que expresan el receptor tipo I se ha visto que esto proporciona beneficio clínico en pacientes con cáncer metastásico. Si neutralizamos las acciones de la IL-4 esto provoca una disminución del crecimiento tumoral metastásico en cáncer de mama, de la mama al pulmón. Hay que tener en cuenta también que la inhibición del eje IL-4/IL-4R afectaría también a los procesos linfoides normales como la proliferación de los linfocitos T y B, la diferenciación de las células Th2 y las respuestas inflamatorias e inmunitarias (Katherine V.B.et al., 2015).

Otras poblaciones de células inmunes que forman parte del microambiente tumoral y se activan en respuesta a la IL-4 ya que expresan el receptor tipo II, son los TAM y las MDSC. Las MDSC tienen la particularidad que ellas mismas también pueden producir IL-4 y pueden responder tanto de forma autocrina como paracrina. Los TAM y las MDSC promueven el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis por supresión de la respuesta inmune antitumoral (D. Laoui et. al., 2011).

Se está trabajando en conseguir tratamientos selectivos, ya que las terapias actuales inhiben

tanto la función del receptor tipo I de la IL-4 en las células hematopoyéticas como al receptor tipo II que se encuentra en células mieloides y en células no hematopoyéticas como las células de cáncer epitelial. Esto plantea la situación de si una terapia dirigida al receptor tipo II exclusivamente, sería eficaz en tumores metastásicos y además limitaría la toxicidad sobre otros grupos celulares como células inmunes que expresan el receptor tipo I, particularmente las células linfoides. Dos estudios han demostrado que la activación del eje de señalización IL-4/IL-4R en células de cáncer epitelial promueven el crecimiento tumoral metastásico.

Un primer estudio demostró que la neutralización sistémica de la IL-4 por un anticuerpo monoclonal, reducía la carga tumoral pulmonar metastásica del cáncer de mama en un modelo murino.

Un estudio posterior demostró que la pérdida del receptor IL-4R α en las células tumorales conducía a una reducción del crecimiento tumoral metastásico pulmonar mucho mayor en comparación con el bloqueo de la IL-4. Con estos datos se vislumbran los roles que juega la IL-4 en el sistema inmune y además de cómo promueve directamente la metastásis en cáncer. Aunque se necesitan más estudios para entender la complicada interacción celular entre las células tumorales y las células del microambiente tumoral que expresan los receptores tipo I y tipo II, para el diseño efectivo de terapias anti- IL-4/IL-4R en el tratamiento del cáncer (Katherine V.B.et al., 2015).

- **IL-13/IL-13R:** Es una citocina pleiotrópica que comparte propiedades tanto estructurales como biológicas con la IL-4. El complejo receptor de la IL-13 está formado por IL-13R α 1 e IL-13R α 2, ambos con un peso molecular entre 55-70 Kda y con diferente afinidad por la IL-13.

Si establecemos una relación funcional entre la IL-13 y el microambiente tumoral, esto ayuda a comprender las diferentes vías de señalización asociadas a la activación del receptor. IL-13 α 1 se une inicialmente a la IL-13 y luego a la IL-4R α para que se establezca una señal de traducción eficiente. La IL-13 induce la fosforilación de las vías JAK2 y Tyk2 a través de IL-13R α 1 y de IL-4R α , además la fosforilación de JAK2 se asocia a la IL-4R α y la de Tyk2 a la IL-13R α 1 (Biswajit Roy et

al.,2002).

Otras vías fosforiladas y activadas por esta citocina son STAT1 α , STAT3, STAT5A/STAT5B y STAT6. Otros mediadores de la tumorigénesis mediada por la IL-13, serían el factor de transcripción AP-1 que depende de la inducción del TGF β , después de la unión a IL-13R α 2, como ocurre en macrófagos (P. Sinha et al.,2005).

Y el otro mediador es la 15-lipooxigenasa-1 (15-LOX-1), enzima que cataliza la oxidación de los ácidos grasos como el ácido araquidónico y linoleico, que conducen a la activación de PPAR γ , activando así el mecanismo de apoptosis, esto se asociaría con la función pro-apoptótica de la IL-13. Por este hecho también está involucrada en la aterosclerosis (Miranda A.et al., 2012).

La vía de señalización de la IL-13 va a través del receptor de la IL-4, IL-4R α 1 y de los receptores IL-13R α 1 e IL-13R α 2. Se han detectado niveles altos de IL-13 en tumores de mama y en sangre periférica de pacientes con cáncer de páncreas, esófago y gástrico. Estudios en cáncer de mama, describen que estos tumores están infiltrados por linfocitos T CD4+ que secretan tanto INF γ como IL-13 (Caroline Aspord et al.,2007). Además los niveles de expresión de esta se correlacionaban con el estatus del receptor de estrógenos y progesterona, parece ser que los niveles de expresión de IL-13 están asociados a tumores de mama sin expresión del receptor de estrógenos y por tanto más agresivos. Nahida Srabovici et al.,(2011) plantearon un estudio donde el objetivo fue investigar la presencia y expresión de la IL-13 en carcinoma ductal invasivo comparado con mujeres que tenían diagnóstico de tumores mamarios benignos. Además esto lo correlacionaron con parámetros anatomopatológicos, como el tamaño tumoral, la afectación ganglionar. Observaron que los niveles de expresión de la IL-13 eran más altos en las pacientes con cáncer mama y ganglios positivos, que en la población con enfermedad benigna. Según los resultados generados por este estudio, la IL-13 estaba involucrada en la carcinogénesis del cáncer de mama. Estudios llevados a cabo por Formentini et al., y Barderas et al., ponen de manifiesto el papel que juega la IL-13 y sus receptores en cáncer colorrectal.

En estos estudios observaron que en muestras tumorales, la expresión del IL-13R α 1 no influía en

la supervivencia y la expresión de la IL-13 no influyó en la aparición de metástasis en ganglios linfáticos. Además niveles bajos de expresión de la IL-13 se correlacionaban con un pobre resultado en la supervivencia global, comparado con altos niveles de expresión de dicha citocina, lo contrario de lo que cabría esperar. Se observó también que una alta expresión de IL-13R α 2 en pacientes con cáncer de colon predice estadios avanzados de la enfermedad y por lo tanto mal pronóstico.

Estos resultados en cuanto a la expresión de la IL-13R α 2 se han observado también en un tumor cerebral muy agresivo como es el glioblastoma multiforme (GBM) y en cáncer de ovario. Asimismo, el IL-13R α 2 se ha reportado como biomarcador de enfermedad en cáncer de ovario. En este sentido, una inmunotoxina específica para este receptor en ratón, fue estudiada y se vio una disminución importante de la carga tumoral y por lo tanto un aumento en la supervivencia del animal.

Existe correlación entre la expresión de IL-13R α 2 y el desarrollo de metástasis en algunos tipos tumorales. En un modelo ortotópico de cáncer de ovario humano se observó que la IL-13R α 2 se expresaba en tumores que metastizaban rápidamente a ganglios linfáticos y con ellos aumentaba la mortalidad del ratón. Además si se administraba de forma exógena IL-13 también aumentaba la mortalidad del animal, por lo tanto, el eje IL-13/IL-13R α 2 parece estar implicado en el aumento de agresividad tumoral. Esto mismo se observó en un modelo murino de cáncer de páncreas. Se han realizado también trabajos en modelos murinos de cáncer colorrectal donde se ha eliminado el gen que expresa la IL-13R α 2, reduciendo así la capacidad de metastizar a hígado y aumentando así la supervivencia (Fujisawa T. et al., 2009).

Otro mecanismo involucrado en la metástasis es la apoptosis. La IL-13 se ha descrito como anti-apoptótica y pro-apoptótica dependiendo del receptor y/o de las vías de señalización activadas.

Podemos concluir que la IL-4, la IL-13 y sus receptores parecen ejercer funciones importantes sobre la biología tumoral que serían diferentes a las que ejercen sobre las células del sistema inmune. Ambas vías de señalización involucradas en la respuesta inmune Th2, podrían ofrecer

nuevas terapias en el tratamiento contra el cáncer.

- **IL-5/IL-5R:** La IL-5 es una glucoproteína con forma de homodímero, producida por células Th2, células NK, mastocitos, basófilos y eosinófilos. Los eosinófilos son las células del sistema inmune que dependen principalmente de las acciones de la IL-5 para su diferenciación, activación, supervivencia, adhesión a las células endoteliales vasculares y para su actividad citotóxica, ya que tanto ellos como sus progenitores expresan el receptor de la IL-5 (IL-5R). Éstos producen IL-5 de manera autocrina prolongando así su supervivencia y además la IL-5 es necesaria para su migración junto con las quimocinas liberadas por estas células como la eotaxina-1, específica de eosinófilos y considerada la más potente. Otras quimocinas son RANTES (CCL5), eotaxina-2, eotaxina-3, MCP-2 (CCL8) y MCP-3 (CCL7) (ZJ. Amini-Vaughan, 2012).

La IL-5 se une a un receptor heteromérico formado por un ligando específico de alta afinidad de 65 kDa, que es IL-5R α y otro homodimérico de 130 kDa, β c, que es común al receptor GM-CSFR y al IL-3R. Una vez que la IL-5 se une a su receptor se pueden activar dos vías de señalización diferentes. Una es la vía de activación compuesta por la proteína Lyn, la cual cuando es activada la señal se propaga a través de Ras, Raf, MEK y MAPK . Y la otra vía es la de JAK2 y STAT1 (S. Kusano et al.,2012). Los productos finales de ambas vías son las MAPK y STAT1 que se translocan al núcleo. Las MAPK en el núcleo fosforilan factores nucleares como NFIL6, c-Jun, c-Myc, Elk-1, TCF entre otros. Éstos pueden estar involucrados en la transcripción de genes responsables de la prolongación de la supervivencia de los eosinófilos (R. Alam et al.,1995). Además las MAPK activan proteínas citosólicas como la fosfolipasa A2 (PLA2), la fosfolipasa C (PLC), Rsk y proteínas del citoesqueleto. La PLA2 interviene en el metabolismo del ácido araquidónico y en la generación de prostaglandinas y leucotrienos. La PLC participa en la generación de inositoltrifosfatos y diacilglicerol (K. Takatsu,2011; Zhale J.et al., 2012).

En cuanto a la relación de los eosinófilos con el cáncer existe un concepto que es “*eosinofilia tisular asociada a tumores*” (TATE). Parece ser que esto se ha asociado en algunos tipos tumorales a mejor pronóstico, aunque hay estudios contradictorios. Según van Driel, esta eosinofilia estaría asociada a un pobre pronóstico en cáncer de cérvix. Para Ishibashi, en cambio,

no hay correlación con el pronóstico de la enfermedad en carcinoma de células escamosas esofágicas.

Los eosinófilos producen VEGF e inducen su producción por las células endoteliales. Además producen quimocinas pro-angiogénicas como GM-CSF, FGF y TGF α y enzimas como las metaloproteasas, MMP. Según los datos recopilados de estos estudios parece que los eosinófilos podrían ser utilizados por las células tumorales para promover su supervivencia y expansión. Por otro lado, hay estudios que ponen de manifiesto que algunos tipos tumorales como colon, mama, colorrectal, nasofaríngeo, oral, gástrico y cabeza y cuello donde aparecen altos niveles de TATE están relacionados con mejor supervivencia y mayor tiempo de recurrencia. Estos estudios proponen a los eosinófilos como biomarcador pronóstico en cáncer (Zhaleh J. et al., 2012).

Diferentes estudios han relacionado los niveles de expresión de la IL-5 con el cáncer de mama. Uno de ellos es el propuesto por König et al., (2016), en el que se diseña un estudio donde determinaron los niveles de IL-4, 5, 6, 8 y 13 en el suero de pacientes con cáncer de mama antes de comenzar el tratamiento adyuvante y lo correlacionaron con los niveles de células tumorales circulantes (CTCs). Reclutaron 200 pacientes, 100 de ellas eran positivas para CTCs y las otras 100 eran negativas. Las características tumorales que tuvieron en cuenta para el estudio fueron: TNM, grado histológico, estatus de los receptores hormonales, estatus de los ganglios linfáticos y supervivencia vs muerte a causa de la enfermedad. Con todo esto los resultados del estudio mostraron que las pacientes que eran CTCs negativas tenían altos niveles de IL-8 e IL-13 y además eran receptores de progesterona negativos. Los niveles de **IL-5** aparecían aumentados en aquellas pacientes con ganglios positivos y expresión de HER2. La IL-4 estaba mayoritariamente expresada en las pacientes que habían fallecido a causa de la enfermedad y esto se correlacionaba con la no expresión de receptores hormonales. Además, esta citocina aparecía aumentada también en pacientes con receptor de progesterona positivo y receptor de estrógeno negativo. Asimismo, la IL-6 aparecía mayormente expresada en pacientes con tumores de grado 3 y sin expresión del receptor de progesterona. Con estos resultados, se concluye, que el incremento de las citocinas Th2 estaba asociados a un pobre pronóstico en cáncer de mama.

Otro estudio desarrollado por el grupo de J.A. Espinoza et.al., (2016), propuso la medición de los

niveles de citocinas en muestras de fluido intersticial de tumor de mama (TIF) y relacionarlo con la infiltración linfocitaria (TILs) y las características clinicopatológicas del tumor.

Se midieron 27 citocinas en 78 muestras de TIF, 43 muestras de fluido intersticial normal (NIF) y 25 muestras de suero de pacientes con cáncer de mama. 11 de esas citocinas aparecían en niveles muy altos en las muestras de TIF comparadas con las muestras de NIF, estas fueron IL-7, 10, factor 2 de crecimiento de fibroblastos, IL-13, IP-10, IL-1RA, PDGF β , RANTES, VEGF y la IL-12. Por análisis inmunohistoquímico demostraron que IL-1RA, IP-10, IL-10, PDGF β , RANTES y VEGF, estaban ampliamente expresados tanto por las células tumorales como por los TILs. También se objetivó que tanto IP-10 como RANTES, se expresaban mayoritariamente en el subtipo triple negativo comparado con el Luminal A. En un análisis de supervivencia, también pudo objetivarse, que altos niveles de **IL-5** en muestras de TIF indicaban mal pronóstico de la enfermedad.

Hong et al., (2013) propusieron un estudio donde midieron los niveles de citocinas Th1 y Th2 y lo asociaron a la expresión del ER. SE reclutaron 523 pacientes con cáncer de mama de nuevo diagnóstico, pre o postmenopáusicas, les midieron en plasma, los niveles de 27 citocinas. Las dividieron en dos grupos, las que expresan ER+ Luminal A (ER+ y/o PR+ HER2-) vs ER- TNBC (ER-,PR-, HER2-). Como resultado obtuvieron que los niveles de **IL-5** (Th2) eran más altos en el fenotipo ER- TNBC vs ER+ Luminal A y además en las mujeres premenopáusicas. Al igual que las citocinas Th1 (INF γ , TNF α e INF α 2) también se midieron niveles más altos en las pacientes ER- TNBC.

Estos resultados parecen otorgar un papel importante a la IL-5 en la etiología del cáncer de mama. Además se podrían proponer estrategias terapéuticas en el subtipo TNBC, con la incorporación de citocinas Th1 como el INF α 2 y terapias dirigidas a IL-5, como anticuerpos monoclonales que han sido desarrollados para neutralizar las acciones de la IL-5 o de IL-5R en enfermedades eosinofílicas.

2.5.3 Quimiocinas inmunoreguladoras relacionadas con el desarrollo del cáncer de mama.

Las quimiocinas son proteínas de pequeño tamaño que regulan el tráfico de células inmunes, como los leucocitos, bajo condiciones de homeostásis y durante la respuesta inmune específica.

Se caracterizan por ser una de las subfamilias de citocinas más grandes y se dividen en cuatro tipos principales dependiendo de la ubicación de los dos primeros residuos de cisteína (C) en su secuencia de proteínas, de esta manera tenemos los diferentes grupos de quimiocinas, las CC, las CXC, las C y las CX3C. El sistema formado por quimiocina-quimiocina receptor, comprende unas 50 quimiocinas y aproximadamente unos 20 receptores de quimiocinas, por lo tanto no hay un ligando único para cada receptor por lo que la unión de diferentes quimiocinas al mismo receptor podría tener efectos muy dispares, además todo estos efectos dependen del medio celular (Nisha N.et al., 2017).

En el microambiente tumoral, las quimiocinas son expresadas tanto por las células tumorales como por las células del estroma y las células inmunes que lo conforman. En respuesta a quimiocinas específicas, los diferentes subtipos de células inmunes migran al microambiente tumoral y de esta forma regulan la respuesta inmune tumoral. Además, las quimiocinas también actúan sobre las células tumorales y las células endoteliales vasculares del microambiente del tumor, favoreciendo así la angiogénesis y con ello la progresión tumoral y la metástasis e incluso favorecen la quimiorresistencia. Con todo esto, las quimiocinas afectan directa e indirectamente a la inmunidad tumoral con lo que podrían convertirse en objetivo terapéutico en el tratamiento del cáncer (Borsing L.et al., 2014; M.I. Palacios-Arreola et al.,2014; N. Nagarsheth et al.,2017).

A continuación se describe como afectan las quimiocinas al reclutamiento hacia el microambiente tumoral, de los diferentes grupos de células inmunes:

* LT y NK.- A las células T CD8+ se les conoce como células específicas de antígenos asociados a tumor (TAA), de manera que atacan a la célula tumoral de forma específica y controlan la inmunidad tumoral secretando citocinas efectoras, moléculas citotóxicas como granzima B y perforina e induciendo así, apoptosis de la célula tumoral. Además de los LT CD8+, los linfocitos T helper 1 (Th1) que expresan INF γ y las células NK, tienen potentes efectos antitumorales en el

microambiente tumoral. Tanto los LT CD8+ como los linfocitos Th1 y las NK, expresan el receptor 3 de quimiocinas CXC (CXCR3). Este es el receptor de las quimiocinas tipo Th1, como CXCL9 y CXCL10.

Niveles altos de CXCL9 y CXCL10, están asociados con un alto número de LT CD8+ infiltrantes de tumor y esto se correlaciona con una disminución de las metástasis y una mejora en la supervivencia de los pacientes con cáncer de colon y ovario.

En estudios recientes se ha observado que las células T CD8+ infiltrantes de tumor y las quimiocinas Th1, están asociadas a una respuesta terapéutica positiva al bloqueo de PD-1 y PDL-1. También se ha demostrado que el microambiente tumoral, sobre todo los fibroblastos, actúan sobre el metabolismo del cisplatino, en el cáncer de ovario. Esto se debió a que el INF γ secretado por las células T CD8+, alteró el metabolismo del glutatión y de la cisteína en los fibroblastos e impidió de esta forma la resistencia a la quimioterapia basada en platinos, lo que sugería que los LT CD8+ también pueden afectar al destino de las células tumorales de una forma independiente de su función TAA.

Por lo tanto, las quimiocinas de tipo Th1 reclutan células inmunes efectoras al microambiente tumoral y estas a su vez pueden afectar a la inmunidad tumoral y a las respuestas terapéuticas a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de TAA (Nisha N.et al.,2017).

* Células Th17.- Éstas células se caracterizan por expresar altos niveles de CCR6 (del inglés, CC-chemokine receptor 6) y CXCR4 y también de integrina CD49 y CD161 (del inglés, c-type lectin-likereceptor). Éstas moléculas están asociadas con la migración y retención de las células Th17 dentro de los tejidos inflamados y en los tumores. Altos niveles de CXCL12 (SDF1, ligando de CXCR4) y de CCL20 (del inglés, cc-chemokine ligando 20, ligando de CCR6) están presentes en el microambiente tumoral y puede facilitar el tráfico de células Th17 hacia el tumor. Las células Th17 no expresan el ligando CD62L, también conocido como L-selectina ni el CCR7, ambos promueven la localización de los linfocitos en los ganglios linfáticos, de manera que esto sugiere que su potencial en los órganos linfoides es limitado.

Las células Th17 que se infiltran en el tumor, tanto en humanos como en ratón, son polifuncionales, teniendo funciones similares de stem cells y mediando una potente inmunidad antitumoral.

Las Th17 no secretan granzima B ni perforina, sino que ejercen su acción antitumoral mediante el reclutamiento de células T CD8+, NK y DC en el microambiente tumoral.

Se ha demostrado en modelos murinos que la IL-17, actúa en el microambiente tumoral promoviendo la angiogénesis, con lo cual favorece el crecimiento tumoral. Sin embargo, el reclutamiento al microambiente del tumor generado por las quimiocinas de las células Th17, puede ser beneficioso para los pacientes con cáncer (Nisha N. et al.,2017).

* Células Th22.- Este tipo celular se encuentra en el microambiente tumoral de varios tipos de tumores como el de colon, páncreas y carcinoma hepatocelular. Estas células expresan CCR6 y se unen al ligando CCL20 en el microambiente del tumor de colon promoviendo la tumorigénesis. La IL-22 secretada por estas células actúa sobre las células tumorales activando STAT3, aumentando la expresión de H3K79 (histona H3 lisina metiltransferasa) en el complejo DOT1L y regula de forma positiva la expresión de H3K27 metiltransferasa en el complejo PRC2 (del inglés Polycomb repressive complex 2), particularmente en la subunidad EZH2 (del inglés zeste homologue 2).

El complejo DOT1L induce la expresión de genes centrales de células madre como NANOG y SOX2, que codifican para SRY-box2 y POU5F1, que codifica para POU class 5 homeobox 1, esto da como resultado un aumento del número de las stem cells lo que conlleva a un aumento del potencial tumorigénico y el aumento de la expresión de EZH2 se ha visto que favorece la proliferación de las células cancerosas de colon. Estudios en modelos murinos de cáncer de colon, respaldan la acción protumoral de la IL-22. En otros modelos de estudio, como el de cáncer de colon inducido por bacterias, las células linfoides innatas del colon (ILC) que expresan IL-22, se acumulan en el tumor y su reducción bloquea el desarrollo de cáncer de colon invasivo. Otra situación es el desarrollo de un tumor de colon inducido por azoximetano y dextrano sulfato de sodio (DSS), esto

regula a la baja la proteína de unión a la IL-22 (IL-22BP) y aumenta la proporción de IL-22 promoviendo la tumorigénesis. Con todo esto, podemos concluir que el reclutamiento de las células Th22 en el microambiente tumoral a través del eje CCR6-CCL20 favorece y promueve la formación tumoral (Nisha N.et al., 2017).

* Linfocitos Treg.- Estas células expresan CCR4 y se reclutan en el microambiente tumoral en respuesta a CCL22, producida por macrófagos y células tumorales. Las células Treg suprimen la inmunidad antitumoral de los linfocitos T, lo que conlleva al crecimiento tumoral. Además de la vía de señalización CCL22-CCR4, las células Treg expresan CCR10 y migran en respuesta a CCL28 que se encuentra en las regiones hipóxicas del microambiente tumoral.

Es bien conocido, que la médula ósea es el lugar principal elegido por las células tumorales para generar metástasis, ya que se caracteriza por un ambiente inmunosupresor que favorece la retención y el crecimiento tumoral. De acuerdo con esto, en médula ósea existe una gran concentración de linfocitos Treg caracterizados por tener fenotipo de memoria y expresar CXCR4. Además, las células Treg pueden movilizarse desde la médula ósea hasta la periferia ayudado esto por la acción del G-CSF, que promueve la degradación de CXCL12 en médula ósea.

Estas poblaciones de Treg se reclutan en médula ósea a través del eje CXCL12-CXCR4 y las CD son capaces de expandirlas a través de la vía de señalización RANK-RANKL, también conocida como vía de señalización TNFRSF11A-TNFSF11.

Las células Treg expresan citocinas inflamatorias como CXCL8, también conocida como IL-8 e IL-17, en el microambiente tumoral, éstas no sólo median la supresión de los linfocitos T, sino que promueven inflamación, de manera que el reclutamiento de los Treg al microambiente tumoral y su presencia en los sitios pre-metastásicos favorece tanto el inicio como la progresión y la metástasis tumoral (Nisha N.et al., 2017).

* Células NKT.- Las células NKT tipo I se definen por expresar el receptor de células T invariante, concretamente V α 14J218+ en ratón y V α 24J α 18+ en humano, tienen principalmente funciones

inmunitarias antitumorales ya que secretan INF γ para activar a las células NK y a las células T CD8+ y además activan a las CD al producir IL-12. Por el contrario, las células NKT tipo II, se caracterizan por la expresión de TCR que reconoce lípidos presentados por CD1d e inhiben la inmunidad tumoral. La mayoría de éstas células NKT, expresan receptores de quimiocinas como CCR2, CCR5 y CXCR3. CCL2 media el tráfico de las células NKT tipo I en el caso de los neuroblastomas.

El reclutamiento de éstas células en otros tipos tumorales, está poco estudiado (Nisha N.et al.,2017).

* Células B.- Las células B expresan CXCR4 y pueden ser reclutadas por CXCL12 en el microambiente tumoral. Parece ser que altos niveles de células B infiltrantes de tumor, se asocian con mayor supervivencia en cáncer de mama, cáncer de ovario seroso de alto grado y cáncer de útero. Las células B pueden estar presentes en estructuras linfoides asociadas a tumor y aumentar la respuesta de las células T liberando citocinas y quimiocinas, actuando como células presentadoras de antígeno y producir anticuerpos.

Sin embargo, estudios con ratones, han puesto de manifiesto que las células B pueden regular de forma negativa la inmunidad tumoral y promover la progresión ya que expresan IL-10 y TGF β . Además, activan receptores Fc γ (Fc γ R) en las células mieloides y en los mastocitos, con esto podrían promover la angiogénesis tumoral y el reclutamiento de células inmunes promotoras de tumores.

Se propone la existencia de diferentes subconjuntos de células B, pero se desconoce si estos diferentes subgrupos son reclutados en el microambiente tumoral por diferentes quimiocinas y si tienen roles diferentes en la inmunidad tumoral y en la tumorigénesis (Nisha N.et al., 2017).

* Células DC mieloides.- Las DC mieloides maduras pueden dar lugar a una respuesta inmune antitumoral por activación de células T antígeno específicas (TAA). Mientras que las DC mieloides inmaduras son pobres mediadoras de la activación de los TAA, por lo que activan respuesta de tipo Th2 y por lo tanto promueven la progresión tumoral. Éstas células inmaduras se encuentran,

principalmente en cáncer de mama y en el estroma del tumor. Las DC inmaduras expresan CCR6 y son reclutadas al tumor en respuesta a CCL20 en las células tumorales. Sin embargo, en modelos experimentales murinos, la sobreexpresión de CCL20 y CXCL14, pueden atraer DC mieloides al tumor y promover la maduración de las DC e inhibir así el crecimiento tumoral. En humanos esto aún no está bien estudiado (Nisha N. et al., 2017).

* Células DC plasmocitoides.- Estas células se encuentran en el microambiente tumoral. Las células tumorales y las del estroma secretan CXCL12 y las células DC plasmocitoides expresan integrina $\alpha 5$ (VLA5) y CXCR4, las cuales son las moléculas principales para mediar el tráfico de este tipo celular hacia el tumor. CXCL12, protege a las DC plasmocitoides de sufrir apoptosis. Las DC plasmocitoides inducen el desarrollo de células T CD8+ reguladoras productoras de IL-10, estas células T CD8+ expresan CCR7 y pueden albergar ganglios linfáticos y suprimir la activación de células T específicas de antígeno (TAA).

Además las DC plasmocitoides, pueden promover la angiogénesis tumoral, por lo tanto el reclutamiento de dichas células al lecho tumoral por la acción de la CXCL12 puede apoyar el desarrollo de un ambiente inmunosupresor que permite la progresión tumoral (Nisha N. et al., 2017).

* Macrófagos.- Son reclutados al microambiente tumoral a través del eje de señalización CCL2-CCR2. La expresión de CCL2 por parte de la célula tumoral se correlaciona con la presencia de los TAMs en algunos tipos tumorales y se asocia con un pobre pronóstico para el paciente, como ocurre en el caso del cáncer de mama. Los TAMs inhiben la activación de los linfocitos T específicos de antígeno, por expresión de los miembros de la familia de inhibidores B7, como son PD-L1 y B7H4 (VTCN1) y a través de la vía de TIM3 (del inglés galectin9-T cell immunoglobulin mucin 3). Los TAMs se caracterizan también por favorecer la quimiorresistencia por promover las stem cells y la metástasis. CCL2 también puede activar macrófagos asociados a metástasis, esto a su vez favorece la secreción de CCL3, lo que ayuda aún más a la retención de macrófagos en el tumor y en los sitios metastásicos. Otra vía interesante es la de CCL5-CCR5, puede ejercer un papel quimioatrayente adicional que afecta a los macrófagos en el cáncer de mama. El aumento

de expresión de CCL5 se correlaciona con las etapas más avanzadas de la enfermedad, debido a que ese reclutamiento al microambiente tumoral, promueve progresión y metástasis (A Ben-Baruch,2003).

Existen diferentes subtipos de macrófagos y macrófagos en diferentes estadios de maduración, que pueden tener diferentes funciones. Por ejemplo, los macrófagos CD68+ están asociados a una mejora en la supervivencia de los pacientes con cáncer de colon.

Los macrófagos CD169+ median en la activación de los TAA en los ganglios linfáticos que drenan el tumor e iniciar y promover la inmunidad tumoral, en un modelo de ratón.

Otras funciones conocidas de los macrófagos es que pueden aumentar y antagonizar la eficacia antitumoral de la quimioterapia citotóxica, de los anticuerpos dirigidos al tumor y de los agentes inmunoterápicos. Con esto, desde un punto de vista terapéutico, se podría seleccionar macrófagos mediante la manipulación de la señal del receptor de quimiocinas-quimiocinas (Nisha N.et al., 2017).

* MDSC.- Las MDSC monocíticas son reclutadas al microambiente tumoral por la CCL2. Las vías de señalización CXCL5-CXCR2 y CXCL12-CXCR4 parece ser que también están involucradas en el tráfico de MDSC en modelos murinos de cáncer de mama. CXCL8 regula la migración y la desgranulación de las MDSC granulocíticas a través de la señalización de CXCR1 y CXCR2. Tanto las células tumorales como las células mieloides expresan CXCL8 y con ellos reclutan neutrófilos al microambiente tumoral, éstos neutrófilos secretan varias moléculas que promueven la angiogénesis, por lo tanto, se cree que el reclutamiento de neutrófilos por CXCL8 promueve la progresión y la metástasis tumoral (Nisha N.et al., 2017).

Al hilo de todo lo expuesto, podemos decir que los diferentes subtipos de células inmunes son reclutadas al microambiente tumoral por las diferentes vías de señalización de quimiocinas y sus receptores y que cada uno de estos subtipos actúan de forma diferente, como los linfocitos T efectores, las células NK y quizás las NKT, pueden mediar la inmunidad antitumoral. Los Tregs, las células Th22 y los linfocitos B podrían mediar la tumorigénesis. Y finalmente el grupo de APC al

igual que los otros subtipos, regulan tanto la inmunidad tumoral como la progresión (Figura 18).

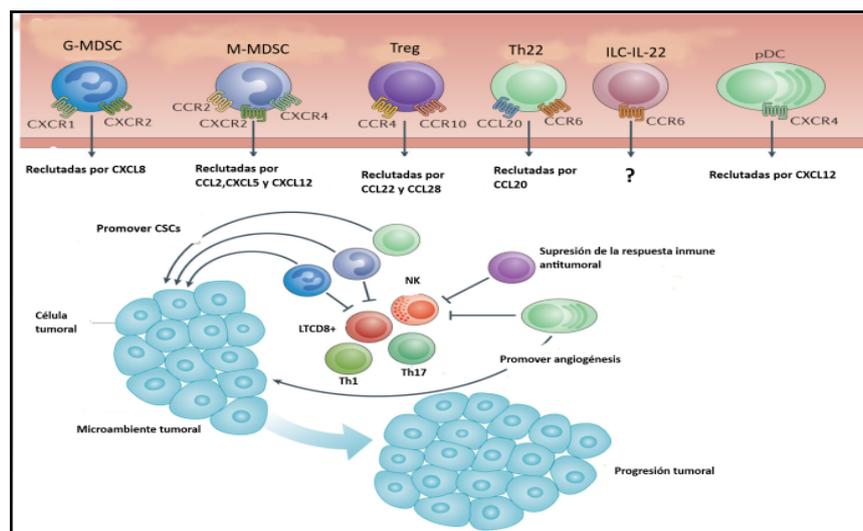


Figura 18. Efectos protumorales de las quimiocinas. Nat Rev Immunol. 2017 (Adaptada de Nagarsheth et al.)

En cáncer de mama tanto las células epiteliales cancerosas como las del microambiente tumoral secretan quimiocinas con características tanto pro-tumorales como antitumorales, el equilibrio entre ambas funciones juega un papel muy importante en la biología del desarrollo tumor como en su capacidad de metastazar. En el carcinoma de mama existe una interacción entre las células tumorales por un lado y las células inflamatorias, citocinas y quimiocinas, por otro.

Hay un estudio llevado a cabo por el grupo de D. Narita (2015), donde evaluaron la expresión de las quimiocinas en tumores de mama y en el plasma de tres grupos diferentes de mujeres, un

grupo había desarrollado la enfermedad, otro grupo tenían tumores benignos y otro grupo eran mujeres sanas. Lo que finalmente analizaron fue la asociación entre los niveles de quimiocinas en muestras de tejido y plasma en estos tres grupos bien diferenciados. Observaron que a nivel de la expresión de RNAm de los genes que codifican para las diferentes quimiocinas, 27 de ellas y 11 receptores de quimiocinas, tenían un patrón de expresión diferente en tejido tumoral comparado con tejido sano.

Comparando con los tumores benignos y tejido sano, la única quimiocina que se expresaba al alza en cáncer era la CXCL10, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas, $p=0.001$ para los tumores benignos y $p<0.001$ para el tejido sano.

En plasma, se sobreexpresaban significativamente en las pacientes con cáncer de mama en comparación con los controles sanos, nueve de las diez quimiocinas que habían seleccionado como, CCL2, CCL7, CCL18, CCL22, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11 y osteoprotegerina (OPG), con la excepción de la CXCL13, alcanzándose diferencias estadísticamente significativas (p entre 0.002 y $p<0.001$). En un modelo de regresión logística agrupando CXCL8, CXCL9 y CCL22, demostraron que eran predictores significativos de cáncer de mama en comparación con los controles sanos. Encontraron también una regulación positiva de CXCL8, CXCL11 y CXCL9 en cáncer de mama triple negativo. Además CXCL9 también se expresaba en tumores de baja proliferación y con ganglios linfáticos negativos. CXCL10, CCL7 y la OPG se expresaban en tumores poco diferenciados. Los niveles de CXCL8 y CCL18 fueron más altos en carcinomas en estadios más avanzados.

También evaluaron si el perfil de expresión de quimiocinas se correlacionaba con las características clinicopatológicas de las pacientes y correlacionarlo con el pronóstico de la enfermedad. Para ello tuvieron en cuenta: ER, PR, HER2, Ki67, tamaño tumoral, histología del tumor (carcinoma ductal invasivo, lobulillar, medular, medular atípico y mixto(ductal y lobulillar), metástasis en ganglios linfáticos, estadio tumoral (I-IV), grado histológico (1-3), edad de las pacientes (media 60 años) e IMC.

- *CXCL8/IL-8*: el estudio puso de manifiesto que la IL-8 está regulada al alza en tumores ER y PR negativos ($p=0.012$ y $p=0.019$), además es más abundante en tumores que se

caracterizan por metastizar a ganglios linfáticos, poco diferenciados, altamente proliferativos, gran tamaño y HER2 positivo, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas. De acuerdo con estos resultados, en otros estudios también se observó que la IL-8 está involucrada en la invasividad, angiogénesis y metástasis en cáncer de mama.

Además la CXCL8 se correlacionaba con el grado histológico y la infiltración de macrófagos en el microambiente tumoral y en tumores de mama metastásicos, un alto nivel de CXCL8, se relacionó con la osteoclastogénesis y resorción ósea, lo que conducía a una mayor osteólisis.

- *CXCL10*: los resultados obtenidos para esta quimiocina fueron que estaba regulada positivamente en tumores de gran tamaño, pobremente diferenciados, carcinomas ductales. Aunque también los niveles se encontraron elevados en tumores ER y PR negativos, HER2 positivos, Ki67 alto, ganglios linfáticos positivos y tumores en estadios avanzados, no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas. Este estudio junto con otros, concluyeron que esta quimiocina se asocia a un fenotipo agresivo de carcinoma de mama.
- *CXCL11/I-TAC* (del inglés Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant): de esta quimiocina se encontraron niveles elevados en aquellos tumores ER negativo ($p=0.002$), también en tumores bien diferenciados, Ki67 bajo, ausencia de metástasis a ganglios linfáticos, tumores pequeños, estadios tempranos, HER2 positivos y carcinomas ductales. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que sugieren que esta quimiocina sobreexpresada, podría tener un efecto antitumoral y predecir un buen pronóstico de la enfermedad.
- *CXCL9/MIG* (del inglés Monokine induced by gamma): fue más abundante en tumores ER negativo ($p=0.007$), HER2 negativo ($p=0.016$), Ki67 bajo ($p=0.012$), ganglios linfáticos negativos ($p=0.035$), tumores bien diferenciados, pequeño tamaño, estadios tempranos y en carcinomas de tipo no ductal, aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente

significativas. Los resultados obtenidos en este estudio junto con los de otras investigaciones, coinciden en que esta quimiocina expresada positivamente en tumores de mama, podría ser útil para seleccionar a un subgrupo de pacientes de buen pronóstico dentro de los tumores ER negativos. La sobreexpresión de CXCL9 en el tumor conlleva a la inhibición del crecimiento tumoral local y metastásico, un efecto terapéutico mediado por la infiltración de linfocitos T y células NK al tumor.

- *OPG*: se encontró que era más abundante en carcinomas ductales, ER/PR negativos, HER2 positivos, con un alto grado de proliferación, pobremente diferenciados, ganglios positivos, tumores ≥ 5 cm y estadios avanzados. Los resultados obtenidos en este estudio se correlacionaron con los generados por otros, y están de acuerdo en que la expresión de OPG se correlaciona de forma negativa con el aumento del grado histológico y además se observó que la expresión positiva de OPG por las células tumorales mejoraba su supervivencia ya que inhibía la apoptosis inducida por TRAIL. En modelos animales de cáncer de mama se ha visto que OPG inhibe el desarrollo de lesiones óseas y el crecimiento de las células tumorales en el hueso. Este dato experimental podría quizás ser una potencial opción terapéutica para el tratamiento de lesiones óseas en pacientes con cáncer de mama.
- *CCL22/MDC* (del inglés Macrophage- Derived Chemokine): en este estudio la CCL22 estaba más expresada en tumores HER2 positivos, pobremente diferenciados, ganglios positivos, estadios avanzados y tumores pequeños, por lo que parece que ésta quimiocina tiene un papel importante en etapas tempranas del desarrollo tumoral. También se obtuvo niveles más altos en el plasma de mujeres con tumores benignos comparados con los controles sanos. En estudios in vitro, la interacción de las células mieloides como monocitos y DC y las células tumorales, favorece el aumento de los niveles de CCL22, esto podría favorecer el reclutamiento de Tregs y con ello conducir al escape inmunológico del tumor y por lo tanto a la progresión tumoral.
- *CXCL13/BLC* (del inglés B lymphocyte chemoattractant-BLC): los resultados referentes a ésta quimiocina en este estudio, no fueron estadísticamente significativos en el plasma de

pacientes con cáncer de mama comparado con tumores benignos o controles sanos, pero en concordancia con otros estudios está significativamente asociada a tumores ER negativo, estadíos avanzados, ganglios linfáticos positivos y tumores agresivos.

Panase et al., (2008) encontraron que la CXCL13 estaba sobreexpresada en tumores de mama, tanto a nivel de RNAm como de proteínas y que se encontraba elevada en el plasma de pacientes con cáncer de mama metastásico y que esto podía poner de manifiesto el papel de CXCL13 en el desarrollo y progresión de la enfermedad. Recientemente, se ha identificado en un panel de 14 genes candidatos tanto para el pronóstico como para la predicción de metástasis en cáncer de mama triple negativo.

- *CCL18*: es mayoritariamente producida por macrófagos M2. Cuando se analizó el perfil de esta quimiocina, se mostró que se expresa abundantemente en cáncer de mama y que promueve la migración y la invasión por adherencia a la EMT. Con todo esto, se asoció que altos niveles de CCL18 tanto en plasma como en el tumor estaban asociados a metástasis en pacientes con cáncer de mama.
- *CCL17/MCP-3* (del inglés Monocyte Chemotactic Protein 3): los resultados que se obtuvieron fueron que estaba regulada al alza en pacientes con cáncer de mama comparadas con mujeres sanas y además se correlacionaba con un alto grado histológico (G3), pero no se obtuvo correlación ni con el Ki67, ni con el tamaño, con esto, ellos concluyeron que ésta quimiocina estaría relacionada con tumores agresivos y no con la cinética del crecimiento tumoral.
- *CCL2/MCP-1* (del inglés Monocyte Chemoattractant Protein-1): niveles elevados de ésta se han correlacionado con recaídas tempranas, estadíos avanzados, alto grado histológico, ganglios linfáticos positivos y con un pobre pronóstico. En este estudio sólo se encontró relación con el tamaño del tumor. De acuerdo con otros estudios, también se ha manifestado el carácter antitumoral de la CCL2, de hecho se observó que había un incremento en los niveles de CCL2 en mujeres con tumores de mama benignos. Está

descrita la actividad anti-metastásica del eje CCL2-CCR2, implicado en la inhibición de la progresión y metástasis tumoral. Hay varias investigaciones en este campo que apoyan que CCL2 y CCL3 reclutan linfocitos T CD4+, CD8+ y NK para controlar la progresión tumoral y la metástasis. En un modelo de cáncer de mama ortotópico que utilizó la línea celular 4T1, se observó que CCL2 tenía actividad protumorigénica en los sitios primarios, mientras que inhibía el desarrollo de metástasis a distancia como a pulmón.

Parece ser que el papel de CCL2 y de las células CCR2+, durante la tumorigénesis y la metástasis parecen estar fuertemente relacionadas con el tipo celular, con el tipo de tumor y con el estadio de la enfermedad. Además dependiendo del tipo de modelo experimental que se utilice, reflejan resultados opuestos, con lo que se necesitan más estudios para ver el papel de CCL2 en el desarrollo de la metástasis.

Después de los resultados obtenidos en este estudio, se puede resumir, que la sobreexpresión de CXCL8 y CXCL10, está claramente asociada con marcadores pronósticos negativos como ER negativo, pobre diferenciación y carcinoma ductal en estadios avanzados. Altos niveles de CXCL9 se correlacionaron con ganglios negativos, bajo índice de proliferación, tumores bien diferenciados, tamaño pequeño, estadios tempranos y carcinomas de tipo no ductal, aunque también aparece sobreexpresada en carcinomas ER negativo, HER2 negativo. Con estos datos, se podría seleccionar un subgrupo de pacientes de mejor pronóstico. El modelo de regresión logística que utilizaron identificó tres quimiocinas, CXCL8, CXCL9 y CCL22, con alto potencial para diferenciar entre mujer con o sin cáncer. La CXCL10 fue la única quimiocina que se encontró expresada en cáncer cuando se comparó con el grupo de tumores benignos y controles sanos. Por lo tanto, este grupo de investigación, identificó un importante panel de quimiocinas que están asociadas al cáncer de mama y que podrían ser ampliamente estudiadas para buscar biomarcadores pronósticos o nuevos tratamientos en cáncer de mama.

2.5.4 Factores de transcripción: Su relación con el Sistema Inmunitario y el cáncer de mama

2.5.4.1 NF- κ B y HIF: Implicación en la respuesta inmunitaria

Tanto la hipoxia como la inflamación, están asociadas a una serie de condiciones patológicas como son las enfermedades que cursan con inflamación crónica, como por ejemplo la artritis reumatoide y el cáncer. La hipoxia se relaciona con los factores inducibles de hipoxia (HIFs) y la inflamación con el factor de transcripción NF-kB (del inglés nuclear factor kappa B).

Hay estudios que confirman la participación de HIF en la tumorigénesis, interactuando con otros factores de transcripción como STAT3, Myc, Notch y NF-kB. En particular HIF1 α , se asocia con metástasis y progresión, ya que los tejidos tumorales se caracterizan por un alto nivel de hipoxia, favoreciendo un entorno pro-inflamatorio y con ello favoreciendo el reclutamiento de células inmunes a estos sitios, a la vez esto genera inflamación crónica lo cual activa a NF-kB (V. Kumar et al., 2014).

La colaboración de HIF y NF-kB en la promoción de la carcinogénesis, se hace a través de la activación de genes de la IL-6, COX-2, MMP-9, entre otros, así como la inducción de genes de supervivencia como Bcl-2. Además, HIF1 α controla la respuesta inflamatoria tumoral mediada por la activación de TLR4. Un tumor que se caracteriza por inflamación crónica, es el carcinoma hepatocelular, en el cual hay una expresión constante de citocinas que favorecen el reclutamiento de células inmunes. En este caso, el TNF α activa directamente a NF-kB y a los TAMs (Laura D'Ignazio et al., 2015).

Existe un crosstalk importante entre ellos en cuanto al control de la respuesta inmune y su acción sobre algunos subtipos celulares inmunes como: MDSCs, macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y linfocitos B.

*NF-kB.- Fue descubierto por Ranjan Sen y David Baltimore en 1986, durante el estudio de la expresión del gen que codifica la cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas en los linfocitos B. Desde entonces, innumerables estudios han demostrado su participación en la expresión de genes, vías de señalización y enfermedades humanas. NF-kB es el nombre que se utiliza para englobar una familia de factores de transcripción compuesta por RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-

kB1(p50/p105) y NF-kB2 (p52/p100). Estas subunidades pueden ser activadas por diferentes estímulos, como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), virus, citocinas o factores de crecimiento. La activación da lugar a la degradación de una familia de proteínas inhibidoras conocidas como IκBs. Después de la fosforilación de estas proteínas por quinasas, como el complejo IKK, las IκBs son dianas para la degradación por el proteosoma y la subunidad NF-kB es liberada y se trasloca al núcleo donde activa a sus genes diana específicos.

Los miembros de la familia NF-kB forman tanto homo como heterodímeros y activan o inhiben una red compleja de genes, los cuales junto a citocinas, quimiocinas o receptores de membrana, están involucrados en la respuesta inmune. Cuando la vía de señalización NF-kB está deteriorada o desregulada, la respuesta puede ser deficiente o estar fuera de control, lo que conduce a una falta de respuesta inmune o a una respuesta inmune exacerbada y dañina, respectivamente. NF-kB modula el balance proliferativo de las células inmunes, en esto se incluyen genes diana como Bcl-xL, proteínas inhibidoras de la apoptosis o el factor estimulante de granulocitos-monocitos.

Varios estudios han puesto de manifiesto la importancia de NF-kB en el control de la proliferación y la apoptosis de las células hematopoyéticas, así como de las células T, células B, NK y DC (Wei W. et al., 2015).

*HIF.- Es un factor de transcripción heterodimérico, compuesto por las subunidades HIFα y HIF-1β. La subunidad HIFα está formada por tres subunidades: HIF1α, HIF2α y HIF3α, las cuales tienen funciones superpuestas, pero a su vez distintas en las células. La sensibilidad al oxígeno se consigue por la acción de una dioxigenasa que modifica las subunidades de HIFα, específicamente. En medios hipóxicos, HIF activa una serie de genes que están involucrados en procesos como la glicólisis, angiogénesis, proliferación, migración, autofagia y apoptosis, entre otros. Aunque el papel de HIF está asociado a la hipoxia, en los últimos años también se le ha relacionado con la inflamación ya que es capaz de inducir citocinas proinflamatorias y quimiocinas, directamente. Estudios recientes involucran a HIF1β y HIF2α, en el control de la respuesta inmune. Es importante destacar que el control de la respuesta inmune mediado por HIF implica un crosstalk con NF-kB. Aunque la inducción de HIF es a través de la hipoxia, existen

mecanismos independientes de la hipoxia que también favorecen la activación de HIF, estos incluyen a la vía m-TOR y un incremento de la transcripción dependiente de STAT3 y principalmente de NF- κ B (Laura D'Ignazio et al., 2015).

*HIF y NF- κ B: Su diafonía en el sistema inmunitario.

La respuesta a la hipoxia y la respuesta inmunitaria, tanto la respuesta innata como la adaptativa, están estrechamente conectadas. A la vez ambas respuestas están reguladas por los factores de transcripción HIF y NF- κ B. Hay estudios que ponen de manifiesto el importante papel de HIF1 α en la promoción de citocinas proinflamatorias reguladas por NF- κ B en macrófagos después de la estimulación del LPS y en la mediación de la activación de NF- κ B en neutrófilos anóxicos.

Existe evidencia de que cambios en los niveles de oxígeno regulan la proliferación y diferenciación de múltiples tipos celulares involucrados en la respuesta inmunitaria como macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B , en ello están involucrados ambos factores de transcripción, HIF y NF- κ B, respectivamente.

En los macrófagos, la hipoxia afecta a la monocitopoyesis, en particular a la maduración de estos. En respuesta a la disminución de los niveles de oxígeno, los monocitos cambian a un metabolismo glucolítico y detienen su migración, inducida por un gradiente quimiotáctico. Con ello, los macrófagos diferenciados sirven como fagocitos y se acumulan en los sitios de inflamación hipóxicos. Además en condiciones de hipoxia, se regulan de forma positiva, moléculas necesarias para la supervivencia de los macrófagos, como es el transportador de glucosa GLUT1.

Tanto HIF1 α como HIF2 α , son importantes reguladores de las funciones de los macrófagos en condiciones de hipoxia, aunque no queda claro si tienen funciones bien diferenciadas. En un modelo de ratón con la vía HIF1 α inhibida en células mieloides, se mostró que dicha vía está involucrada en actividades inflamatorias y antibacterianas dependientes de macrófagos. Otro

estudio demostró que HIF2 α comparte funciones con HIF1 α en la respuesta inflamatoria aguda, pero en este caso no está relacionada con la producción de NO o con la expresión de moléculas coestimuladoras, lo que sí implica es la expresión de citocinas inflamatorias específicas en respuesta a estímulos M1 e infiltración de leucocitos.

En macrófagos humanos hay que destacar que la sobreexpresión de HIF2 α favorece la transcripción de genes proangiogénicos como VEGF, IL-8 y factor de crecimiento de plaquetas, incluso en condiciones normóxicas. Tanto en macrófagos humanos como en murinos, se ha visto que la hipoxia puede activar la expresión genética de forma independiente de HIF, a través de la regulación positiva de NF-kB, de la activación del factor de transcripción 4 (ATF4) y de Egr-1.

HIF y NF-kB responden de manera sinérgica frente a patógenos, los macrófagos infectados tanto por bacterias gram negativas como por gram positivas, se caracterizan por una expresión defectuosa en HIF1 α tras la ablación de IKK β , regulador esencial de la actividad de NF-kB (J. Rius et al., 2008; Laura D'Ignazio et al., 2015).

Los neutrófilos se caracterizan por ser importantes células de origen mieloide que fagocitan patógenos extraños y promueven la inflamación, además tienen una vida media corta y su principal fuente metabólica es la glucólisis. Estas células llegan a los sitios de inflamación por acción de las citocinas y llevan a cabo la eliminación de patógenos por fagocitosis, aunque pueden emplear otros métodos.

El estudio de Walmsley y colaboradores pone de manifiesto que en los neutrófilos HIF1 α activa a NF-kB en condiciones de hipoxia y con ello aumenta la supervivencia de dichas células. Esto lo confirmaron, mediante la ablación de PHD3, lo que conllevó a una mayor inducción de HIF1 α y se corroboró el aumento en la supervivencia de los neutrófilos. Además, demostraron que se requiere HIF1 α para llevar a cabo la glucólisis en neutrófilos.

En el caso de los neutrófilos, es necesario más investigación en este campo, ya que no queda claro aún el papel de HIF2 α ni el de HIF1 β (Laura D'Ignazio et al., 2015).

Las células T, son reclutadas desde los órganos linfoides secundarios a los lugares de inflamación por acción de citocinas, quimiocinas, por el equilibrio de nutrientes y por la disponibilidad de oxígeno en el microambiente inflamatorio, lo que puede afectar al metabolismo y función de este tipo celular. Durante su desarrollo y maduración, estas células se encuentran con diferentes niveles de tensión de oxígeno.

Tanto en el sitio de inflamación como en tejidos no linfoides, las células T efectoras pueden estar expuestas a ambientes hipóxicos prolongados, lo que da lugar a la estabilidad de HIF1 α . En los linfocitos T, la expresión de HIF1 α también la pueden inducir la estimulación del receptor de las células T, TCR, seguida de la activación de la vía de PI3K/m-TOR. La IL-6 también impulsa la expresión de HIF1 α por activación de STAT3. Varios estudios han evaluado el papel de HIF1 α , tanto en timocitos deficientes en la proteína VHL como en linfocitos T deficientes en HIF1 α . Se observó un aumento de la infiltración de células inflamatorias y un cambio en la remodelación vascular, sugiriendo esto que HIF1 α se comporta como un regulador negativo de los linfocitos T. Al igual que los tipos celulares descritos anteriormente, en el caso de las células T, los estímulos que activan a HIF1 α , como antígenos y citocinas, también activan a NF- κ B.

El TCR y el correceptor CD28, también pueden activar la vía NF- κ B, induciendo a su vez la activación transcripcional de la IL-2, la cual está involucrada en la supervivencia y proliferación de los linfocitos T. Por lo tanto, NF- κ B, es uno de los factores de transcripción más importantes en el desarrollo y diferenciación de las células T. En el desarrollo de las células T, NF- κ B participa en la fase temprana de su diferenciación, independientemente de la presentación del antígeno, en el linaje antígeno-dependiente y en la maduración postselección.

Hay una evidencia clara, que el crosstalk existente entre HIF y NF- κ B es fundamental en la diferenciación de los Tregs por activación transcripcional de FOXP3, en la que c-Rel y RelA, están involucrados. Además HIF1 α , también promueve el equilibrio entre Tregs y las células Th17. De hecho, durante a diferenciación de las Th17, los linfocitos T CD4+, dependen de HIF1 α , para regular su metabolismo celular. Además un estudio ha reportado que las células T son más

sensibles a la hipoxia bajo la estimulación de NF- κ B dependiente de HIF1 α . Teniendo todo esto en cuenta, se necesita más investigación sobre los numerosos activadores que comparten ambas vías, NF- κ B y HIF, en el desarrollo y función de los linfocitos T, para poder estudiar nuevas estrategias de tratamiento dirigidas a estas vías (Laura D'Ignazio et al., 2015).

En los LB, NF- κ B participa en el desarrollo normal de las células B y además se conoce que está desregulado en enfermedades relacionadas con éstas células. Hay trabajos que ponen de manifiesto la importancia de HIF en los linfocitos B. Se han realizado estudios genéticos donde se han utilizado la delección específica de HIF1 α en ratones, con ello se ha demostrado que HIF1 α está involucrado en el desarrollo normal de las células B. La comunicación entre ambos factores de transcripción, se ha determinado en el contexto de enfermedad. Se demostró que NF- κ B, es responsable de la inducción del RNAm de HIF1 α en linfoma maligno. No se dispone de información de cómo HIF modula la actividad de NF- κ B en las células B. Por otro lado, HIF2 α podría estar involucrado en el desarrollo de linfomas de células B, ya que un estudio reportó que el RNAm de HIF2 α está controlado E2F1 en las células B, en un modelo de ratón de linfoma de células B (Laura D'Ignazio et al., 2015).

Con todo ello, se necesita más investigación del papel que juegan ambos factores de transcripción en éste tipo celular.

En las DC, el efecto de la hipoxia sobre sus funciones está avalado por reports, donde se describe que el efecto de la hipoxia podría favorecer la capacidad de este tipo celular para inducir la respuesta inmune. En células dendríticas humanas, se ha demostrado en condiciones de hipoxia, que regulan positivamente la expresión de algunos receptores de reconocimiento como CD180, receptores tipo Toll-like (TLR 1-2), receptores de lectina tipo C, receptores Fc de inmunoglobulinas y receptores de activación como CD69 y CD141. En ratones deficientes en HIF1 α en células mieloides, las APCs expresan niveles más bajos de MHCII y de moléculas coestimuladoras, CD80 y CD86. Además, tienen una menor capacidad para inducir la proliferación de los linfocitos T. Lo contrario se observó en ratones wild-type. En otro experimento, donde las DC se cultivaron con células tumorales de glioblastoma bajo condiciones

de hipoxia, se observó que estas DC eran muchos mejores para presentar antígenos a los linfocitos T CD8+, que las cultivadas en condiciones normóxicas.

También se ha encontrado que HIF1 α , regula positivamente la capacidad migratoria de las DC derivadas de monocitos humanos. (Figura 19).

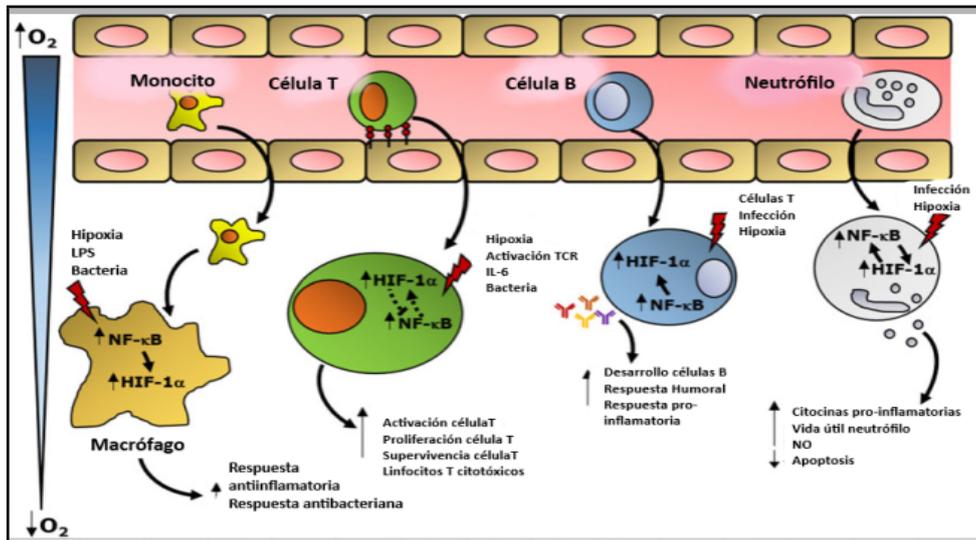


Figura 9. Cross-talk HIF 1 α /NF- κ B en diferentes grupos de células inmunes. The FEBS Journal 2015. (Adaptada de L D'Ignazio et al.)

En el caso de las *MDSCs*, la vía de señalización NF- κ B además de regular la respuesta inmune, controla el desarrollo de células mieloides como las MDSCs y los Tregs. Existe evidencia que mediadores de la inflamación como la IL-1 β , IL-6, TNF α , las alarminas como HMGB1 y S100A8 y A9, pueden aumentar la diferenciación de las MDSCs y estimular sus propiedades inmunosupresoras. Todos estos factores a su vez son potentes activadores de NF- κ B, lo cual indica que este factor de transcripción tiene un importante papel en la expansión de las MDSCs en el tejido inflamado. Bunt et al., demostraron que todos estos factores pro-inflamatorios liberados por las células tumorales, inducían acumulación y activación de dichas células y esto a su vez favorecía la supresión inmune y el escape de la vigilancia inmune. Recientemente, otro estudio llevado a cabo por el grupo de Flores et al., utilizando un modelo murino, observaron que el número de MDSCs aumentaban en médula ósea y en bazo con el envejecimiento del ratón, a través de un mecanismo dependiente de NF- κ B (Vinit Kumar et al.,2014)

Parece ser que la vía TLR4/Myd88, es uno de los principales potenciadores de la inmunosupresión de las MDSCs, en situaciones como la infección y el cáncer. Wang et al., demostraron que varios agonistas específicos de TLR, alteraban la diferenciación y las funciones de dicho tipo celular. Los TLR no sólo están relacionados con la vía NF- κ B, si no también con otras vías que pueden ser activadas. Además existe cooperación entre las vías NF- κ B y STAT3. En células aisladas de cáncer de mama, se ha observado que la vía no canónica de NF- κ B estimulaIDO en las MDSCs mediado esto por STAT3.

HIF1 α se relaciona con la regulación de las funciones y diferenciación de las MDSCs en el microambiente tumoral. Corzo et al., demostraron que las MDSCs del bazo son las principales responsables de la supresión de las células T específicas de antígeno mediada por ROS. Sin embargo, en el microambiente tumoral, las MDSCs suprimen las funciones de las células T no antígeno específicas, generando altos niveles de NO y de arginasa I y bajos de ROS. En un experimento con MDSCs esplénicas expuestas a un ambiente hipóxico o utilizando un quelante de hierro, la deferrosamina (DFO), un estabilizador de HIF1 α , se observó que las MDSCs favorecían la supresión de los linfocitos T no antígeno específica, reproduciendo estas condiciones las del microambiente tumoral.

Se evidencia también, que HIF1 α en el microambiente tumoral favorece la diferenciación de MDSCs a TAMs, de hecho las MDSCs que carecen de HIF1 α no son capaces de diferenciarse a TAMs, lo que sí adquieren marcadores de DC en el microambiente tumoral. Esto también fue demostrado por Liu et al., ellos propusieron que la vía mTOR/HIF1 α , inducía la reprogramación metabólica glucolítica en las MDSCs que se requiere para adquirir el fenotipo M1 y que esto le propocionaba a estas células protección contra el tumor. Ponen también de manifiesto, que SIRT-1, es uno de los principales impulsores de ello, ya que su deficiencia hace que la diferenciación de MDSCs sea al fenotipo M2 y esto conlleva a una disminución de la actividad glucolítica (H. Dai et al.,2020).

Además, HIF1 α influye en la función de las MDSCs tumorales por regulación de la expresión de

PD-L1, ésto parece ser debido a que HIF1 α se une directamente a un elemento de respuesta a la hipoxia transcripcionalmente activo en el promotor de PD-L1, pero esto no se limita sólo a las MDSCs sino que también se observa en macrófagos, DC y células tumorales. Si se bloquea PD-L1 en condiciones de hipoxia disminuye la supresión de linfocitos T mediada por MDSCs, regulando negativamente IL-6 e IL-10.

En este punto hay que mencionar otra vía de señalización, la de AMPK (del inglés AMP-activated protein kinase), muy importante, ya que actúa sobre las funciones de las MDSCs impactando ello, sobre todo en cáncer y en envejecimiento. Hay varios estudios que constatan que las moléculas activadoras de la vía AMPK, inhiben las funciones de las MDSCs y demuestran actividad antitumoral. Es una vía que se caracteriza no sólo por regular el metabolismo de los tejidos, sino también por regular la respuesta inmune, ya que coopera con otras vías de señalización inmune afectando con ello al inmunometabolismo y a las funciones de las células inmunes. Está bien establecido que la vía AMPK inhibe la actividad de NF-kB y por lo tanto estaría inhibiendo la respuesta a la inflamación. Además inhibe otras vía de señalización inmune importantes como JAK-STAT, c/EBP β , CHOP y la vía HIF1 α , las cuales favorecen la expansión y activación de las MDSCs con lo que se fomentaría un ambiente inmunosupresor y se favorecería el escape de las células tumorales de la vigilancia inmune (A. Salminen et al., 2019; Y Wang et al., 2020).

En los macrófagos, la vía AMPK, promueve la polarización del fenotipo proinflamatorio M1 al fenotipo M2 antiinflamatorio. Además, la activación de esta vía regula la señalización de citocinas antiinflamatorias como IL-10 en macrófagos.

Ishii et al., demostraron que la activación de AMPK suprimía la proliferación de los macrófagos inducida por lipoproteínas de baja densidad oxidadas (Ox-LDL). También observaron que la activación de esta vía, inhibía la expresión de GM-CSF, inducida también por Ox-LDL. Esta es una importante observación ya que GM-CSF es un inductor de las MDSCs en médula ósea.

Otros estudios han puesto de manifiesto que la vía AMPK está involucrada en la diferenciación y en las funciones de los linfocitos T, regulando su metabolismo energético.

Todas estas observaciones evidencian que la vía de activación AMPK, controla el balance entre metabolismo energético y respuesta inmune (Figura 20).

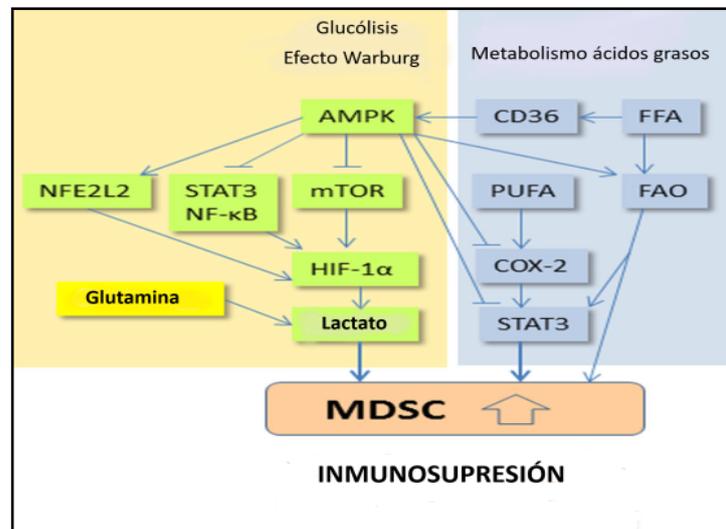


Figura 20. Vías metabólicas a través de las cuales AMPK controla la activación de las MDSCs. Journal of Molecular Medicine (2019) (Adaptada de A. Salminen et al.).

2.5.4.2 HIF y su papel en cáncer de mama.

La hipoxia intratumoral regula genes dianas dependientes de HIF, que en cáncer de mama son: EGFR, AKT, PI3K, PTEN, m TOR, TP53 y HER2, entre otros. El aumento de los niveles de HIF1 α , se ha demostrado por IHC en biopsias de ganglios linfáticos tanto negativos como positivos en pacientes con cáncer de mama, ya que independientemente del estado de los ganglios, se observó que la supervivencia de las pacientes estaba disminuida de forma significativa en aquellas con una alta expresión de HIF1 α en sus muestras.

En un estudio reciente, se ha estandarizado ensayos inmunohistoquímicos cuantitativos, para poder predecir el resultado en pacientes con ganglios negativos donde se identificó una firma altamente predictiva que constaba de cinco marcadores y uno de ellos era HIF1 α , esto podría

predecir en cierta medida el transcurso de la enfermedad en el 90% de las pacientes analizadas.

En un meta-análisis realizado por The Cancer Genome Atlas Network, el cual se centró en el estudio de genes diana de HIF1 α , tanto en el inmunofenotipo basal como en el luminal y se identificó un aumento en la expresión de HIF1 α en el subtipo basal.

Existe evidencia que los HIFs están involucrados en el desarrollo de metástasis en cáncer de mama. Las células tumorales que sobreviven y se reprograman en condiciones hipóxicas, tienen la ventaja de sobrevivir en los lechos metastásicos. Desde un punto de vista clínico, esto está respaldado por el hallazgo en pacientes con tumores primarios con una alta expresión de HIF1 α , las cuales van a recaer de manera temprana y con un tiempo de supervivencia más corto (Danielle M Gilkes, 2013). Recientemente se ha demostrado que los HIF juegan un papel muy importante en las metástasis de cáncer de mama a pulmón a través de moléculas de adhesión de tipo angiopoyetina ya que facilitan la extravasación de las células tumorales desde la vasculatura pulmonar y los miembros de la familia de las lisil oxidasas (LOX), LOXL 2 y LOXL 4, promueven la invasión y la formación de nichos metastásicos (Gregg L. Semenza, 2012).

Actualmente es bastante complicado predecir cuáles van a ser las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama que van a desarrollar metástasis, sin embargo, parece ser que la expresión de HIF1 α , podría predecir el mal pronóstico de la enfermedad. También se ha demostrado que la firma genética dependiente de HIF, diferencia a los subtipos luminal y basal, siendo este último el que mayor expresión tiene. De ahí que se contemple como nueva terapia para el tratamiento de TNBC a los inhibidores de HIF.

También sería de gran utilidad este tratamiento, en pacientes con cáncer de mama y ganglios linfáticos negativos que desarrollan de forma temprana metástasis a distancia en el 30-40% de los casos. Esto ayudaría a estratificar a las pacientes y evitar terapias más agresivas e innecesarias (P. Chaturvedi et al.,2013).

2.5.4.3. NF-kB y su papel en cáncer de mama.

La activación de este factor de transcripción pro-inflamatorio es observado en cáncer de mama. Además se ha demostrado que la activación de NF-kB está asociada al desarrollo y progresión de dicha enfermedad ya que se asocia con los subtipos más agresivos, como el caracterizado por ER negativo y HER2 positivo y el TNBC. La sobreexpresión de la vía NF-kB sólo o asociada a otras vías de señalización, promueve la angiogénesis, favorece la EMT, incrementa en número de CSC, todo esto conduce a quimiorresistencia, radiorresistencia y resistencia endocrina, todo esto se asocia con los inmunofenotipos agresivos mencionados anteriormente, que conducen a recaídas tempranas, estadíos avanzados de la enfermedad y por lo tanto un tiempo de supervivencia reducido. Con todo lo expuesto, NF-kB podría ser un objetivo válido en el tratamiento del cáncer de mama (W. Wang et al.,2015).

Como se puede comprobar de todas las evidencias anteriormente comunicadas, existen multitud de elementos que intervienen en la génesis y progresión del cáncer de mama, gran parte de los mismos relacionados con fenómenos de inmunoevasión. Uno de los desafíos más importantes en una enfermedad como el cáncer, es su diagnóstico temprano y disponer lo antes posible de un tratamiento adecuado. Hoy día el método de elección para obtener información molecular del tumor, es la biopsia del tejido, que se caracteriza por ser un método invasivo, un procedimiento de mayor duración, alto coste, información molecular limitada a las áreas donde se ha obtenido la muestra y no es compatible para monitorizar al paciente a lo largo del tratamiento.

Por lo tanto, uno de los retos en el diagnóstico del cáncer, sobre todo en etapas pre-invasivas, sería encontrar biomarcadores a través de procedimientos no invasivos como es la “biopsia líquida”, la cual presenta ventajas sobre la biopsia de tejido: es una técnica minimamente invasiva, se emplea menos tiempo para la extracción de la muestra, es de bajo coste, la información molecular que aporta es superior y más completa y podemos monitorizar al paciente a lo largo del tratamiento.

Además la biopsia líquida utiliza diferentes biofluidos y permite estudiar de una manera más

completa las características de la enfermedad extrayendo componentes tumorales como, ctDNA, CTC, exosomas y/o ctRNA, entre otros. Con todo esto podemos decir que ésta técnica novedosa tiene un futuro muy prometedor en el campo del cáncer (A. Alba-Bernal et al.,2020).

Tanto en el contexto del cáncer en general, como en el cáncer de mama en particular, se está introduciendo la biopsia líquida como metodología para evaluar los componentes circulantes del tumor, tanto en estadios tempranos de la enfermedad como en etapas más avanzadas y esto se está documentando a través de ensayos que utilizan el ctDNA para la determinación del perfil genético del tumor y la respuesta a los tratamientos, incluida la resistencia a los mismos.

Se ha determinado que el ctDNA después de la cirugía con intención curativa en cáncer de mama, podría facilitar la detección temprana de enfermedad mínima residual, lo que ayudaría a iniciar terapia adyuvante para prevenir la recaída temprana. Y además con el recuento de las CTC en plasma, podríamos evaluar tanto el estadio como el pronóstico de esta enfermedad, ya que en cáncer de mama parece que es donde más se ha estudiado el papel de las CTC (F-C Bidard.et al., 2015).

Empieza también a adquirir más interés en cáncer de mama, el estudio del ctRNA ya que cada vez se están obteniendo resultados más interesantes sobre éste. Mayoritariamente se están empleando miRNA para la estratificación molecular del tumor, la respuesta a los tratamientos y la predicción de recaídas. En otros tipos tumorales también se utilizan el lcnRNA o los circRNA.

El estudio de los exosomas en biopsia líquida cada vez es más evidente en cáncer en general, con un enfoque especial en cáncer de mama.

Los exosomas son partículas subcelulares que pueden ser detectadas en diferentes biofluidos, de ahí que dependiendo del tipo tumoral podemos seleccionar un biofluido para detectar dichas partículas de los pacientes. Éstos contienen proteínas, RNA y DNA, los cuales podrían definir las características biológicas y patológicas del tumor a tiempo real. También ha sido demostrado el papel de los exosomas para valorar la inhibición de la proliferación y la respuesta a la quimioterapia (S. Halvaei et al., 2018).

En nuestro trabajo utilizamos una especie de inmuno- biopsia líquida para determinar biomarcadores como las MDSCs, Tregs, linfocitos T CD4+OX40+PD-1+ y linfocitos TCD8+OX40+PD-1+, constituyendo una herramienta potencial para identificar biomarcadores inmunitarios y correlacionarlos con la respuesta al tratamiento. Éstos subtipos celulares son detectables en la sangre periférica de las pacientes y podemos obtener un perfil inmunológico de cada paciente en diferentes momentos de la enfermedad. Es importante destacar que éstos hallazgos pueden revelar nuevas dianas terapéuticas que se podrían asociar a las modernas estrategias inmunoterapéuticas.

Hipótesis y Objetivos

1. Hipótesis

La hipótesis principal de este estudio reside en la consideración de que las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico irresecable, presentan un estado de inmunosupresión basal que puede detectarse en sangre periférica a través de la medición de una serie de elementos claves como son los niveles de poblaciones celulares de MDSCs y de linfocitos Tregs, principalmente. Asimismo, consideramos, que este estado puede revertirse a una situación de inmunocompetencia con el tratamiento sistémico de primera línea indicado para cáncer de mama metastásico.

2. Objetivos

2.1 Principales

- Analizar y comparar los niveles de MDSCs y linfocitos Tregs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama avanzado y población sana (estudio casos-contróles).
- Analizar y comparar los niveles de MDSCs y de linfocitos Tregs en sangre periférica en el grupo de pacientes que alcanzan beneficio clínico comparado con las pacientes que progresan (estudio BC vs PE), tras tratamiento sistémico de primera línea para cáncer de mama avanzado.

2.2 Secundarios

- Correlacionar los niveles en sangre periférica de otras subpoblaciones celulares (leucocitos, monocitos, neutrófilos, linfocitos T CD4+ CD8+) con la respuesta al tratamiento en las pacientes (estudio BC vs PE).
- Comparar los niveles en sangre de las subpoblaciones celulares entre las pacientes y la cohorte sana (estudio casos – controles).

- Estudio de los marcadores de expresión co-activadores (OX-40) y co- supresores (PD-1) en linfocitos CD4+ y CD8+, tanto en las dos poblaciones de estudio (pacientes y grupo control), como en respuesta al tratamiento de primera línea.

Materiales y Métodos

Metodología:

1. Diseño del estudio

Esta tesis doctoral ha sido desarrollada a partir del proyecto titulado “ Análisis del perfil de respuesta inmune en sangre periférica inducido por tratamiento sistémico en el carcinoma de mama avanzado”. Es un estudio observacional prospectivo que ha sido llevado a cabo en el Hospital Universitario Virgen Macarena, participando los servicios de Oncología Médica y de Bioquímica Clínica. Este proyecto ha sido financiado por la Fundación Progreso y Salud: Proyectos de investigación 2014-PI-0502-2014.

2. Sujetos del estudio

2.1. Pacientes

En este estudio han sido incluidas 51 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama de debut metastásico o en recaída, en el H.U. Virgen Macarena. El periodo de inclusión comenzó en Enero de 2016 hasta Febrero 2020, fecha de inclusión de la última paciente participante en los resultados recogidos para la realización de esta tesis, ya que el reclutamiento sigue activo. Las pacientes incluidas, fueron únicamente aquellas de nuevo diagnóstico para cáncer de mama avanzado de manera prospectiva desde el inicio del estudio. Se excluyeron aquellas que habían recibido tratamiento sistémico de primera línea.

A las pacientes se les realizaron tres determinaciones en sangre periférica, una basal antes del comienzo del tratamiento de primera línea, otra a los dos meses (ciclo 3) y la última a los seis meses o a progresión del tratamiento (ciclo 6).

Las pacientes incluidas en el estudio recibieron tratamiento elegido por el clínico responsable (hormonoterapia, inhibidores de ciclinas más hormonoterapia, terapia anti-Her2 más quimioterapia, quimioterapia, etc) siguiendo las directrices del Protocolo de Tratamiento del Cáncer de Mama de la UGC de Oncología Médica del Hospital Universitario Virgen Macarena

vigentes en cada momento y basados en las guías de práctica clínica internacionales para cáncer de mama, National Comprehensive Cancer Network (NCCN) “Clinical Practice Guidelines Breast Cancer” y la guía de la European Society for Medical Oncology (ESMO) “Clinical Practice Guidelines on Breast Cancer”.

2.2. Población sana

Se incluyó un grupo de 20 mujeres sanas, sin antecedentes oncológicos conocidos. Todas ellas profesionales sanitarios del Servicio de Oncología Médica y del Servicio de Radioterapia del H.U. Virgen Macarena. Siguiendo las mismas directrices epidemiológicas y demográficas de la muestra de pacientes, en cuanto a sexo, raza y rango de edad.

3. Materiales

3.1. Determinaciones inmunológicas

De cada paciente se obtuvieron 2 tubos de EDTA-K3 refrigerados y 2 tubos de suero con gel separador, los cuales fueron centrifugados para hacer las tres determinaciones correspondientes a las pacientes y la correspondiente a la población sana.

Los tubos de EDTA-K3 se procesaron en el laboratorio de referencia (Servicio de Bioquímica y Biología Molecular del Hospital Universitario Virgen Macarena) y se realizaron las siguientes determinaciones:

Realizamos un hemograma para conocer el recuento absoluto de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos totales y monocitos.

- Inmunofenotipo sérico: linfocitos CD3 (LT), CD19 (LB), CD3-CD16+CD56+ (NK), CD3CD4,

CD3CD8,CD3CD4CD8(inmaduros),CD3CD8CD16+CD56+(CD8activados),
CD4+/CD25+CD3CD8CD16+CD56-, CD3-CD16+CD56+CD8+, CD3-CD16+CD56+CD8-, CD161.

- Análisis de la subpoblación de linfocitos Treg.
- Antígenos de superficie (moduladores de la actividad de linfocitos T CD4 y CD8).
 - a. Expresión de coestimuladores: OX40.
 - b. Expresión de correpresores: PD-1.
- M-MDSC y G-MDSC.

Por cada muestra de sangre periférica se realizó un hemograma y un marcaje celular con anticuerpos monoclonales para su análisis por citometría de flujo. Se empleó el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, San José, USA) y los resultados obtenidos fueron analizados con el software BD FACSDiva™ (BD Biosciences).

3.2 Determinación de células supresoras de origen mieloide (MDSCs)

Para cuantificar la subpoblación de células supresoras de origen mieloide fueron marcadas con anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-Human CD 45 (Ref: 564105; BD Pharmingen™).
- PE-Cy™7 Mouse Anti-Human HLA-DR (Ref: 560651; BD Pharmingen™).
- -APC-Cy™7 Rat Anti-CD11b (Ref: 557657; BD Pharmingen™).
- -PE Mouse Anti-Human CD 33 (Ref: 555450; BD Pharmingen™).
- -FITC Mouse Anti-Human CD 14 (Ref: 555397; BD Pharmingen™).
- -APC Mouse Anti-Human CD 15 (Ref: 551376; BD Pharmingen™).

La selección de las subpoblaciones de células supresoras mieloides se realizó con estrategia de gateo secuencial. Para la subpoblación monocítica (M-MDSC) CD45+CD33+CD11b+HLA-DR-CD14+CD15- y para la subpoblación granulocítica (G-MDSC) CD45+CD33+CD11b+HLA-DR-CD14-

CD15+.

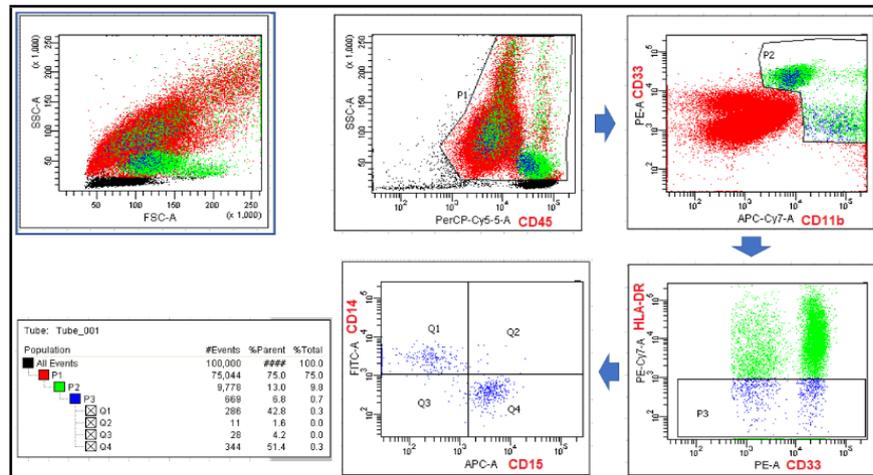


Figura 21 . Caracterización de las células MDSC, M-MDSC y G-MDSC. Laboratorio de Bioquímica Clínica H.U.V.Macarena.

Como muestra la figura 21, en el gráfico de la izquierda, se representa FSC (Forward Scatter o dispersión frontal) vs SSC (Side Scatter o dispersión lateral). FSC da información sobre el tamaño celular y SSC sobre complejidad o granulosidad. En este gráfico podemos observar que se seleccionan dos poblaciones que son los granulocitos y los monocitos, y queda una pequeña nube negra que si las gateamos serían linfocitos. En el segundo gráfico, representamos SSC (granulosidad) vs CD45, la región que seleccionamos es positiva para CD45, porque queda a la derecha del eje de CD45, por lo tanto, aquí tenemos células CD45+. En el tercer gráfico representamos CD33 vs CD11b de las células CD45+, sabemos que las MDSC son CD33+ y CD11b+, seleccionamos esa región y tenemos células CD33+CD11b+CD45+. En el cuarto gráfico representamos HLA-DR vs CD33 de las células anteriores, seleccionamos las que son CD33+HLA-DR-, ya tenemos caracterizadas las células CD45+CD33+CD11b+HLA-DR-. Y en el último gráfico representamos CD14 vs CD15, para seleccionar las subpoblación monocítica y granulocítica, obteniéndose: M-MDSC (CD45+CD33+CD11b+HLA-DR-CD14+CD15-) y G-MDSC (CD45+CD33+CD11b+HLA-DR-CD14-CD15+).

El cálculo para obtener el valor absoluto de M-MDSC, se multiplica “eventos de interés/eventos totales” por el valor absoluto de leucocitos (obtenido en el hemograma). En este caso sería

$286/100.000= 0.00286$ por recuento absoluto de leucocitos. Y el valor absoluto de las G-MDSC es $344/100.000= 0.00344$ por el recuento absoluto de leucocitos.

3.3 Determinación de los linfocitos T reguladores (Tregs)

Para el marcaje de los linfocitos T reguladores se utilizó el anticuerpo monoclonal Human Regulatory T Cell Cocktail (Ref: 560249; BD Pharmingen™). Contiene FITC Anti-Human CD4; PE-Cy™7 anti-Human CD25 y Alexa Fluor® 647 anti-Human CD127. Este cocktail no integra el factor de transcripción FOXP3, considerado como el principal regulador del desarrollo y de la función de éstas células, además es el marcador fenotípico más importante de esta subpoblación celular (Figura 22).

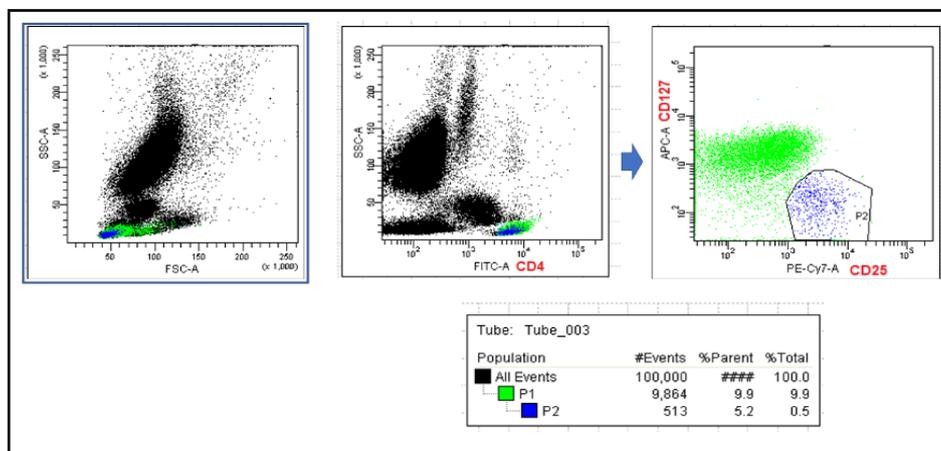


Figura 22. Caracterización de linfocitos Treg. Laboratorio de Bioquímica Clínica H.U.Virgen Macarena

En la figura 22, podemos observar la caracterización de los linfocitos Treg, en el primer gráfico representamos FSC vs SSC, nos aparecen tres poblaciones celulares diferentes, abajo y a la izquierda salen células con poca granulosidad y de pequeño tamaño, son linfocitos (azul), los Treg aparecen seleccionado en esta región, abajo y a la derecha, son células más grandes y con poca granulosidad, son monocitos (verde) y la nube que sale arriba en SSC, tiene mayor granulosidad, son granulocitos (negro). En el segundo gráfico, se representa SSC vs CD4, aquí seleccionamos la región correspondiente a positivos para CD4 y poca granulosidad, por tanto los Treg están en esta zona, abajo y a la derecha (azul). Y el último gráfico, representamos CD127 vs CD25, la región azul

corresponde a aquellas células CD25+ y CD127-, con lo cual representan a los linfocitos Treg.

El cálculo para obtener el recuento absoluto de Treg se obtiene multiplicando la proporción de eventos de interés/eventos totales” por el recuento absoluto leucocitos que obtenemos del hemograma. En este caso particular se obtendría $513 \text{ Treg}/100000 \text{ células totales} = 0.00513 \times$ recuento absoluto de leucocitos, así obtendríamos el recuento absoluto de Treg.

Hay otros grupos de investigación que también utilizan CD127, en vez de FOXP3, ya que el inconveniente de FOXP3 es que al ser una molécula intracelular su detección requiere la permeabilización de la membrana celular con lo cual los linfocitos Treg no podrían ser utilizados para estudios funcionales posteriores. Por todo esto se propone utilizar la molécula de superficie, CD127 (cadena α del receptor de la IL-7), permite la separación específica de los Treg por citometría de flujo y se pueden utilizar posteriormente en estudios funcionales. La ausencia o baja expresión de CD127, se correlaciona con la expresión de FOXP3 y con la actividad inmunomoduladora (CJ Montoya et al., 2010).

El grupo de W. Liu, 2006, demostró que FOXP3 interactúa con el promotor de CD127, y por su acción supresora hace que CD127 no se exprese o se exprese a la baja en las células Treg. Determinan por lo tanto que CD127 es un excelente marcador de Treg ya que se expresa a niveles muy bajos en la mayoría de de éstas células y es capaz de distinguir hasta un 10% de las células TCD4+ como células potenciales.

Además, reportan que puede utilizarse en ausencia de CD25, para separar un conjunto de células T supresoras y por ello, sería una herramienta útil para la selección y expansión de las células T para diagnóstico y aplicaciones terapéuticas.

A. L. Rodriguez-Perea y colaboradores, 2016, es otro grupo que utiliza la molécula CD127 en la caracterización de los Treg. Ellos además utilizan otros receptores para la caracterización de éstas células, tanto en humanos como en modelos murinos, los cuales son: CTLA-4, PD-1, OX40, GITR y CD103. Establecen que estos receptores pueden ser expresados por otras células, de manera que

hay que tener cuidado a la hora de seleccionar ésta combinación de marcadores, sobre todo en condiciones de inflamación. Además, la frecuencia y el fenotipo de los Treg pueden discrepar según el tejido y la especie.

3.4 Determinación de otras poblaciones linfocitarias

Para el análisis de las poblaciones de linfocitos T, B y NK se empleó el anticuerpo monoclonal BD Multitest™ 6-Color TBNK (Ref: 337166; BD Multitest™). Contiene CD45 marcado con PerCP-Cy™5.5, CD3 marcado con FITC, CD4 marcado con PE-Cy™7, CD8 marcado con APC-Cy™7, CD19 marcado con APC y CD16 y CD56 marcado con PE.

3.5 Determinación de otras poblaciones celulares

Por cada muestra de sangre periférica se realizó un hemograma en el que se determinó el recuento absoluto de leucocitos totales, neutrófilos, plaquetas, linfocitos totales y monocitos entre otros tipos celulares. Para su correspondiente análisis se utilizó el analizador hematológico XN-1000 Pure (Sysmex Europe GMBH).

3.6 Determinación de Antígenos de superficie (moduladores de la actividad de los linfocitos T CD4+ y CD8+)

Los linfocitos T activados fueron determinados como CD3+CD4+OX40+ y CD3+CD8+OX40+. Y los linfocitos T que expresaban el biomarcador inhibidor PD-1 se determinaron como CD3+CD4+PD-1+ y como CD3+CD8+PD-1+.

Los anticuerpos monoclonales utilizados para ello fueron: FITC Mouse Anti-Human OX40 (CD134)

(Catalog.nº 555837), PE Mouse Anti-Human CTLA-4 (CD152) (Catalog. Nº555853), PerCP-Cy 5.5 Mouse Anti-Human CD8 (Catalog nº565310), PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD4 (Catalog nº557852), APC Mouse Anti-Human PD-1 (CD279)(Catalog nº 558694), APC- H7 Mouse Anti-Human CD3 (Catalog nº 560176).

3.7 Otros reactivos

Otros reactivos empleados en el procesamiento de las muestras para su posterior análisis por citometría de flujo fueron:

- Sheath Fluid (Ref: 342003; BD FACSTM).
- Lysing Solution 10X Concentrate (Ref: 349202 ; BD FACSTM)

4. Análisis por citometría de flujo

Todas las muestras se analizaron por citometría de flujo . Fueron procesadas según protocolo de rutina empleado en el Laboratorio de Citometría de Flujo del Servicio de Bioquímica y Biología Molecular del Hospital Universitario Virgen Macarena. El procedimiento es el siguiente:

- Pipetear 50µL de muestra de sangre periférica en 3 tubos de ensayo diferentes, cada uno para una población celular diferente y posterior análisis citométrico (MDSCs, Treg , subpoblaciones celulares, OX40, PD-1 y CTLA-4).
- Añadir 5µL de los anticuerpos monoclonales correspondientes en cada tubo de ensayo, como se describe en la sección tercera de este capítulo.
- Agitar en vortex e incubar 15 minutos en oscuridad.
- Añadir en cada tubo de ensayo 2 ml de BD FACS™ Lysing Solution 10X Concentrate para lisar los eritrocitos.

- Agitar en vortex e incubar 3 minutos en oscuridad.
- Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm y desechar el sobrenadante.
- Lavar el pellet celular con 2 ml de BD FACS™ Sheath Fluid y agitar en vortex.
- Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm y desechar el sobrenadante.
- Añadir 0.5 ml de BD FACS™ Sheath Fluid y agitar en vortex.
- Adquirir 100.000 eventos en el citómetro de flujo.

5. Análisis de datos

5.1 Cálculo del tamaño muestral

Para la estimación del tamaño mínimo muestral y minimizar los errores aleatorios, nos basamos en la variable de MDSC. Hay estudios que ponen de manifiesto que los niveles de MDSC en población sana es de 0.82%. En pacientes con cáncer la cifra es más elevada, 3.55%. Con lo cual era esperable que en las pacientes participantes en nuestro estudio con cáncer de mama metastásico, las cifras de MDSC en basal fuesen más elevadas y si nuestra hipótesis se cumplía, a lo largo del tratamiento estos niveles debían ir bajando hasta niveles parecidos a los de la población sana. Usando estas cifras como estimación con una diferencia de medias de 2.73 y una desviación estándar total de 6.65, asumiendo un error α de 0.05 y un error β de 0.20, es decir una potencia del 80% y aplicando el test de dos colas, el número mínimo de participantes en este estudio era de 45 nuevos casos de cáncer de mama metastásico, representando una cifra razonable, según la experiencia clínica y el volumen de pacientes atendidas en la UGC de Oncología Clínica del HUVirgen Macarena (300-350 casos nuevos de cáncer de mama/ año).

El tamaño muestral de la población sana fue de 20 mujeres sin antecedentes oncológicos. No fue ampliado ya que no había diferencias importantes en sus niveles celulares, por lo que se consideró representativo de una población con las mismas características.

5.2 Análisis estadístico

Se elaboró una base de datos que contenía información clínico-patológica de las pacientes participantes, como tipo de tratamiento, respuesta al tratamiento, inmunofenotipo tumoral, localización de las metástasis, performance status y los resultados obtenidos por citometría de flujo.

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete de software SPSS 26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La distribución normal de las variables analizadas se verificó por histogramas, box plot, Q-Q plot y para el análisis de normalidad de valores se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov (muestras ≥ 50) y Shapiro-Wilk (muestras < 50). Debido a la ausencia de normalidad, las distribuciones de los linfocitos antes y después de las terapias sistémicas fueron comparadas usando el test no-paramétrico Wilcoxon para muestras relacionadas. Las concentraciones celulares en respuesta al tratamiento BC vs PE y las de la población de pacientes con CMA vs CS, se compararon usando el test no-paramétrico de U-Mann-Whitney, para muestras independientes. Se consideró $p \leq 0.05$ que indicaba diferencias estadísticamente significativas, con un intervalo de confianza del 95%.

6. Limitaciones del estudio

Por el diseño que hemos seguido en el estudio, a través de la base de datos que recoge tanto información clínica como todos los resultados obtenidos en el laboratorio, ha generado un gran volumen de datos. Entendemos que el pequeño tamaño muestral, 51 pacientes, puede ser un problema para obtener resultados estadísticamente significativos, para los cuales necesitaríamos un tamaño muestral mucho mayor.

Otra limitación de este estudio podría ser la heterogeneidad biológica del cáncer de mama y los diferentes tratamientos utilizados, que podría generar sesgos para la obtención de resultados estadísticamente significativos adicionales al pequeño tamaño muestral ya comentado.

7. Aspectos éticos

Antes de comenzar ningún procedimiento del estudio, tanto las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama avanzado y la población sana, sin diagnóstico oncológico, firmaron Consentimiento Informado (adjunto Anexo I) aprobado por el Comité de Ética (CE) de los H.U. Virgen Macarena y Virgen del Rocio (Anexo II).

El estudio se ha llevado a cabo siguiendo los principios de la Declaración de la Asociación Médica Mundial adoptada en la 18ª Asamblea de Helsinki-Finlandia, junio de 1964. Enmendada 29ª Asamblea Médica Mundial Tokio-Japón, octubre 1975. 35ª Asamblea Médica Mundial Venecia-Italia, octubre 1983. 41ª Asamblea Médica Mundial Hong-Kong, septiembre 1989. 48ª Asamblea General Somerset West-Sudáfrica, octubre 1996 y en octubre del 2000 en la 52ª Asamblea General de Edimburgo (Escocia).

Resultados

1. Características principales de las poblaciones de estudio

La población de pacientes estaba formada por 51 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama avanzado de debut o recaída, con una media de edad de 54 años, las cuales fueron tratadas con tratamiento sistémico de primera línea para enfermedad metastásica.

Para los estudios de casos-control, se reclutó un grupo de 20 mujeres sanas, sin diagnóstico de enfermedad oncológica, con una media de edad de 35 años.

Las principales características de las pacientes se muestran en la tabla 1.

Características	CMA (N=51) N (%)
Edad (años) Media <50 ≥50	54 (30-81) 18 (35.3) 33 (64.7)
ECOG- Performance Status 0 1 2	40 (78) 4 (8) 7 (14)
Inmunofenotipo Luminal A Luminal B Luminal B HER2+ TNBC	11 (21) 31 (61) 3 (6) 6 (12)
Número metástasis 1 2 ≥3	26 (51) 17 (33) 8 (16)
Metástasis a distancia Visceral Sí No	24 (47) 27 (53)
Metástasis Hepáticas Sí No	18 (35) 33 (65)
Metástasis pulmonares Sí No	9(18) 42 (82)

Metástasis óseas	
Si	39 (77)
No	12 (23)
Tratamiento 1ª línea mtx	
Hormonoterapia	8 (18)
Fulvestrant	6 (14)
Letrozol	2 (4)
iCDK 4/6 + HT	31 (61)
Ribociclib+letrozol	19 (37)
Palbociclib+Fulvestrant	1 (2)
Palbociclib+letrozol	6 (12)
Abemaciclib+letrozol	3 (6)
Abemaciclib+letrozol	2 (4)
Anti-HER2	3 (6)
Pertuzumab+Trastuzumab+Taxanos	2 (4)
Lapatinib+letrozol	1 (2)
Quimioterapia	8 (16)
Capecitabina	2 (4)
Paclitaxel+Bevacizumab	2 (4)
Paclitaxel+Carboplatino	1 (2)
Paclitaxel semanal	3 (6)
Inmunoterapia	1 (2)
Pembrolizumab+Gemcitabina+Carboplatino	1 (2)
Respuesta al tratamiento (RECISTv 1.1)	
Beneficio clínico (BC)	36 (70)
Respuesta Completa (RC)	3 (6)
Respuesta Parcial (RP)	13 (25)
Estabilidad Enfermedad (EE)	20 (39)
Progresión Enfermedad (PE)**	12 (23)

Tabla 1. Principales características de las pacientes. *CMA: Cáncer de mama avanzado. *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status escala de 0-5, 0 indica totalmente activo sin síntomas de la enfermedad y 5 muerte ; *CDKi 4/6, Inhibidores de las ciclinas 4/6; *RECIST v1.1: Criterio de evaluación de respuesta en tumores sólidos. **Dos pacientes fallecieron antes de la evaluación radiológica por progresión de la enfermedad.

2. Evaluación y comparativa de las diferentes poblaciones celulares

En cada apartado representaremos las diferentes poblaciones celulares que hemos estudiado y los diferentes análisis realizados, como el de casos-control y el de según respuesta a los diferentes tratamientos recibidos por las pacientes (Beneficio clínico vs Progresión de la enfermedad). En todos los casos se representa la mediana y el intervalo de confianza del 95%, aplicando los test estadísticos mencionados en el apartado 5.2 del capítulo de Materiales y Métodos.

En el estudio casos-control se han analizado las 51 pacientes, de las cuales tenemos todas las determinaciones basales y las 20 mujeres que componen la cohorte sana. Para el estudio de respuesta a los tratamientos, hemos comparado las pacientes que han obtenido beneficio clínico, que son aquellas con respuesta completa, respuesta parcial y estabilidad de la enfermedad con las que han progresado.

Para el estudio comparador de respuesta al tratamiento, se siguieron los criterios RECIST 1.1. Un total de 36 pacientes obtuvieron beneficio clínico. De estas, 3 tuvieron respuesta completa y se les realizaron todas las determinaciones (basal, ciclo 3 y ciclo 6). 13 pacientes llegaron a obtener respuesta parcial, de las cuales, a 11 se les realizaron todas las determinaciones sanguíneas y de 2 pacientes faltaría la última extracción (ciclo 6). En el caso de las que llegaron a obtener estabilización de la enfermedad, que fueron 20 pacientes, a 19 se les hizo todas las extracciones del estudio y a 1 de ellas no se le pudo realizar la extracción del ciclo 6, al haber sido reclutada en el último periodo del estudio y coincidir con la situación de pandemia mundial por COVID-19. En el transcurso del estudio, progresaron 10 pacientes, de 8 se obtuvieron todas las determinaciones y de 2 faltaría la correspondiente al ciclo 6, 1 de ellas falleció y la otra fue remitida a otro hospital a recibir nuevo tratamiento tras confirmarse la progresión de la enfermedad. Se evaluaron radiológicamente a 46 pacientes del total de 51, quedando pendientes de evaluar 5 pacientes, 2 fallecieron antes de poder ser evaluadas y 3 no han sido evaluadas aún, ya que han sido reclutadas en el último periodo de estudio.

2.1 Leucocitos totales

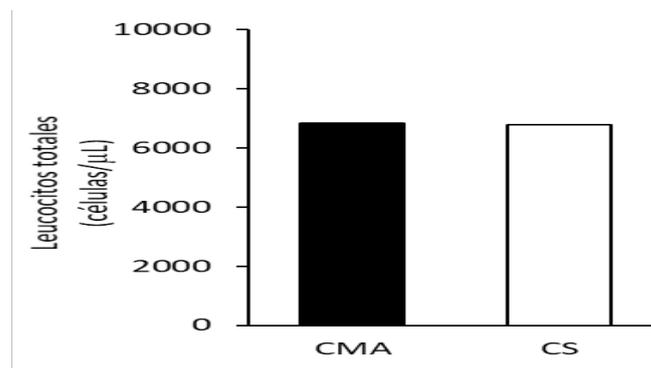


Figura 23. Análisis caso-control. Medianas de los niveles basales en sangre periférica de leucocitos totales en pacientes y cohorte sana.

En la figura 23, se puede observar la comparativa entre las medianas de los niveles basales de las pacientes, que son los obtenidos antes de comenzar el tratamiento y los de la población sana. Para las pacientes obtuvimos 6840 (RI=2655) leucocitos/ μL y para la población sana fueron 6780 (RI=1950) leucocitos/ μL . Con estos resultados no se vieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio.

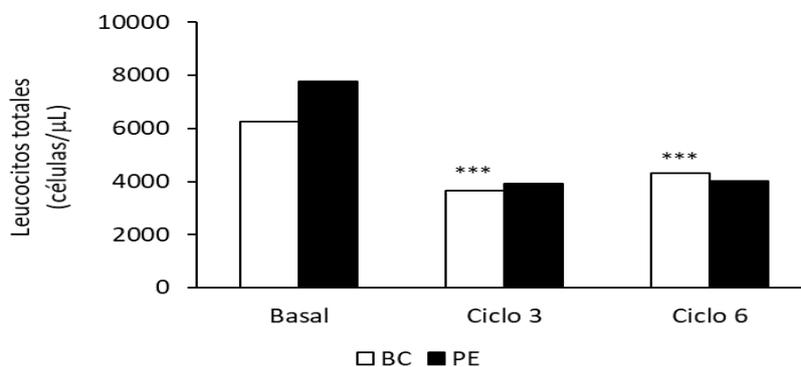


Figura 24. Mediana de los niveles de leucocitos totales en sangre periférica con respecto a la respuesta al tratamiento sistémico. *** diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) con respecto a la determinación basal.

En la figura 24, podemos ver como disminuyen los niveles de leucocitos en el contexto de beneficio clínico a lo largo del tratamiento y como aumentan levemente en el grupo que progresa. En las pacientes con beneficio clínico se obtuvieron los siguientes resultados: en la determinación basal 6245 (RI=2528), en el ciclo 3, 3670 (RI=2090) y en el ciclo 6, 4320 (RI=2206) leucocitos/ μl . Con estos resultados podemos observar que existen diferencias estadísticamente significativas en los ciclos 3 y ciclo 6 con respecto al basal ($p < 0.001$). Sin embargo, en la población que progresa los cambios en los niveles de estas células son más moderados, obteniéndose en el nivel basal 7770 (RI=2210), en el ciclo 3, 3930 (RI=1827.5) y en el ciclo 6, 4010 (RI=5465) leucocitos/ μl .

2.2 Neutrófilos

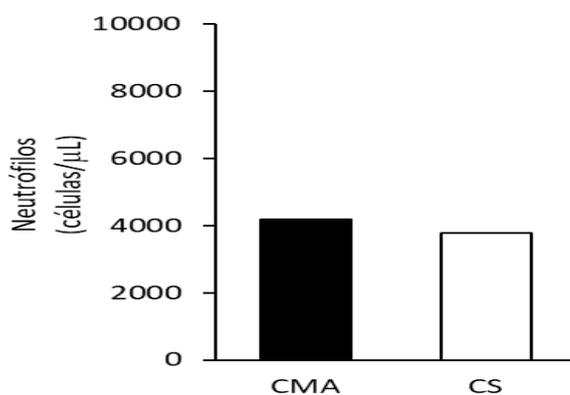


Figura 25. Análisis caso-control. Medianas de los niveles basales de neutrófilos en sangre periférica en pacientes y población sana.

La variación en los niveles sanguíneos basales de este tipo celular prácticamente no varían entre la población enferma y la sana, se puede ver un leve descenso en la población sana. Obteniéndose para las pacientes un resultado de 4190 (RI=2320) células/ μl y para la sana 3780 (RI=1370) células/ μl . No obteniéndose por tanto diferencias estadísticamente significativas (Figura 25).

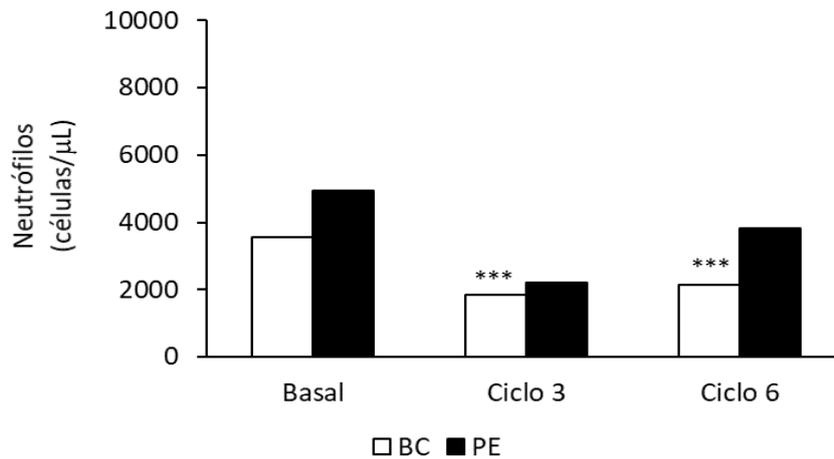


Figura 26. Medianas de los niveles de neutrófilos totales en sangre periférica con respecto a la respuesta al tratamiento. ***diferencias estadísticamente significativas con respecto a la determinación basal ($p < 0.001$)

Para las pacientes con respuesta al tratamiento (BC), los niveles celulares obtenidos fueron, para el basal 3570 (RI=2370), en el ciclo 3, 1830 (RI=1290) y en el ciclo 6, 2146.5 (RI=1780) neutrófilos/ μ l. Como podemos observar hay un descenso bastante importante con la respuesta al tratamiento, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 3 y en el ciclo 6 con respecto al basal ($p < 0.001$). En el grupo que progresa no se obtienen diferencias estadísticamente significativas, los resultados para la basal 4930 (RI=1650), ciclo 3, 2200 (RI=677.5) y ciclo 6, 3825 (RI=3427) neutrófilos/ μ l. (Figura 26)

2.3 Monocitos

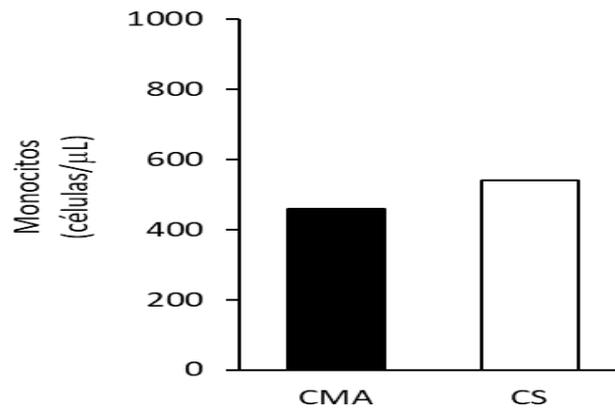


Figura 27. Análisis caso-control. Mediana de los niveles basales en sangre periférica de monocitos totales en pacientes y población sana.

En las pacientes se obtuvieron unos niveles de 460 (RI=250) y en la población sana 540 (RI=147.5) monocitos/μl. Con estos valores no se observaron por lo tanto diferencias estadísticamente significativas en ambas poblaciones. (Figura 27)

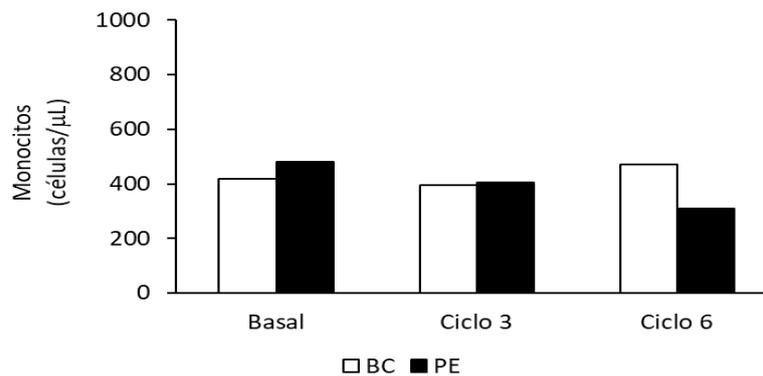


Figura 28. Mediana de los niveles totales de monocitos en sangre periférica con respecto a la respuesta al tratamiento sistémico.

Con respecto a los grupos de respuesta al tratamiento los valores obtenidos son muy similares tanto en el grupo de beneficio clínico como en el grupo que progresó. Los valores obtenidos para

las pacientes con BC en basal 420 (RI=210), ciclo 3 395 (RI=235) y ciclo 6 470 (RI=230) monocitos/ μ l. Y en el grupo con progresión fueron para basal 480 (RI=400), ciclo 3 405 (RI=377.5) y ciclo 6 310 (RI=230) monocitos/ μ l, sin alcanzarse diferencias estadísticamente significativas (Figura 28).

2.4 Linfocitos totales

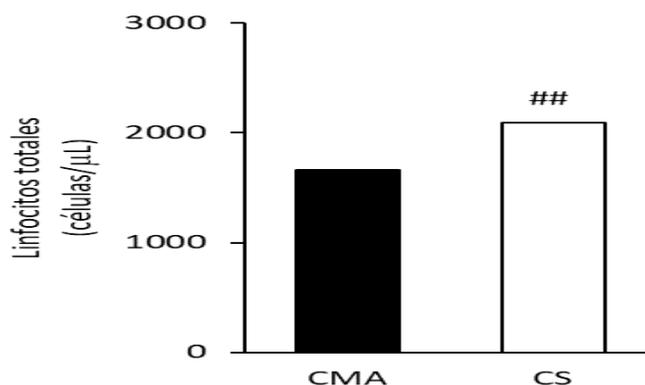


Figura 29. Análisis caso-control. Medianas de los niveles basales en sangre periférica de linfocitos totales en población enferma y sana. ## diferencias estadísticamente significativa ($p \leq 0.01$) con respecto a la población con CMA.

Los niveles de linfocitos totales en la población de pacientes es inferior, 1660 (RI=775) con respecto a la población sana 2090 (RI=900) linfocitos/ μ l, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la población enferma, $p=0.008$. (Figura 29)

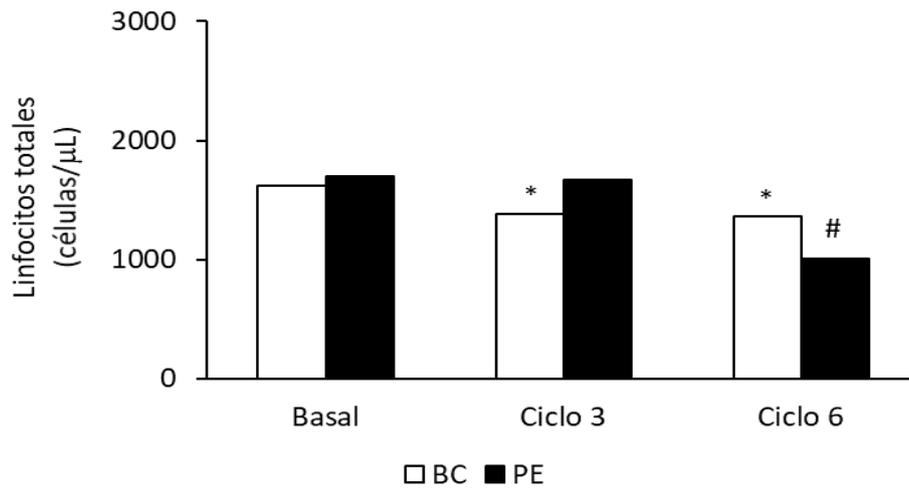


Figura 30. Medianas de los niveles de linfocitos totales en sangre periférica con respecto a la respuesta al tratamiento. * *diferencias estadísticamente significativas con respecto al basal ($p \leq 0.05$).* #*diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de BC en el ciclo 6 ($p \leq 0.05$).*

Cuando analizamos los niveles de esta población celular con respecto a la respuesta al tratamiento, obtuvimos los siguientes resultados en BC, basal 1625 (RI=730), ciclo 3 1380 (RI=520) y 1360 (RI=465) células/ μ l. En PE, basal 1700 (RI=795), ciclo 3 1670 (RI=1270) y ciclo 6 1010 (RI=557.5) células/ μ l. Se vieron diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 3 para la pacientes con BC con respecto al nivel basal ($p= 0.038$) y también en el ciclo 6 con respecto al basal, $p= 0.031$. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 6 en los grupos de respuesta al tratamiento ($p= 0.049$). (Figura 30)

2.5 Linfocitos T

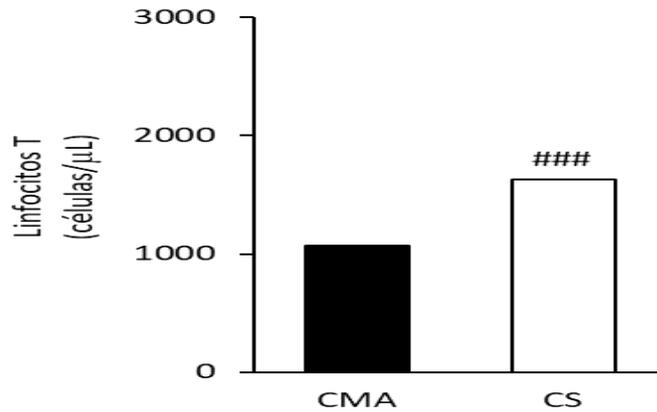


Figura 31. Análisis caso-control. Medianas de los niveles basales en sangre periférica de linfocitos T en las pacientes y en la cohorte sana. ### diferencias estadísticamente significativas con respecto a las pacientes ($p < 0.001$).

En la figura 31, podemos observar que existen diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones de estudio ($p < 0.001$). Para la población con CMA se obtuvieron 1071.3 (RI=526.2) y para la cohorte sana 1630.2 (RI=813.2) linfocitos T/ μ L.

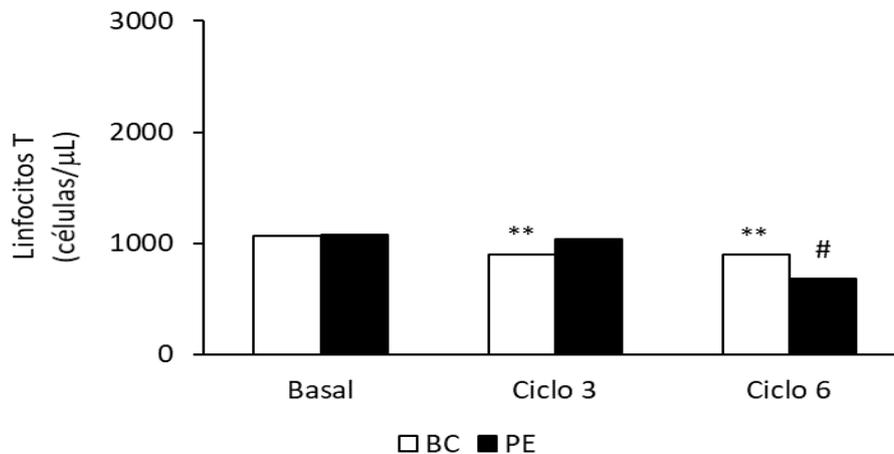


Figura 32. Medianas de los niveles de linfocitos T totales en sangre periférica con respecto a la respuesta al tratamiento sistémico. ** diferencias estadísticamente significativas con respecto al basal ($p \leq 0.01$). # diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 6 en los dos grupos de tratamiento ($p \leq 0.05$).

En la figura 32, observamos las diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 3, 900 (RI=353.3) células/ μ l de las pacientes que obtuvieron BC con respecto al nivel basal, 1065.4 (RI=533.1) células/ μ l, ($p= 0.004$). También se alcanzan diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 6 de las pacientes con BC, 900.7 (RI=424.1) células/ μ l con el nivel basal ($p=0.007$). En las pacientes que progresaron los resultados obtenidos fueron en estado basal 1077.3 (RI=831.15) células/ μ l, ciclo 3 1040.3 (RI=823.1) células/ μ l y ciclo 6 684.4 (RI=324.3) células/ μ l. Obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 6 para los dos grupos de respuesta al tratamiento (BC vs PE), $p=0.05$.

2.6 Linfocitos B

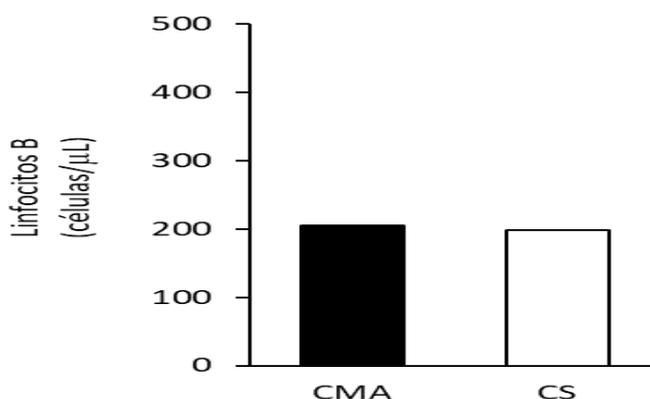


Figura 33. Análisis caso-control. Medianas de los niveles basales en sangre periférica de linfocitos B en pacientes de CMA y población sana.

Como podemos observar en el análisis caso-control (Figura 33), no hay prácticamente diferencias en los niveles de linfocitos B entre la población enferma 205.6 (RI=93.9) y la población sana 199 (RI=157) linfocitos B/ μ l.

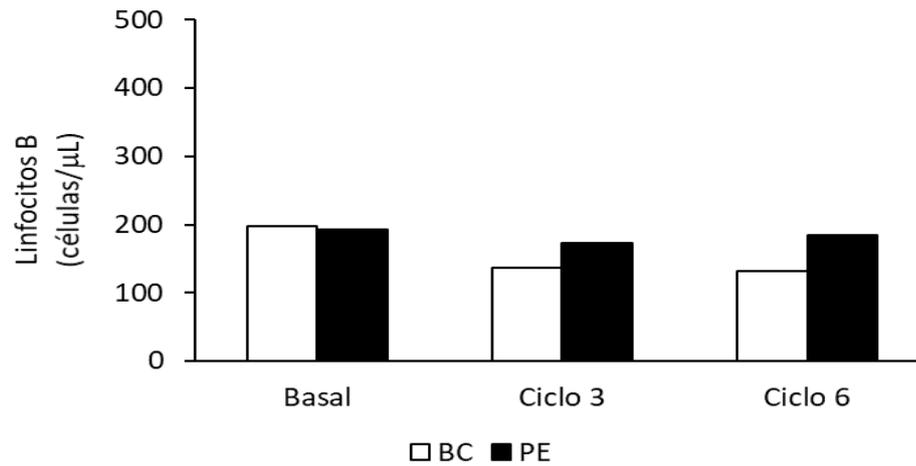


Figura 34. Medianas de los niveles de linfocitos B totales en sangre periférica según la respuesta al tratamiento sistémico.

En la figura 34, podemos observar para las pacientes que obtuvieron BC, que las medianas de los niveles para este subtipo celular disminuyen ligeramente con el tratamiento, los resultados obtenidos fueron, basal 198.4 (RI=81.1) células/μl, ciclo 3, 136.9 (RI=106.8) células/μl y en el ciclo 6 132.5 (RI=122.3) células/μl, respectivamente. En las pacientes que progresan practicamente no hay variación entre los niveles obtenidos en basal 193.5 (RI=175.7) células/μl, ciclo 3, 172.6 (RI=89.6) células/μl y ciclo 6, 184 (RI=117) células/μl. No se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en ningún escenario de los estudiados.

2.7 Linfocitos NK

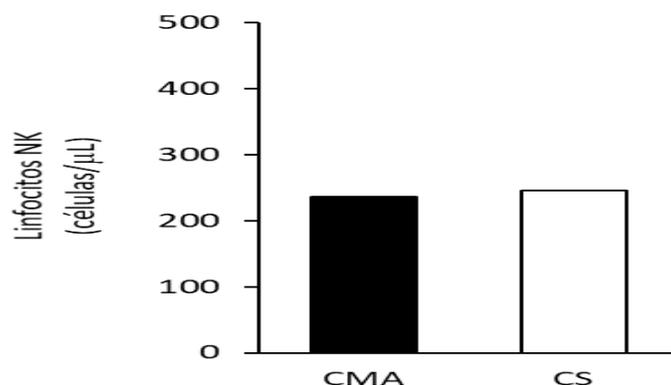


Figura 35. Análisis caso-control. Medianas de los niveles basales en sangre periférica de linfocitos NK en pacientes y cohorte sana.

Tanto las pacientes con un nivel basal de 236.4 (RI=221.5) linfocitos NK/μl como las mujeres sanas con un resultado de 245.3 (RI=151.9) linfocitos NK/μl, no se obtuvieron diferencias entre ambos rgrupos. (Figura 35).

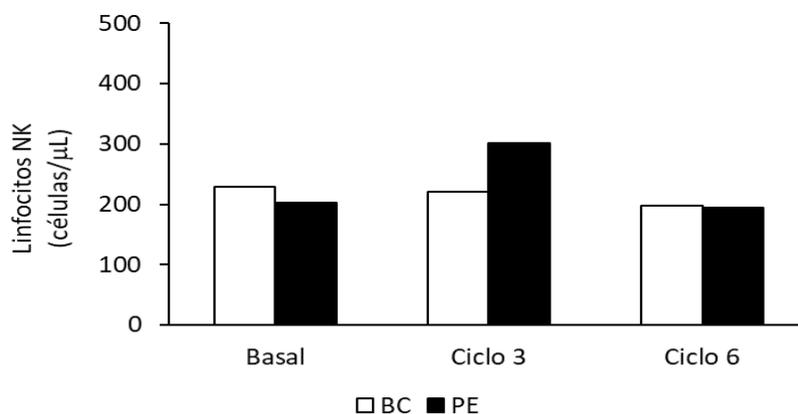


Figura 36. Niveles de linfocitos NK totales en sangre periférica con respecto a la respuesta al tratamiento sistémico. ## diferencias estadísticamente significativa con respecto a BC ($p \leq 0.01$)

En el análisis BC vs PE que muestra la figura 36, en el grupo que obtuvo BC se vio que los niveles de las células NK, practicamente no cambiaron con el tratamiento. En basal 229.6 (RI=186.6)

células/ μ l, ciclo 3, 220.8 (RI=151.8) células/ μ l y en el ciclo 6, 197.8 (RI=115.5) células/ μ l. En el grupo que progresó hubo una disminución leve en los niveles celulares a lo largo del tratamiento, obteniéndose en basal 203.2 (RI=106.4) células/ μ l, ciclo 3, 300.6 (RI=175.6) células/ μ l y en el ciclo 6, 193.8 (RI=136.8) células/ μ l. En este escenario, no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas.

2.8 Linfocitos T CD4

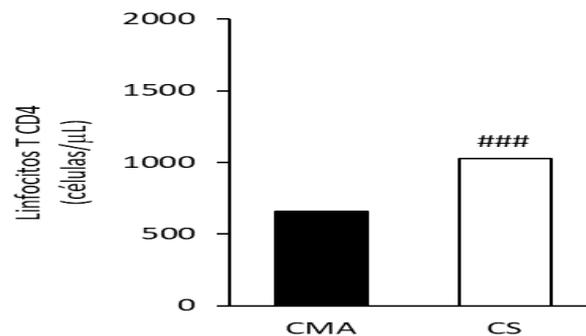


Figura 37. Análisis caso-control. Medianas de los niveles basales de linfocitos T CD4 en la población enferma y sana.### diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de CMA ($p < 0.001$).

Se puede observar en la figura 37 que existen diferencias evidentes entre los niveles basales de linfocitos T CD4 entre la población con CMA, 660.7 (RI=414.4) y la población sana 1024.1 (RI=423.5) linfocitos T CD4/ μ l. Obteniéndose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio ($p < 0.001$).

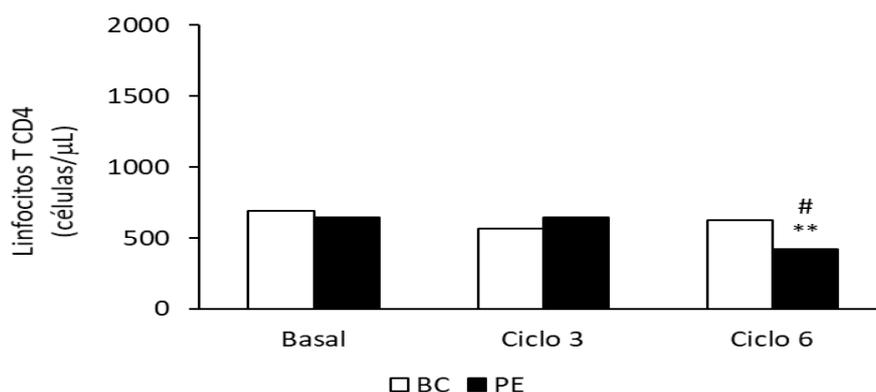


Figura 38. Mediana de los niveles de linfocitos T CD4 totales en sangre periférica con respecto a la respuesta al tratamiento sistémico. ****diferencias estadísticamente significativas con respecto al basal ($p \leq 0.01$).** **# diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de BC en el mismo ciclo ($p \leq 0.05$).**

En el estudio comparativo entre los grupos según respuesta al tratamiento se observa que en BC los niveles obtenidos en basal 688.8 (RI=439.2) y a lo largo del tratamiento, ciclo 3, 566 (RI=322.2) y ciclo 6, 623.6 (RI=301.4) linfocitos T CD4/μL. En las pacientes que progresaron los datos obtenidos fueron en basal 647 (RI=622.5), ciclo 3 646.6 (RI=969.6) y en ciclo 6 419.4 (RI=333.42) linfocitos T CD4/μL. Alcanzándose diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 6 con respecto al basal, $p=0.008$. Y también se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de BC vs PE para el mismo ciclo de tratamiento, ciclo 6, $p=0.043$.(Figura 38)

2.9 Linfocitos T CD8

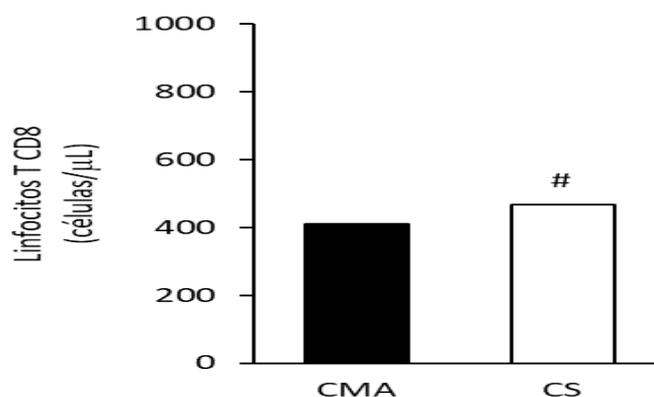


Figura 39. Análisis caso-control. Medianas de los niveles basales de linfocitos T CD8 en sangre periférica en población enferma y sana. **# diferencias estadísticamente significativas respecto a la población con CMA ($p \leq 0.05$).**

Como se puede apreciar en la figura 39, en la población sana los niveles de esta población celular son algo más altos en la población sana 467.1 (RI=90.6) linfocitos TCD8/ μ l que en la enferma donde se registra un valor de 410.3 (RI=258.8) linfocitos TCD8/ μ l, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.041$).

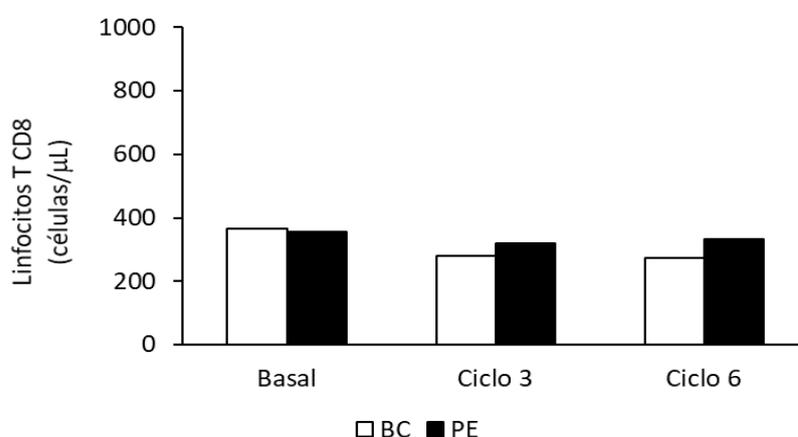


Figura 40. Medianas de los niveles de linfocitos TCD8 totales en sangre periférica según la respuesta al tratamiento sistémico.

En cuanto al grupo de pacientes que tienen BC, podemos observar que hubo un descenso con respecto a la respuesta al tratamiento tanto en el ciclo 3 como en el 6. Obtuvimos en el nivel basal 365.2 (RI=288.1), en el ciclo 3, 279.3 (RI=161.4) y en el 6, 272.4 (RI=161.2) linfocitos TCD8/ μ l. En el grupo de progresión los valores obtenidos se mantienen prácticamente constantes siendo el basal 355.2 (RI=256.9), ciclo 3, 319.5 (RI=284.3) y en el 6, 333.4 (RI=197,2) linfocitos TCD8/ μ l. Sin obtener diferencias estadísticamente significativas. (Figura 40)

2.10 Linfocitos T reguladores

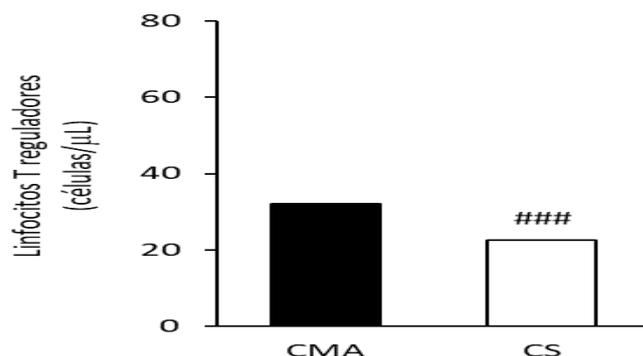


Figura 41. Análisis caso-control. Mediana de los niveles basales en sangre periférica de linfocitos T reguladores en pacientes y cohorte sana. #### diferencias estadísticamente significativas ($p=0.001$) con respecto a las pacientes.

En el análisis de caso-control observamos en la población sana la mediana de los niveles basales de linfocitos T reguladores, es 22.61 (RI=13.57) células/μL, es menor que en la población enferma donde se obtuvo un valor más elevado de 32.05 (RI=29.84) células/μL, alcanzándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.001$). (Figura 41)

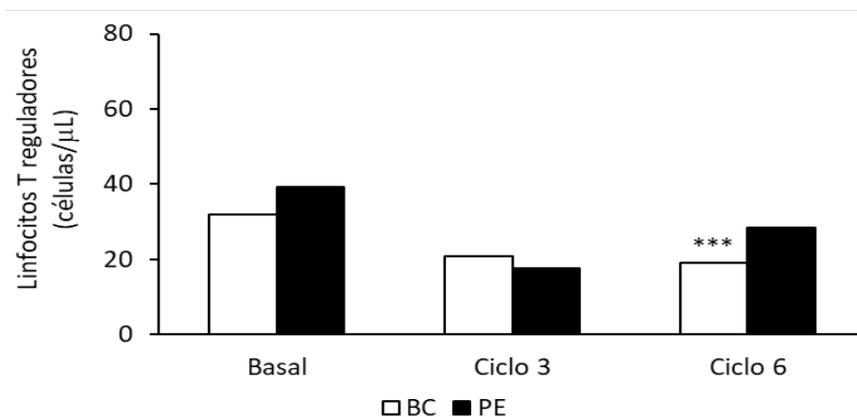


Figura 42. Medianas de los niveles de linfocitos T reguladores en sangre periférica con respecto a la respuesta al tratamiento sistémico. ***diferencias estadísticamente significativas con respecto al basal ($p\leq 0.001$).

En la figura 42, se puede objetivar que en la población con CMA que alcanzó BC, las medianas de

los niveles de Treg fueron bajando a lo largo del tratamiento sistémico, obteniéndose en basal 31.87 (RI=27.87), ciclo 3, 20.79 (RI=15.01) y ciclo 6, 19.01 (RI=16.64) células/ μ l. Con estos resultados se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 6 con respecto al basal ($p \leq 0.001$).

Para las pacientes que progresaron, los valores obtenidos para las medianas de los niveles celulares, fueron para el basal 39.30 (RI=52.24), ciclo 3, 17.63 (RI=38.37) y en ciclo 6, 28.36 (RI=32.03) células/ μ l, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre el ciclo 6 y el nivel basal, ($p=0.866$). Tampoco se alcanzaron diferencias entre los dos grupos de pacientes estudiados, aunque en el ciclo 6 podemos ver que en el grupo de BC el nivel de estas células fue 19.01 células/ μ l y en el grupo que progresó se alcanzó un nivel mucho mayor de 28.36 células/ μ l, aún así no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.680$).

2.11 Células supresoras de origen mieloide

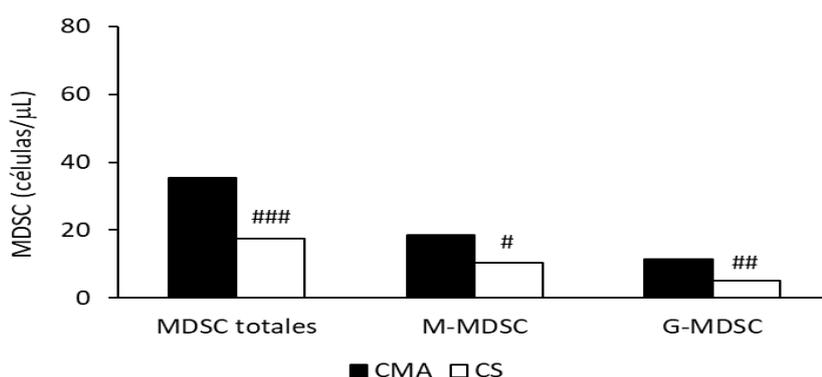


Figura 43. Análisis Caso-control. Medianas de niveles basales de MDSC totales, M-MDSC y G-MDSC en población con CMA y población sana. #, ## y ### diferencias estadísticamente significativas entre las determinaciones basales de las pacientes y la población sana ($p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ y $p \leq 0.001$ respectivamente).

En la figura 43, observamos diferencias bastante llamativas en los resultados obtenidos para las medianas de los niveles de células supresoras mieloides entre enfermas y mujeres sanas. La mediana de los niveles de MDSC totales antes del tratamiento en las pacientes son bastantes más

altos que en la población sana, alcanzando una mediana de 35.43 (RI=180,73) células/ μ l para las pacientes y 17.53 (RI=16.96) células/ μ l para las mujeres sanas, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0.001$).

Lo mismo ocurre para los dos subgrupos de mieloides, M-MDSC y G-MDSC. Para las M-MDSC en el caso de las pacientes se obtuvieron valores de las medianas de 18.46 (RI=30.67) células/ μ l y para la población sana 10.28 (RI=17.48) células/ μ l, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0.035$). Y en el caso de las G-MDSC, en las pacientes se alcanzaron unos valores para la mediana de 11.38 (RI=57.60) células/ μ l y para la cohorte sana fue de 4.99 (RI=16.96) células/ μ l, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0.004$).

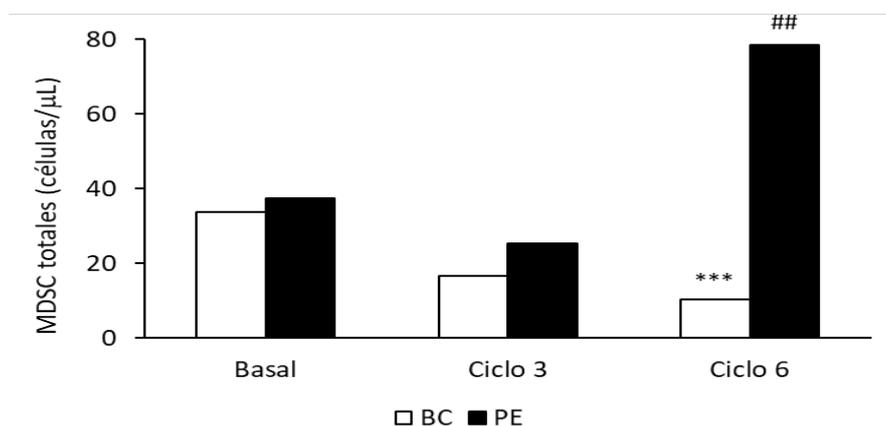


Figura 44. Medianas de los niveles de MDSC totales en sangre periférica con respecto a la respuesta al tratamiento. ***diferencias estadísticamente significativas en comparación con la determinación basal ($p\leq 0.001$). ##diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de respuesta en el mismo grupo de tratamiento ($p\leq 0.001$).

Podemos ver en la figura 44, que las medianas de los niveles de MDSC totales en sangre periférica en las pacientes que alcanzaron BC disminuyen a lo largo del tratamiento, basal 33.63 (RI=39.64), ciclo 3, 16.54 (RI=12.88) y ciclo 6, 10.36 (RI=15.84) células/ μ l, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 6 con respecto a la determinación basal ($p\leq 0.001$). Sin

embargo, observamos un aumento significativo en los resultados de los niveles de MDSC totales en el grupo que progresó obteniéndose en basal 37.48 (RI=20.63), en el ciclo 3, 25.32 (RI=31.26) y en el ciclo 6, 78.54 (RI=128.63) células/ μ l, no llegándose a alcanzar diferencias estadísticamente significativas ($p=0.176$). Sí se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($p=0.003$) para ambos grupos de tratamiento (BC vs PE) en el ciclo 6.

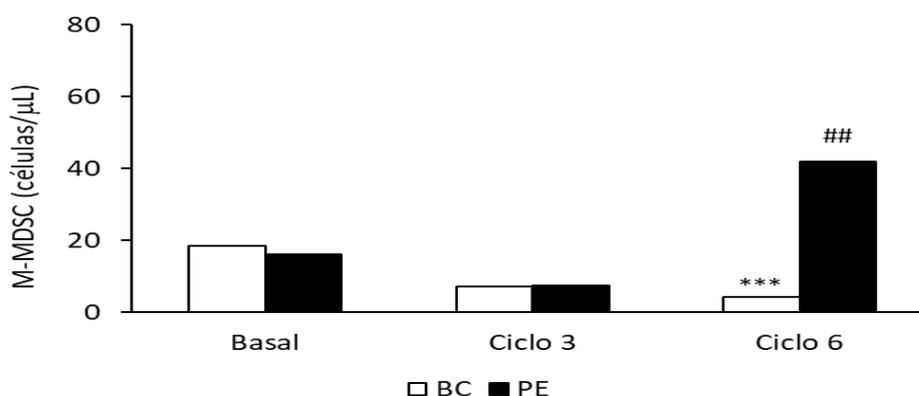


Figura 45. Medianas de los niveles de M-MDSC totales en sangre periférica con respecto a la respuesta al tratamiento. ***diferencias estadísticamente significativas con respecto a la determinación basal ($p\leq 0.001$). ##diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupo de respuesta en el mismo ciclo de tratamiento ($p\leq 0.001$)

En las pacientes con BC hubo una disminución estadísticamente significativa de M-MDSC, en el ciclo 6 ($p\leq 0.001$) de tratamiento, con respecto al nivel basal. Los resultados obtenidos fueron: basal 18.46 (RI=33.49), ciclo 3, 7.09 (RI=12.90) y en ciclo 6, 4.15 (RI=6.48) células/ μ l, respectivamente. Para el grupo de PE se obtuvo un aumento de la mediana de los niveles totales de M-MDSC, basal 16.20 (RI=33.49), ciclo 3, 7.50 (RI=12.24) y ciclo 6, 42.04 (RI=86.99) células/ μ l. Cuando comparamos los grupos de respuesta al tratamiento también se obtienen diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 6 ($p=0.004$). (Figura 45).

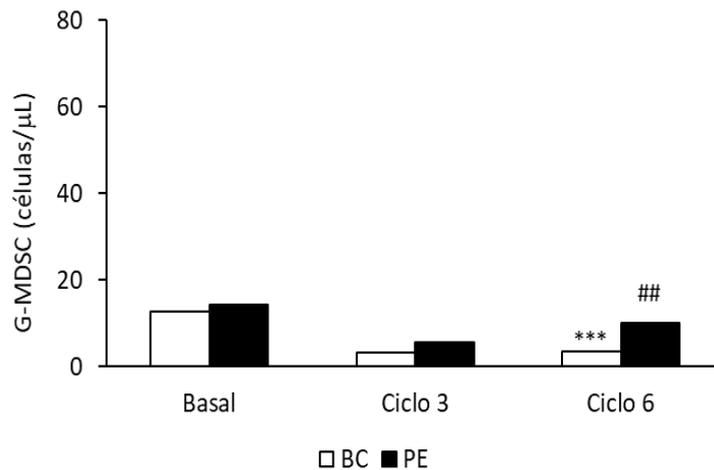


Figura 46. Medianas de los niveles de G-MDSC totales en sangre periférica con respecto a la respuesta al tratamiento. ***diferencias estadísticamente significativas con respecto a la determinación basal ($p \leq 0.001$). ##diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupo de respuesta en el mismo ciclo de tratamiento ($p \leq 0.001$)

En el caso de la determinación de los niveles de G-MDSC, en la figura 46, podemos observar que en las pacientes con BC los niveles de estas células fueron disminuyendo progresivamente a lo largo del tratamiento, obteniéndose unos valores de 12.74 (RI=18.14) para la determinación basal, 3.23 (RI=6.70) en el ciclo 3 y 3.36 (RI=7.03) células/μl en el ciclo 6. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 6 ($p \leq 0.001$) con respecto a la determinación basal. En las pacientes que progresaron estos niveles celulares fueron para la determinación basal 14.20 (RI=28.56), en el ciclo 3, 5.63 (RI=20.09) y en el ciclo 6, 10.00 (RI=24.23) células/μl, respectivamente. También vimos diferencias entre ambos grupos de respuesta que fueron significativas en el ciclo 6 ($p = 0.002$).

3. Estudio de las ratios celulares.

3.1 Ratio CD4/CD8

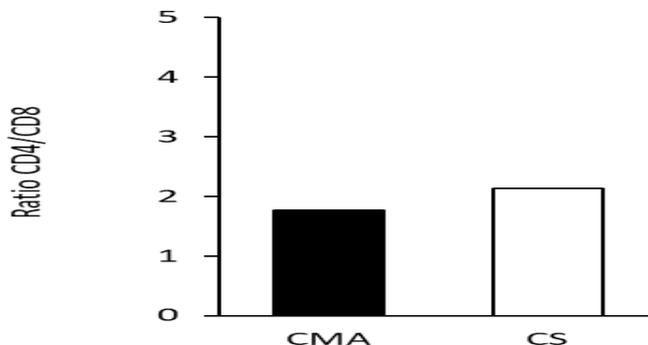


Figura 47. Ratio CD4/CD8 basal y comparación con la cohorte sana.

En la figura 47, podemos ver que la ratio CD4/CD8 es algo menor para las pacientes que para la población sana. Los valores obtenidos fueron para las pacientes 1.77 (RI= 1.06) y para la cohorte sana 2.14 (RI= 0.91). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

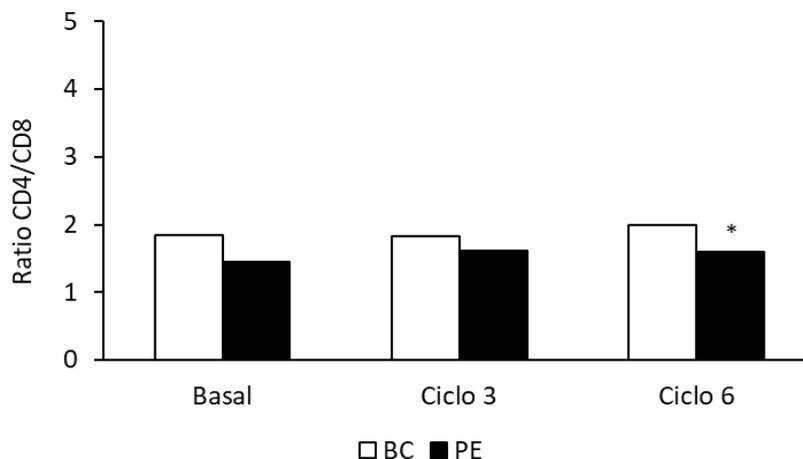


Figura 48. Ratio CD4/CD8 según respuesta al tratamiento BC vs PE. * diferencias estadísticamente significativas con respecto a los niveles basales ($p \leq 0.05$).

Según la figura 48, los resultados obtenidos para la ratio CD4/CD8 en los dos grupos de respuesta

al tratamiento se mantuvo con pocas variaciones dentro del mismo grupo. Siendo los valores obtenidos para las pacientes con BC, basal 1.84 (RI= 1.13), ciclo 3 1.83 (RI= 1.31) y ciclo 6 2 (RI= 0.81). En el grupo con progresión de la enfermedad los valores fueron, basal 1.45 (RI= 1.01), ciclo 3 1.62 (RI= 1.5) y ciclo 6 1.6 (RI= 2.26). Se obtuvo un $p = 0.028$ entre el ciclo 6 y la determinación basal, en las pacientes que progresaron.

3.2 Ratio CD8/Treg

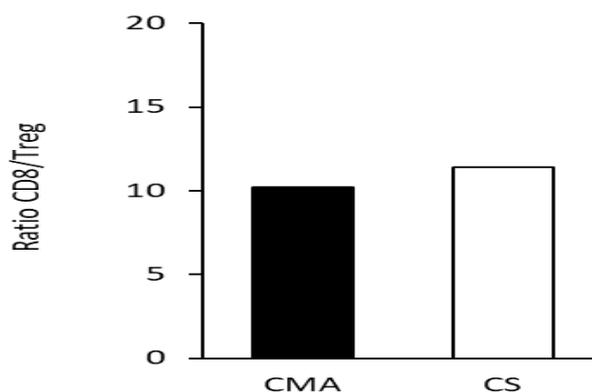


Figura 49. Ratio CD8/Treg basal y comparativa con cohorte sana.

En la figura 49, se puede observar una leve disminución de la ratio en las pacientes con respecto a las mujeres sanas. El valor de la ratio obtenido para las pacientes fue 10.22 (RI= 9.72) y para la cohorte sana 11.4 (RI= 10.7). No obteniéndose diferencias estadísticamente significativas.

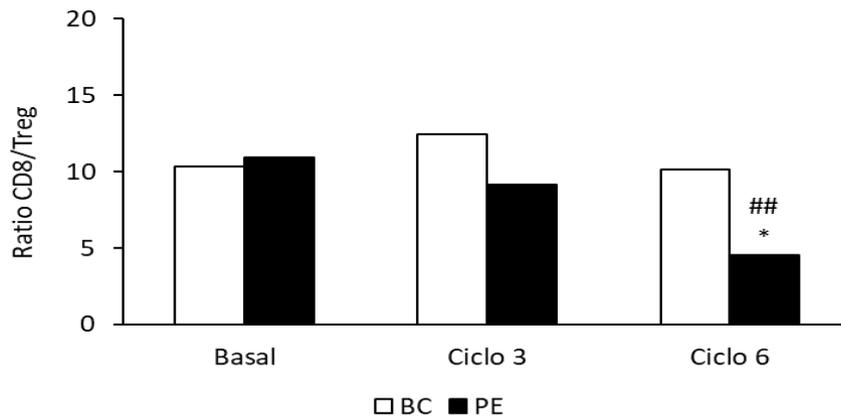


Figura 50. Ratio CD8/Treg en respuesta al tratamiento. *diferencias estadísticamente significativa con respecto al nivel basal ($p \leq 0.05$). ## diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de respuesta en el mismo ciclo de tratamiento ($p \leq 0.01$).

Cuando se analizó la ratio CD8/Treg con respecto a la respuesta al tratamiento, observamos que en las pacientes con BC, esta ratio aumentó con la administración de los diferentes tratamientos con respecto al valor basal. Los valores obtenidos en estas pacientes fueron para el basal 10.37 (RI= 9.02), ciclo 3 12.46 (RI= 9.95) y ciclo 6 10.17 (RI= 7.07). En el caso de las pacientes que progresaron los valores alcanzados fueron, para el basal 10.96 (RI= 8.42), ciclo 3 9.16 (RI= 5.31) y ciclo 6 4.53 (RI= 2.74). Con estos valores se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 6 con respecto al basal en el grupo que progresó, $p = 0.018$. Y también hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de respuesta (BC vs PE) en el ciclo 6, $p = 0.002$. (Figura 50).

3.3 Ratio linfocitos/monocitos

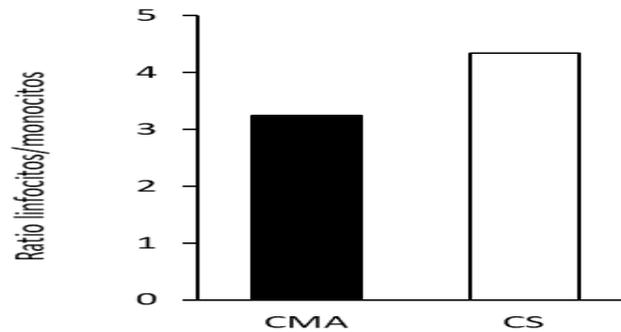


Figura 51. Ratio linfocitos/monocitos basal en pacientes con CMA comparado con la cohorte sana.

Cuando comparamos los valores obtenidos para la ratio linfocitos/monocitos en ambas poblaciones estudiadas, observamos que la población diagnosticada de CMA tenía valores más bajos 3.25 (RI= 2) que la población sana 4.34 (RI= 1.53), con un p value= 0.06. (Figura 51)

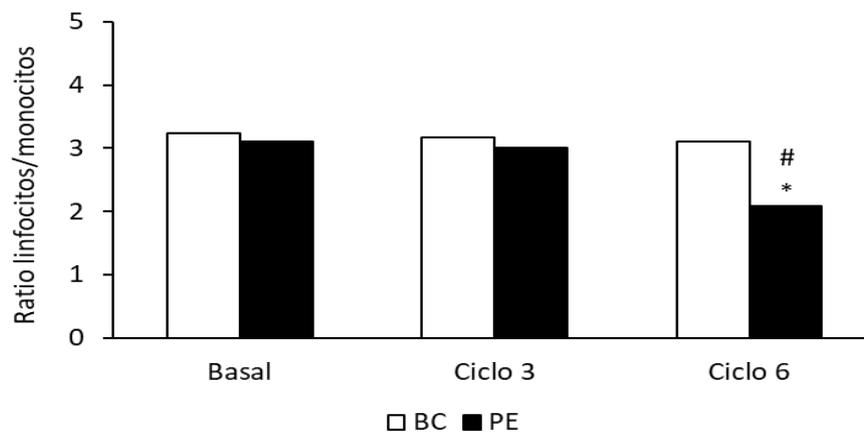


Figura 52. Ratio linfocitos/monocitos según respuesta al tratamiento. *diferencias estadísticamente significativas con respecto al basal ($p \leq 0.05$). # diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de BC ($p \leq 0.05$).

Según la figura 52, en el grupo con BC, los valores para la ratio linfocitos/monocitos fueron en basal 3.23 (RI= 2.15), ciclo 3 3.17 (RI= 2.17) y ciclo 6 3.11 (RI= 1.4), respectivamente. Y para las pacientes que progresaron en el basal 3.11 (RI= 1.86), ciclo 3 3 (RI= 1.1) y ciclo 6 2.08 (RI= 1.46). Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el grupo que progresó en el ciclo 6 con respecto al basal, $p= 0.043$ y también en el ciclo 6 en los dos grupos de respuesta (BC vs PE), $p=0.038$.

3.4 Ratio neutrófilos/linfocitos

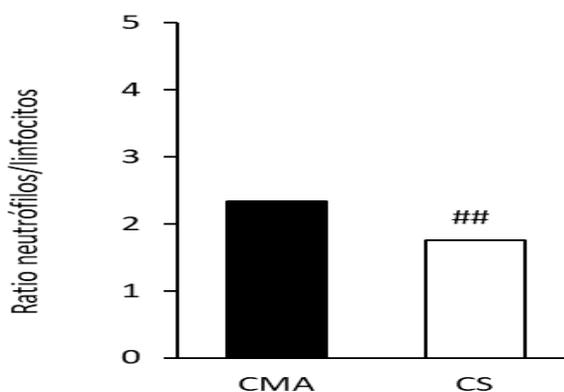


Figura 53. Ratio neutrófilos/linfocitos basal y comparativa con cohorte sana. ##diferencias estadísticamente significativas con respecto a las pacientes ($p\leq 0.01$).

La figura 53, muestra que la ratio neutrófilos/linfocitos en las pacientes diagnosticadas de CMA es mayor, obteniéndose un valor de 2.34 (RI= 1.19), que en la cohorte sana 1.76 (RI=0.93), alcanzándose diferencias estadísticamente significativas con respecto a las pacientes $p=0.003$.

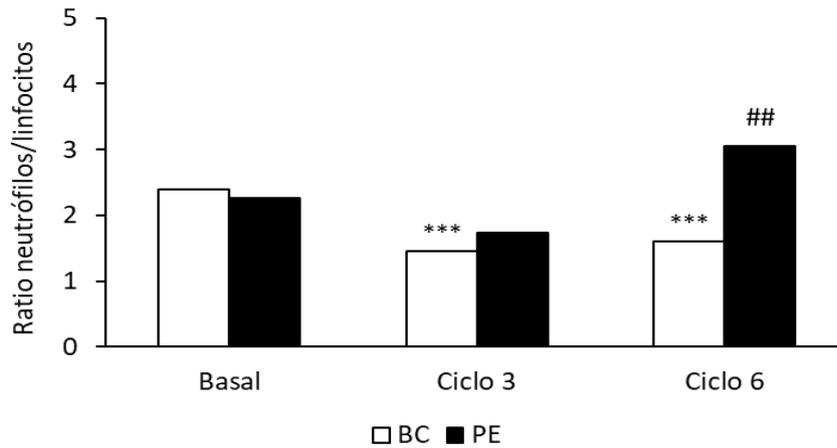


Figura 54. Ratio neutrófilos/linfocitos según respuesta al tratamiento. ***diferencias estadísticamente significativas en comparación con el basal ($p \leq 0.001$). ##diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de respuesta (BC vs PE), en el mismo ciclo de tratamiento ($p \leq 0.01$).

La ratio neutrófilos/linfocitos en el grupo de BC disminuye a lo largo del tratamiento. Los valores obtenidos para este grupo de respuesta fueron en basal 2.41 (2.20-2.81), en ciclo 3, 1.39 (1.13-1.63) y en ciclo 6, 1.64 (1.36-2.03), respectivamente. Con estos valores obtuvimos diferencias estadísticamente significativas tanto en el ciclo 3 como en el ciclo 6 con respecto al basal ($p < 0.001$). Para el grupo de PE los valores que se obtuvieron fueron en basal 2.26 (1.43-3.62), en el ciclo 3, 1.39 (0.84-2.30) y en el ciclo 6, 3.55 (2.06-6.24), con diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 6 con respecto a BC ($p = 0.016$). (Figura 54).

4. Expresión del biomarcador co-estimulador OX40 (CD134). Modulador positivo de la actividad de linfocitos T CD4+ y CD8+:

4.1 Expresión de OX40+ en linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con CMA en comparación con la cohorte sana.

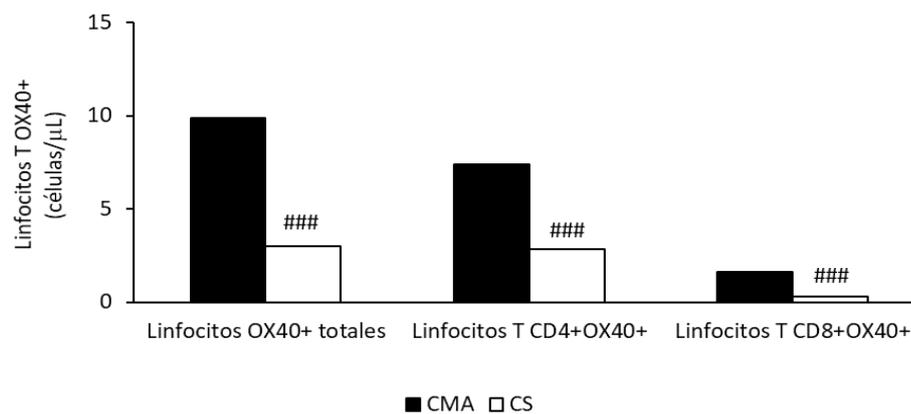


Figura 55. Análisis caso-control: Mediana de los niveles basales en sangre periférica de linfocitos T totales OX40+, LTCD4+ OX40+ y LTCD8+ OX40+, en pacientes de CMA y población sana. ### diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.001$)

En la figura 55, podemos observar que tanto los resultados obtenidos para las medianas de los niveles basales de linfocitos totales, como para los subtipos de linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresan el marcador co-estimulador OX40, antes de la administración del tratamiento, son más altos en las pacientes que en la población sana. El valor para los linfocitos T totales OX40+ en las pacientes fue 9.89 (RI=28.71) células/μl y en la población sana 3.01 (RI=3.01) células/μl. Para los linfocitos TCD4+OX40+, el resultado en las pacientes fue de 7.36 (RI=26.33) células/μl y en la cohorte sana de 2.81 (RI= 2.83) células/μl y en el caso de los linfocitos T CD8+OX40+, para las pacientes 1.64 (RI= 2.14) células/μl y en las mujeres sanas 0.28 (RI= 0.26) células/μl, siendo la diferencia estadísticamente significativa de $p \leq 0.001$, en los tres conjuntos de linfocitos T.

4.2 Correlación de la respuesta al tratamiento con la expresión de OX40+ en linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con CMA.

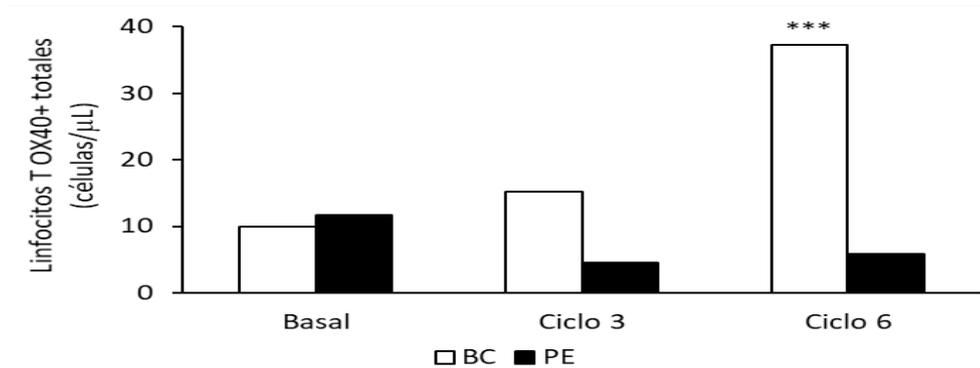


Figura 56. Medianas de los niveles a lo largo del tratamiento, en sangre periférica de linfocitos T totales OX40+ en pacientes con BC vs PE. ***diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0.001$.

En la figura 56, se observa como las medianas de los niveles de linfocitos T totales que expresan OX40+, aumentan a lo largo del tratamiento en pacientes que han obtenido BC, siendo el resultado basal de 9.89 (RI= 28.64) células/μl, en el ciclo 3 de 15.23 (RI= 26.78) células/μl y en el ciclo 6 de 37.28 (RI= 43.54) células/μl, alcanzándose diferencias estadísticamente significativas entre el nivel basal y el ciclo 6, $p \leq 0.001$. Y para las pacientes que progresaron los resultados obtenidos fueron: basal 11.71 (RI= 36.9) células/μl, ciclo 3 4.57 (RI= 12.9) células/μl y ciclo 6 5.91 (RI= 57.62) células/μl, donde no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas.

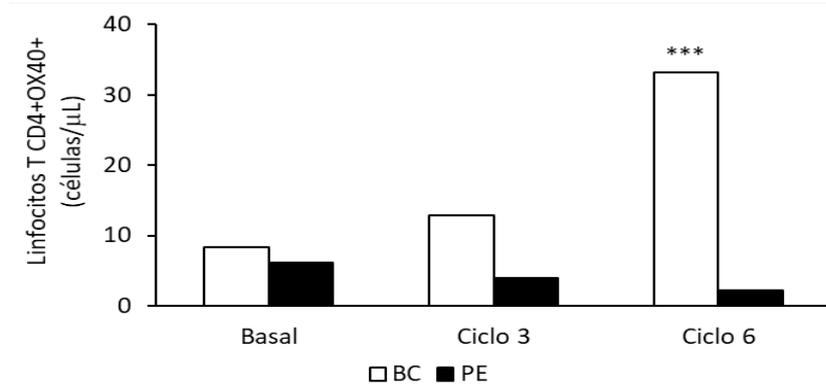


Figura 57. Medianas de los niveles a lo largo del tratamiento, en sangre periférica de linfocitos T CD4+ OX40+ en pacientes con BC vs PE. ***diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0.001$.

En el caso de los linfocitos TCD4+ que expresan OX40+, observamos en la figura 57, que las medianas de los niveles sanguíneos de estas células a lo largo del tratamiento aumentan en el grupo de pacientes con BC y disminuye en las pacientes que progresan. Siendo los resultados obtenidos en el grupo de pacientes con BC los siguientes: basal 8.32 (RI= 25.46) células/ μ l, ciclo 3 12.93 (RI= 25.02) y ciclo 6 33.22 (RI= 40.49), con estos resultados se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores alcanzados en estado basal y los obtenidos en el ciclo 6 $p \leq 0.001$. Y los resultados para el grupo que progresó fueron: basal 6.14 (RI= 35.77) células/ μ l, ciclo 3 4.00 (RI= 10.97) células/ μ l y ciclo 6 2.22 (RI= 45.44) células/ μ l, donde no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

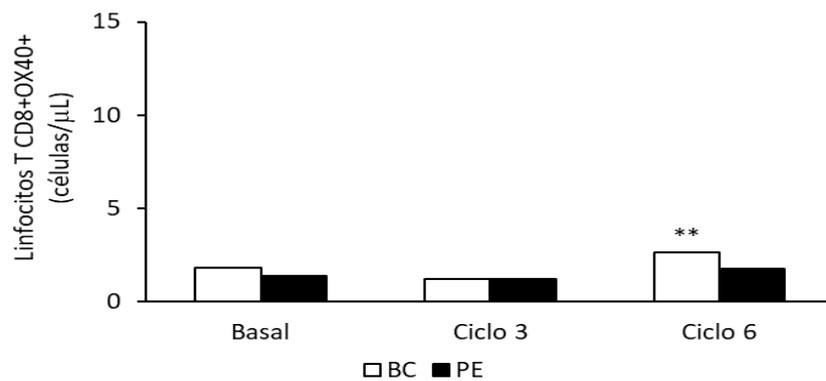


Figura 58. Medianas de los niveles a lo largo del tratamiento, en sangre periférica, de linfocitos T CD8+OX40+ en pacientes con BC vs PE. **diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0.01$.

En cuanto a los linfocitos TCD8+OX40+, observamos la misma tendencia que en los dos casos anteriores. Según muestra la figura x31, las medianas de los niveles de linfocitos TCD8+OX40+ a lo largo del tratamiento aumentan, aunque no de forma tan llamativa como en el caso de los linfocitos T totales y de los linfocitos TCD4+. Los valores obtenidos para el grupo de pacientes con BC fueron: basal 1.85 (RI= 2.37) células/ μ l, ciclo 3 1.24 (RI= 2.29) células/ μ l y ciclo 6 2.63 (RI= 5.72), encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el nivel basal y el ciclo 6 $p \leq 0.01$. En el grupo que progresó los valores que obtuvimos fueron: basal 1.40 (RI= 1.75) células/ μ l, ciclo 3 1.20 (RI= 1.29) células/ μ l y ciclo 6 1.75 (RI= 3.33) células/ μ l, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas. (Figura 58).

Podemos concluir con estos resultados, que los niveles de los linfocitos T totales OX40+, linfocitos TCD4+OX40+ y linfocitos TCD8+OX40+, aumentan a lo largo del tratamiento en las pacientes que alcanzaron BC mientras que disminuyeron en las que progresaron. Además, obtuvimos diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales y los alcanzados en el ciclo 6 , $p \leq 0.009$, en las pacientes con BC, pero no en las pacientes con PE.

5. Expresión del biomarcador co-inhibidor PD-1. Modulador negativo de la actividad de los linfocitos T CD4+ y CD8+.

5.1 Expresión de PD-1 en linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con CMA en comparación con la cohorte sana.

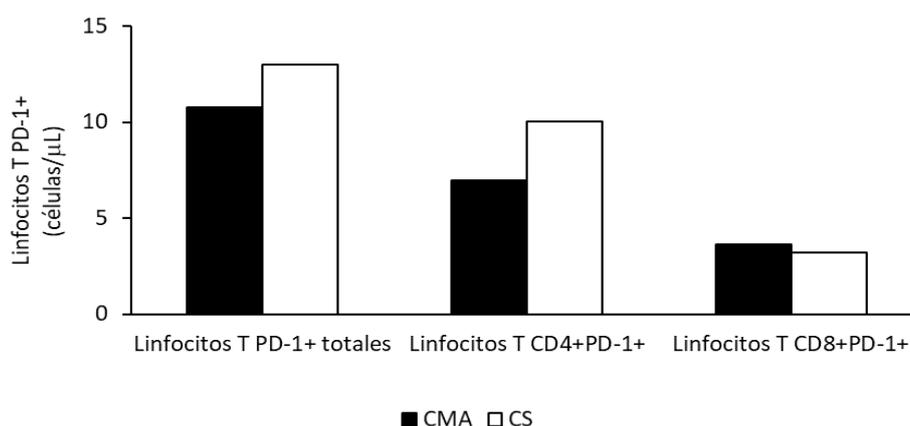


Figura 59. Análisis caso-control: Mediana de los niveles basales en sangre periférica de linfocitos T totales PD-1+, LTCD4+ PD-1+ y LTCD8+ PD-1+, en pacientes de CMA y población sana.

En la figura 59, se observa que los niveles basales de linfocitos T totales PD-1+, CD4+PD-1+ y CD8+PD-1+, en pacientes con CMA son ligeramente más bajos antes de comenzar el tratamiento, en comparación con la población sana. Los resultados obtenidos para la población de linfocitos T totales PD-1+ en la población con CMA fueron 10.77 (RI= 8.55) células/μl y para la cohorte sana 13.00 (RI= 6.19) células/μl. En el caso de los linfocitos TCD4+PD-1+, para las pacientes se obtuvo un valor de 6.95 (RI= 5.14) y en las mujeres sanas de 10.04 (RI= 5.27) células/μl y por último para los linfocitos TCD8+PD-1+, en las pacientes se obtuvo el valor de 3.63 (RI= 2.57) y para las mujeres sanas, 3.18 (RI= 2.47) células/μl. Con estos datos no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas.

5.2 Correlación entre la respuesta al tratamiento y la expresión de PD-1+ en linfocitos T CD4+ y CD8+, en pacientes con CMA.

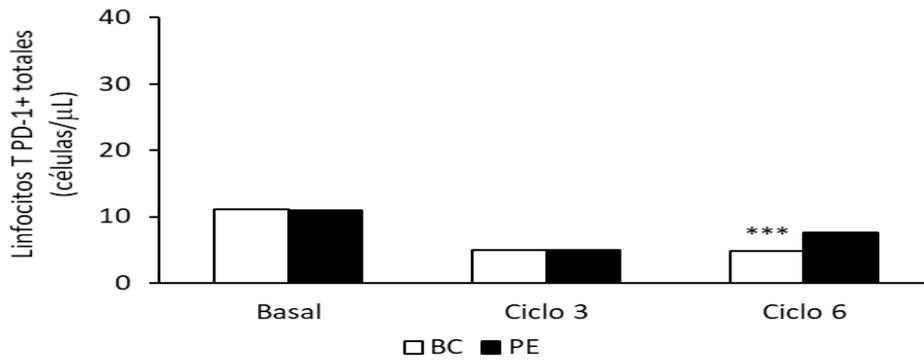


Figura 60. Medianas de los niveles a lo largo del tratamiento, en sangre periférica de linfocitos T totales PD-1+ en pacientes con BC vs PE. ***diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0.001$.

La figura 60, refleja la disminución de los niveles de linfocitos T totales PD-1+ a lo largo del tratamiento en pacientes que alcanzaron BC, siendo los resultados: basal 11.16 (RI= 8.99) células/μl, ciclo 3 5.02 (RI= 3.99) células/μl y ciclo 6 4.82 (RI= 3.74) células/μl, alcanzándose diferencias estadísticamente significativas en el ciclo 6 con respecto al basal, $p \leq 0.001$. Para las pacientes que progresaron se obtuvieron los siguientes: basal 11.03 (RI= 11.18), ciclo 3 4.96 (RI= 14.81) y ciclo 6 7.64 (RI= 4.55) células/μl.

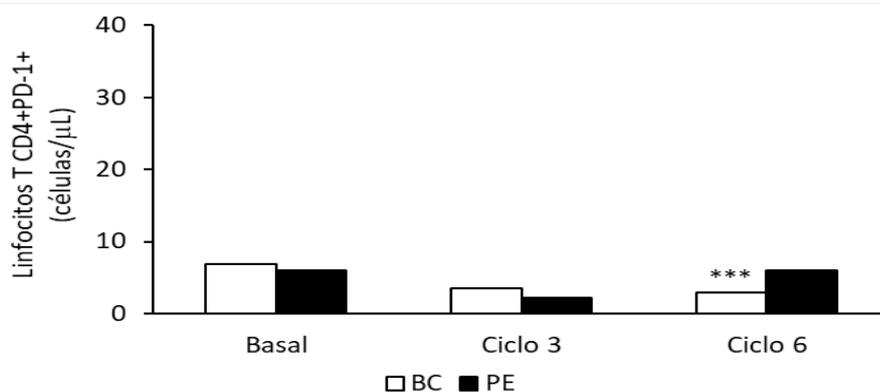


Figura 61. Medianas de los niveles, a lo largo del tratamiento, en sangre periférica de linfocitos T CD4+ PD-1+ en pacientes con BC vs PE. ***diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0.001$.

Podemos objetivar en la figura 61, que en las pacientes que alcanzaron BC durante el tratamiento de primera línea, los niveles de linfocitos TCD4+PD-1+ disminuyeron de manera importante, siendo los valores para el basal 6.95 (RI= 5.08) células/ μ L, ciclo 3 3.51 (RI= 3.28) células/ μ L y ciclo 6 2.93 (RI= 2.93) células/ μ L, alcanzándose diferencias estadísticamente significativas, $p \leq 0.001$. Para las pacientes que progresaron los datos obtenidos fueron para basal 5.95 (RI=8.58) células/ μ L, en ciclo 3 2.16 (RI= 8.11) células/ μ L y en ciclo 6 5.98 (RI= 4.86) células/ μ L, sin obtenerse diferencias estadísticamente significativas.

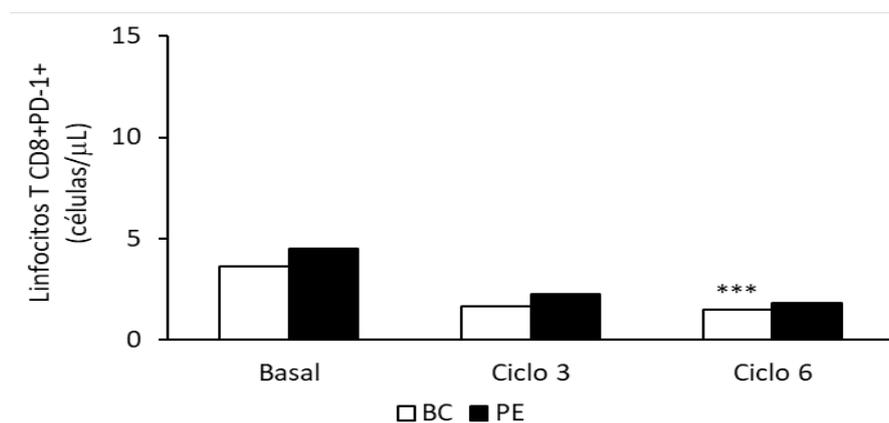


Figura 62. Medianas de los niveles, a lo largo del tratamiento, en sangre periférica de linfocitos T CD8+ PD-1+ en pacientes con BC vs PE. ***diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0.001$.

Como podemos ver en la figura 62, la tendencia es la misma que en los dos casos anteriores, disminución de los niveles celulares en sangre periférica para esta subpoblación de linfocitos T, para las pacientes que consiguieron BC con el tratamiento. Los valores obtenidos fueron en basal 3.62 (RI= 2.45) células/ μ L, ciclo 3 1.63 (RI= 1.62) células/ μ L y ciclo 6 1.51 (RI= 1.05) células/ μ L, con diferencias estadísticamente significativa, $p \leq 0.001$. Para las pacientes en progresión los valores fueron, en basal 4.51 (RI= 4.34) células/ μ L, ciclo 3 2.24 (RI= 6.66) células/ μ L y ciclo 6 1.80 (RI= 3.72) células/ μ L, sin alcanzarse diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Gracias a la investigación llevada a cabo en cáncer de mama, hoy día tenemos datos consolidados y concluyentes que demuestran, que la composición inmune de dichos tumores juega un papel muy importante tanto en el inicio como en el desarrollo de metástasis a distancia y además parece observarse que en cáncer de mama invasivo, un mayor recuento de células inmunes, predice el pronóstico y la respuesta a la quimioterapia.

Las nuevas investigaciones en este campo, se están centrando en el estudio de las células inmunitarias específicas que forman parte tanto de la respuesta inmune innata como de la respuesta adaptativa en cáncer de mama y su papel no sólo en cómo intervienen en el desarrollo de la progresión de la enfermedad, si no también cómo actúan en el estado pre-invasivo y la transición a lesiones malignas (Hellen Tower et al.,2019).

Es bien sabido, que los tumores tienen la capacidad de ejercer señales inmunosupresoras que les sirven para evadirse de la vigilancia inmune y con ello promover la inflamación para impulsar la progresión tumoral. Esto da lugar a lo que conocemos como “Hipótesis de Inmunoedición del cáncer”. De hecho se ha establecido la inmunoedición como un hallmark en cáncer de mama.

Con todo esto, podemos decir que el “hablar” de microambiente inmunológico en cáncer de mama está cada vez más establecido. Han sido descritos varios grupos de células inmunes que componen este microambiente inmunológico en cáncer de mama. Los **TILs**, se ha observado que están mayoritariamente elevados en el tumor primario en cáncer de mama invasivo en comparación con las metástasis. Éstos TILs se componen de linfocitos T, en particular de linfocitos TCD8+ citotóxicos (CTL), de ahí que este subtipo de linfocito T se haya convertido en un marcador pronóstico inmune en pacientes con cáncer de mama, sobre todo en los subtipos TNBC y HER2 positivo (S.E. Stanton et al.,2016), ya que llevan a cabo una respuesta inmune adaptativa a los neoantígenos de la superficie de las células tumorales que se correlaciona a su vez con una mayor supervivencia (De la Cruz-Merino et al.,2017). Los CTL tienen la capacidad de diferenciarse a las llamadas células T de memoria residente en tejido (TRM). Éstas células expresan altos niveles de moléculas de puntos de control inmunológico que eliminan al tumor y que participan en la vigilancia inmune en cáncer de mama. Ha sido demostrado que las células TRM son mejores como

marcador pronóstico que los linfocitos T CD8+ sólo y se asocia a una mayor supervivencia en las pacientes diagnosticadas de TNBC.

Los **Tregs**, son linfocitos TCD4+ FoxP3+, con características inmunosupresoras con lo cual contribuyen a una respuesta inmunitaria pro-tumoral ayudando al escape inmunológico, por lo que su presencia augura un mal pronóstico de la enfermedad, además permiten la progresión tumoral por inhibición de la respuesta inmune de tipo Th1 antitumoral.

Las **MDSCs**, representan una población heterogénea de células inmaduras de estipe mieloide, de las cuales se distinguen dos tipos principales según su función y morfología: las G-MDSC, son de naturaleza granulocítica y las M-MDSC que son de naturaleza monocítica. Se ha establecido la relación entre niveles elevados de MDSCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y el pronóstico de la enfermedad, ya que se asocia con estadíos avanzados, mayor carga tumoral y menor SLP y SG, así como una menor respuesta a los tratamientos de quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y otras terapias dirigidas.

Los **Macrófagos**, están presentes a lo largo del sistema ductal de la mama, por lo tanto antes del desarrollo tumoral. De manera que son las primeras células inmunes que atacan a las células tumorales al comienzo del crecimiento hiperplásico o neoplásico. La infiltración tumoral por TAMs, se acompaña de un peor pronóstico. En cáncer de mama invasivo hay una alta expresión de HIF2 α por parte de los TAMs, esto junto a la expresión de HIF1 α por parte de las células tumorales da lugar a la activación de VEGF y con ello al desarrollo de la angiogénesis. En CDI se ha encontrado que la densidad de microvasos y la expresión de VEGF están significativamente correlacionados con la densidad de TAMs en dicho tipo tumoral. Las citocinas del microambiente tumoral provocan cambios en los macrófagos, como la IL-10 y el TGF β , favorecen la polarización al subtipo M2. En muestras de pacientes con cáncer de mama donde en el estroma abundan los M2, está relacionado con mal pronóstico tanto en tumores con expresión de ER+ como sin expresión del mismo, ER- (Damya Laoui et al., 2011).

La supervivencia y la maduración de las **DC** disminuyen en tumores de mama invasivos aunque se

observa mayor infiltración de células DC de tipo plasmocitoides (pDC), lo que indica que estas pDC participan en la progresión del cáncer de mama.

Las **NK**, participan tanto en la respuesta innata como en la adaptativa. Tienen función antitumoral mediante la producción de citocinas por lo que reclutan e inducen la proliferación de otras células inmunes. También pueden matar a las células tumorales sin sensibilización previa, por lo que desempeñan un papel importante en la inmunovigilancia del cáncer. En pacientes con cáncer de mama, una disminución de las NK se correlaciona con progresión e invasividad tumoral.

Tantos los **linfocitos B**, como las firmas de expresión de genes que codifican para las inmunoglobulinas en CDI, se han asociado a un pronóstico favorable, en estudios retrospectivos. Esto le confiere un papel antitumoral a éstas células y a las inmunoglobulinas. Sin embargo, hay otros estudios que reportan todo lo contrario, lo asocian a mal pronóstico en cáncer de mama, esto parece ser debido a que las células tumorales de la mama pueden inducir un fenotipo regulador en los linfocitos B, favoreciendo la producción de TGF β que favorece la conversión de los linfocitos CD4+ a Tregs.

Hay que mencionar otro componente importante del microambiente tumoral en cáncer de mama, los **fibroblastos**, no son células inmunes propiamente dichas, se encuentran formando parte del microambiente estromal y producen proteínas de la matriz extracelular, particularmente colágeno. Responden a la señalización de las citocinas en el microambiente estromal lo que favorece su cooperación con las células inmunes que componen dicho microambiente. Pueden controlar la polaridad de las células epiteliales, su proliferación y su potencial tumorigénico. Los CAFs dan lugar a mayor crecimiento tumoral en comparación con los fibroblastos normales, ya que contribuyen a la supervivencia y progresión de las células cancerosas al secretar altos niveles de proteínas de la ECM, promueven la inflamación crónica y favorecen la EMT de las células cancerígenas. Promueven la tumorigénesis por la producción de citocinas proinflamatorias IL-1, IL-8, IL-10, TNF α , CCL2, CXCL12 e INF β , la angiogénesis y la inhibición de los CTLs.

Los perfiles de expresión génica son muy diferentes entre los CAFs y los fibroblastos que conforman el tejido mamario sano. Además se ha demostrado, que los perfiles de expresión

génica entre pacientes de cáncer de mama, con buenos vs malos resultados en cuanto a la recurrencia y a la supervivencia libre de progresión, también son diferentes. En el grupo donde se obtuvieron mejores resultados, el microambiente estromal expresaba moduladores involucrados en la respuesta inmune de tipo Th1, como la expresión de complejos del receptor T (CD8a, CD247, CD3D), MHC clase I y actividad granzima A/B. El estroma de mal pronóstico se caracterizó por niveles elevados de hipoxia, promoción de la angiogénesis y disminución de quimiocinas que estimulan la migración de las NK y la supervivencia de los linfocitos T (R.McCuaig et al.,2017).

En resumen, en el tumor mamario, el microambiente tumoral está compuesto por linfocitos TCD4+, linfocitos TCD8+ CTL, NK, macrófagos M1 y DC, todas ellas protegen contra el crecimiento tumoral, mientras que los linfocitos Tregs, Th2, macrófagos M2 y MDSC, estimulan el crecimiento del tumor. Todas éstas características le aportan al tumor mamario un carácter inmunogénico y las células inmunes que forman el microambiente tumoral permiten información pronóstica de la enfermedad. Disponemos de ensayos clínicos con vacunas que aportan seguridad en la inmunoterapia contra el cáncer de mama. Existen también terapias para modular a los Treg, MDSC y a las vías de control inmunitario (CTLA-4 y PD-1). Las terapias combinadas parecen ser las más esperanzadoras en el tratamiento con inmunoterapia del cáncer de mama (L. Emens, 2012).

1. Perfil de Respuesta Inmune en sangre periférica inducido por tratamiento sistémico de primera línea.

1.1 Células mieloides supresoras (MDSCs)

En los últimos años se han desarrollado multitud de estudios, que han reportado la relación de las MDSC con el cáncer de mama. Las células cancerígenas reclutan elementos como las MDSC, los Tregs y los macrófagos tipo 2, lo que da lugar a la formación de un microambiente protumorigénico que desregula la respuesta inmune antitumoral. Desde un punto de vista clínico, los niveles de MDSC circulantes en sangre periférica se correlacionan con el estadio tumoral y la carga de enfermedad metastásica de las pacientes (Dawei Shou et al.,2017).

Las células tumorales de mama favorecen el reclutamiento de las MDSCs desde la médula ósea al sitio del tumor. Esto lo pueden hacer por varias vías, una de ellas es por acción de las citocinas y quimiocinas secretadas por las células tumorales. Las citocinas en cáncer de mama relacionadas con la diferenciación de las MDSCs son G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-6, MIF, IL-1 β y TGF β 1. En el modelo 4T1 Balb/c, parece ser que la IL-1 β puede tener un doble papel sobre la migración de las MDSCs, dependiendo de su concentración en el microambiente tumoral. Puede aumentar el reclutamiento de las MDSCs a una concentración adecuada, sin embargo, cuando está a una concentración demasiado baja o demasiado alta, reduce el reclutamiento de las MDSCs.

En cuanto a las quimiocinas que participan en el reclutamiento de las MDSCs incluyen CXCL5, CCL1, CCL2 (MCP-1) y CCL5. En el modelo murino 4T1 Balb/c, se observó que CXCL5 interactúa con CXCR2 y que tiene un papel fundamental en el reclutamiento de MDSCs. Además. CCL5 junto con GM-CSF y G-CSF, afectan a la expansión de las MDSCs. CCL1 y CCL2, también promueven la acumulación de MDSCs y el reclutamiento de éstas.

En cáncer de mama, la producción de MDSCs además de estar modulada por citocinas y quimiocinas, parece estar condicionada por otras vías. Un estudio realizado por el equipo de investigación de Tanaka T. y colegas, (2015), que utilizaron la línea celular de cáncer de mama 4T1 de ratón Balb/c, puso de manifiesto que la ERO-1 α en cáncer de mama, estimula la transcripción

de G-CSF y CXCL1/2 de sus formas inmaduras a sus formas post-transcripcionales maduras. Otro estudio reveló que el factor de transcripción KLF4, podría inducir la producción de GM-CSF a través de CXCL5. Esto contribuiría al mantenimiento de las MDSCs en cáncer de mama. (Y. Fu et.al.,2013)

Hay otros factores que están implicados en el reclutamiento de las MDSCs, como es el estrés psicológico de las pacientes con esta enfermedad. En un estudio llevado a cabo por Mundy-Bosse y colaboradores, se midió el estrés de las pacientes basándose en la Escala Likert de 5 eventos potencialmente estresantes (muerte de un familiar o amigo, dificultad económica, divorcio, conflictos familiares, robos y accidentes).

Este estudio reveló que un alto nivel de estrés se asociaba a un aumento de los niveles de MDSCs. El mecanismo de este efecto probablemente implique a las hormonas del estrés en la modulación de las funciones y la expansión de las MDSCs.

En las metástasis de cáncer de mama, pulmón, hígado y cerebro, principalmente, el reclutamiento de las MDSCs se debe a la expresión de S100A8 (una de las subunidades del heterodímero Calprotectina, formada por S100A8 y S100A9), por parte de las células de estos órganos. En un trabajo realizado por el equipo de investigación de C.N. Vrakas y colaboradores (2014), se utilizó el modelo murino 4T1, que representa un modelo de cáncer de mama en estadio IV. Centrándose en los principales sitios de metástasis (pulmón, hígado y cerebro), encontraron que había una alta expresión de S100A8 en estos nichos metastásicos y las células CD11+ exhibían características inmunosupresoras y además expresaban el receptor RAGE para S100A8. Todos estos datos ponen de manifiesto que S100A8 contribuye a la creación de un nicho metastásico mediante el reclutamiento de MDSCs. En relación a esto, también hay que destacar los trabajos de otros investigadores como Mckierman et al., (2011), que analizaron la expresión del gen S100 en muestras de pacientes con cáncer de mama y encontraron que los tumores de alto grado también tenían una alta expresión de S100A8/A9. Arai et al., (2008), examinaron 101 muestras de carcinoma ductal invasivo y encontraron relación entre la sobreexpresión de S100A8/A9, la sobreexpresión del HER2, metástasis ganglionar y el estadio tumoral. Luego, en pacientes con cáncer de mama, S100A8/A9, podría considerarse como biomarcador de mal pronóstico.

Otro lugar preferido por las células tumorales para metastatizar es el hueso. Zhuang y colaboradores, observaron que las MDSCs podían diferenciarse a osteoclastos y contribuir a la destrucción ósea en el caso de los mielomas. El equipo de Sawant, encontró que un alto número de MDSCs en cáncer de mama podrían impulsar la metástasis ósea durante la progresión tumoral en modelos animales. Ellos vieron que, durante la colonización ósea por las células tumorales mamarias, se llevaba a cabo un proceso de activación de los osteoclastos y osteólisis. Además, si aislaban MDSCs de un ambiente óseo con metástasis óseas, éstas se diferenciaban a osteoclastos maduros y funcionales, mientras ocurría lo contrario cuando se aislaban de un ambiente sin la formación de estas metástasis. Como consecuencia de estos efectos sobre el hueso, las MDSC podrían constituir un objetivo terapéutico para el tratamiento de las metástasis óseas.

Por lo tanto, después de lo expuesto anteriormente, en referencia a las funciones inmunosupresoras de las MDSCs y su implicación en la formación de metástasis, en nuestro trabajo, con los resultados obtenidos, corroboramos su posible participación en el cáncer de mama avanzado. En nuestro estudio, observamos que las pacientes diagnosticadas de CMA presentaban un aumento de los niveles en sangre periférica, tanto de las MDSC totales, como de los dos subtipos M-MDSC y G-MDSC (Fig.43), siendo los niveles del subtipo M-MDSC ligeramente más altos que los de las G-MDSC. Las M-MDSC parecen tener un carácter más inmunosupresor a través de la producción de NO, comparadas con las G-MDSC. Con ello, se pone de manifiesto, que el perfil inmunológico de las pacientes se encuentra alterado, facilitando un microambiente inmunosupresor que favorece el desarrollo de metástasis y progresión tumoral, como propone la fase de escape de la teoría de inmunoección del cáncer.

Cuando determinamos los niveles de este subtipo celular en sangre periférica en las pacientes a lo largo del tratamiento de primera línea, observamos que las pacientes que habían alcanzado BC, considerando RP, RC y EE, experimentaban una caída drástica de los niveles de MDSC totales, M-MDSC y G-MDSC, llegando los niveles de las pacientes que obtuvieron RC al tratamiento, a alcanzar niveles de MDSC totales parecidos a los de la población sana. (Fig. 44, 45 y 46).

Las pacientes que progresaron mostraban un aumento en los niveles de MDSC totales, M-MDSC y G-MDSC (Fig. 44, 45 y 46). En los dos grupos de respuesta al tratamiento también observamos que es el subtipo M-MDSC el que sufre los cambios más llamativos.

J. Markowitz et al., 2013, también demuestran en su estudio que el nivel de MDSC se asocia a la carga tumoral de las pacientes con cáncer de mama metastásico. Además, inhiben la respuesta inmune del huésped por lo que la disminución de los niveles celulares de MDSC mejoran los resultados terapéuticos.

Un estudio realizado por Bergenfelz et al., (2015), informa sobre el aumento de los monocitos y de las M-MDSC en pacientes con cáncer de mama. En su estudio analizan estas poblaciones celulares en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama primario, pacientes con recidiva locorregional, pacientes metastásicas, pacientes con sepsis y controles sanos. Encuentran que los niveles de las M-MDSC están más altos en pacientes con cáncer de mama y en particular en las que tienen enfermedad diseminada. Los niveles de monocitos estaban alterados en las pacientes con cáncer de mama en estadíos tempranos. Esto pone de manifiesto que los tumores pequeños y localizados muestran una respuesta sistémica que afecta a las células mieloides circulantes durante el desarrollo tumoral. Además la proliferación de las células T estaba suprimida tanto en pacientes con cáncer de mama temprano como en pacientes con enfermedad más avanzada y esto se correlacionaba con los niveles de M-MDSC. Sin embargo, en controles sanos, la proporción monocitos/linfocitos T era menor que en las pacientes con cáncer de mama avanzado. En este estudio destacaron que la alta frecuencia de M-MDSC se relacionaba con enfermedad de peor pronóstico ya que se observó en pacientes metastásicas con mayor número de metástasis, metástasis en ganglios linfáticos y órganos viscerales. Estudios anteriores habían reportado que los monocitos aumentaban el potencial invasivo y metastásico de las células de cáncer de mama. Con estos hallazgos, este grupo de investigación, propuso que las M-MDSC podían ser monitorizadas en sangre periférica por lo que podría ser un biomarcador interesante para evaluar la progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama, así como un posible objetivo terapéutico.

Este grupo también concluye que el cáncer y la sepsis no sólo generan respuestas inmunes

similares, sino que además las alteraciones moleculares en los monocitos circulantes también son parecidas.

Finalmente sugieren que el tratamiento dirigido al bloqueo inmunosupresor de estas células podría tenerse en cuenta en pacientes con cáncer de mama temprano y no sólo en enfermedad metastásica.

Nuestros hallazgos, junto con la información reportada por otros grupos de investigación, como el grupo de Gabrilovich y colaboradores, entre otros mencionados en este trabajo, asientan las bases que las MDSC pueden aportar información pronóstica y predictiva en pacientes con cáncer de mama.

El estudio de las MDSC como biomarcadores de enfermedad, se ha llevado a cabo en numerosas investigaciones, en las cuales se han medido los niveles de estas células en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y otros tipos tumorales.

En los primeros experimentos que se realizaron por parte de Bond Almand y colegas (2001), en la determinación de los niveles de diferentes células inmunes en sangre periférica de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, mama y pulmón, se observaron que los niveles de DC maduras eran bajos, mientras que los de MDSC inmaduras eran más altos, en comparación con la población sana. Estos altos niveles de MDSC se correlacionaban muy estrechamente con la carga tumoral. Además, también observaron que, tras la extirpación de los tumores a dichos pacientes, los niveles de MDSC en sangre periférica disminuían, de forma paralela. Desarrollaron un trabajo adicional y establecieron que aproximadamente el 30% de las células mieloides representaban células dendríticas inmaduras, otras eran células inmaduras de linaje macrófago, que suprimían la actividad de los linfocitos T y el resto eran células de estirpe mieloide en etapas tempranas de maduración, como por ejemplo las MDSC. Este trabajo apoyó la hipótesis de que los niveles de MDSC se correspondían con el estado clínico y la carga de enfermedad en pacientes con cáncer de mama metastásico.

Otro estudio realizado por el grupo de Diaz-Montero et al., cuantificó por citometría de flujo el porcentaje de MDSC en sangre periférica y objetivaron que estaban incrementados en pacientes con cáncer de mama en estadios avanzados de la enfermedad. Los resultados de los niveles promedios de MDSC que obtuvieron para cáncer de mama en estadios tempranos I/II fue de 1.96%, en estadios III/IV fue de 2.46% y 3.47%, respectivamente y en pacientes en estadio IV que además tenían 3 o más lesiones metastásicas los valores obtenidos fueron de 4.37%. Otro estudio similar con 25 pacientes con cáncer de mama metastásico que después de la terapia sistémica, tenían niveles superiores al promedio de MDSC en sangre periférica, alcanzaban menor tasa de supervivencia. Además, en este estudio los niveles de MDSC se relacionaron con las de CTC, otro marcador pronóstico interesante.

Todos estos estudios vienen a proponer que los niveles de MDSC se correlacionan con la carga de enfermedad y podría ser un biomarcador pronóstico prometedor en cáncer de mama.

Anteriormente se ha hecho referencia a los resultados de los niveles de MDSC en sangre periférica en las pacientes según su respuesta al tratamiento, obtenidos por nuestro equipo de investigación, lo cual ha puesto de manifiesto que los niveles de estas células disminuyen cuando las pacientes obtienen BC (RP+RC+EE) y aumentan cuando las pacientes progresan. Esto sugiere no sólo un valor pronóstico, sino que podrían participar en el estado de inmunosupresión en el que se encuentran las pacientes antes del comienzo del tratamiento y en su recuperación de la inmunocompetencia, una vez que se trata la enfermedad. Lo contrario ocurriría en las pacientes que progresan.

Desde un punto de vista clínico, el tratamiento de estas pacientes parece influir en los niveles de MDSC en sangre periférica, pero hay que tener en cuenta que hay factores de confusión en este sentido, como es el uso de factores estimulantes de colonias (G-CSF) muy empleados para aumentar los niveles de glóbulos blancos, de neutrófilos, principalmente, los corticoides, para tratar las reacciones adversas a los citostáticos, así como la inclusión de pacientes de varios tipos histológicos y estadios tumorales. Todos ellos podrían dificultar el efecto de los diferentes tratamientos en los niveles de MDSC en sangre periférica.

El grupo de trabajo de Diaz Montero y colaboradores, evaluaron a 17 pacientes con cáncer de mama estadíos II/III, que recibieron quimioterapia adyuvante, esquema AC (ddAC) seguido de paclitaxel (ddT), además recibieron G-CSF. Al finalizar el tratamiento de ddAC, analizaron los niveles de MDSC y observaron que el número de éstas parecía aumentar a costa del subtipo G-MDSC, en comparación con los niveles basales, obteniéndose un porcentaje promedio de MDSC al inicio del tratamiento de 2.2% y al finalizar la quimioterapia ese porcentaje había aumentado hasta obtenerse 11.7%. Sin embargo, después del tratamiento de ddT, este % había aumentado sólo el 1.45% comparado con el valor inicial.

Según estos resultados, hay que tener en cuenta que los diferentes esquemas de tratamiento pueden repercutir de forma diferente en los niveles de MDSC, de manera que por un lado están destinados a eliminar los focos microscópicos que hayan podido quedar de la enfermedad, pero, por otro lado, pueden favorecer un entorno inmunosupresor en el cual las MDSC podrían ayudar a que si queda enfermedad residual, ésta persista.

Dada la importancia emergente de las MDSCs en cáncer de mama las convierte en un objetivo atractivo para seguir investigando su funcionalidad como diana terapéutica en dicha enfermedad.

1.2 Linfocitos T reguladores

Son un grupo de linfocitos T que juegan un papel muy importante en el control de la respuesta inmune ya que ejercen función inmunosupresora sobre los linfocitos T efectoras y suprimen la producción de citocinas. Están implicados en enfermedades autoinmunes, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de aloinjertos, alergias y en cáncer. En cáncer, permiten la evasión tumoral, cumpliéndose la hipótesis de la inmuoedición del cáncer, participan por lo tanto en la progresión y formación de metástasis a distancia, creando un microambiente tumoral inmunosupresor. Ésta acción inmunosupresora es la responsable de inhibir la respuesta inmune (Tanaka y Sakaguchi, 2017; C. M. Paluskievicz, 2019).

Uno de los mecanismos de inmunosupresión de las MDSCs es el reclutamiento y diferenciación de linfocitos T hacia un fenotipo inmunosupresor, las células Treg.

Nuestro grupo ya puso de manifiesto el carácter inmunosupresor de los Treg en un estudio con pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, que recibieron quimioterapia neoadyuvante, donde las pacientes tenía unos niveles basales más altos que el grupo de pacientes sanas, sin diagnóstico oncológico (Sánchez- Margalet et al., 2019). Con esta nueva investigación, volvemos a corroborar la función inmunosupresora de dicho subtipo celular. En este caso nuestras pacientes están diagnosticadas de CMA y efectivamente a nivel basal, comparándolas con una cohorte de mujeres sanas (sin enfermedad oncológica), volvemos a observar que los niveles de Treg en sangre periférica de las pacientes es más alto que en las mujeres sanas (Fig.41), e incluso más altos que en mujeres con cáncer de mama no avanzado de inicio, antes de la neoadyuvancia.

Estos resultados también han sido comunicados por otros grupos de investigación, en artículos donde informan de un alto número de Treg en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama (Liyanage UK et al., 2002), hígado (Ormandy LA et al., 2005), gástrico y esófago (Ichihara F. et al., 2003) comparado con un grupo control sano. Esto también ha sido observado en pacientes con cáncer de ovario (Curiel TJ et al., 2004) y en pacientes con leucemia linfocítica crónica (Beyer M. et al., 2005), entre otros tipos tumorales.

Hay investigaciones que asocian los niveles de Treg con algunos parámetros clinico-patológicos, como la expresión de HER2, los ganglios linfáticos y la expresión o no, de los receptores ER y PR.

En una investigación llevada a cabo por el grupo de Dziobek K., evaluaron el % de Treg en sangre periférica de pacientes con carcinoma ductal invasivo y con PR negativo, que son un grupo de pacientes con características de mal pronóstico, ya que la no expresión del receptor de progesterona podría reflejar un carácter más agresivo del tumor. Además, en pacientes metastásicas con un patrón de expresión ER+/PR-, es un tumor asociado a una reducida supervivencia global, comparado con el grupo donde PR era positivo. Por lo tanto, ellos detectaron

un alto % de Treg en pacientes cuyo tumor era PR negativo en comparación con los tumores PR positivos. Otro estudio que vino a corroborar esto, fue el llevado a cabo por Wang y cols o et al, ellos evidencian que los tumores PR negativos, son tumores agresivos con una tasa de supervivencia global baja y tienen una alta infiltración de linfocitos Treg. Sahar M. A. et al., reportaron que los tumores HER2 positivos tenían mayor nivel de Treg. Todos estos estudios lo que concluyen es que un nivel elevado de Treg se correlaciona con una deficiente supervivencia global en las pacientes.

Por lo tanto, la infiltración de Treg se considera en cáncer de mama como un factor de mal pronóstico. Sin embargo, existen controversias en cuanto a su papel positivo o negativo en cáncer de mama. En un estudio llevado a cabo por West et al., en una cohorte de 175 pacientes con cáncer de mama ER negativo, se encontró que los Treg eran un factor pronóstico positivo. En otras investigaciones se pone de manifiesto el resultado contrario.

Tylor y colaboradores, demostraron que el reclutamiento de Treg al microambiente tumoral, inhibe la respuesta inmune y en pacientes con tumores claudin-low, se encontró que era un tipo tumoral enriquecido con Treg.

Gaynor J. Bates y colaboradores (2006), llevaron a cabo un estudio para evaluar la importancia clínica de los Treg en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en seguimiento a largo plazo. Determinaron los Treg en muestras de CDIS (n=62), en carcinoma invasivo(n=237) y en tejido mamario sano (n=10). Observaron que el número de Treg era más alto en las muestras de CDIS y de carcinoma invasivo y menor en el tejido sano y además en las muestras de tumor invasivo era más alto que en las de CDIS, con lo cual eran pacientes con una alta tasa de recaída y por lo tanto supervivencia más corta. Además hay que resaltar, que este alto número de Treg se identificaba en tumores de alto grado, afectación ganglionar y no expresaban ER, aunque también había tumores que expresaban ER. Estos hallazgos son importantes para evaluar el pronóstico y la progresión de la enfermedad y además que los Treg son una interesante diana terapéutica en cáncer de mama. Según este trabajo, los Treg pueden ser valiosos para identificar pacientes con recaída tardía que puedan beneficiarse de la terapia con IA después del tratamiento con

tamoxifeno.

En un meta-análisis llevado a cabo por J. Shou y colaboradores (2016), compuesto por 15 estudios con 8666 pacientes de cáncer de mama, sus resultados mostraron que niveles altos de Treg se asociaba con mal pronóstico en términos de SG. Esto a su vez se correlacionaba con tumores HER2 positivo, ganglios positivos, mientras que hubo una relación negativa para ER positivo y PR positivo. Con estos resultados, ellos concluyeron que los Treg podría ser una factor pronóstico en cáncer de mama.

En el presente trabajo, nuestro grupo ha demostrado como los niveles de Treg disminuyen de una manera considerable, con el tratamiento sistémico en las pacientes que alcanzan BC (RC+RP+EE) comparado con el estado basal y aumentan ligeramente en las pacientes que progresan (Fig.42). Por lo que estas células podrían como las MDSC, no sólo ser marcadores pronósticos, sino que podrían participar en la respuesta inmune al cáncer de mama.

Según todo lo expuesto, este grupo celular puede ser un prometedor objetivo terapéutico. Ayala et al., diseñaron un experimento, donde inhibieron los linfocitos Treg y vieron que el efecto de las vacunas compuestas por DC mejoraban su eficacia y el efecto antitumoral. Por ello, se propuso esta inhibición para neutralizar el microambiente inmunosupresor tumoral y favorecer así la respuesta inmunitaria antitumoral.

Clark y colaboradores (2020), utilizando el modelo murino de cáncer de mama modificado genéticamente, MMTV-PyMT, caracterizado como subtipo luminal B, ER postivo (Herschkowitz et al., 2007), plantearon la inhibición de forma transitoria de los Treg y observaron que había una reducción significativa en el crecimiento tanto del tumor primario como de las metástasis pulmonares, debido a un aumento en el número de células tumorales que morían por apoptosis. Además, esto reveló que había una fuerte regulación positiva del INF γ sobre las células T y sobre CXCL9, CXCL10, iNOS en la población mieloide (Bos et al., 2013). Ulteriormente, trabajaron sobre la hipótesis de que los linfocitos Treg tienen una función crítica en cáncer de mama, que consiste en suprimir la activación de monocitos y TAM dependientes de INF γ , previniendo su función

antitumoral y facilitando así la progresión tumoral. Estas observaciones apoyaron el hecho de que los Treg impedían la activación de monocitos y macrófagos que se encontraban en el microambiente tumoral por el INF γ , suprimiendo la producción de citocinas por los linfocitos T CD4+, por lo que esto conduce al aumento del tumor primario y de la metástasis. Ellos plantean también que los monocitos de las pacientes se reprogramen, ex vivo, bajo tratamiento con INF γ para luego reintroducirlos a la circulación de la paciente, ya que contribuyen a generar respuestas antitumorales.

También estudiaron el efecto de la inyección intratumoral de INF γ , que podría tener efectos antitumorales. El grupo de Parker y colegas, 2016, habían publicado que probablemente esta inyección tendría efectos secundarios no deseados y el grupo de Benci, 2016, informó sobre la generación de mecanismos de resistencia que anularían el efecto.

Hay un trabajo llevado a cabo por A. Rathinasamy et al., 2017, donde estudian el papel del receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P1), en la regulación de la salida de los Treg desde médula ósea a sangre periférica en pacientes con cáncer de mama. La médula ósea juega un papel muy importante en la acumulación y re-circulación de los linfocitos Treg.

Por lo tanto, es una fuente interesante de Treg que se infiltran en el tumor. S1P1 media la salida de células inmunes, principalmente de las células T del timo y los ganglios linfáticos. Trabajos anteriores como el de Peter y colaboradores, ya propusieron que la migración de Treg desde órganos linfoides al tumor podría verse alterado en pacientes con tumores sólidos. El papel potencial que involucra a la médula ósea en la recirculación de los Treg en pacientes con cáncer ya había sido sugerido por Zhaho et al. Por lo tanto, el grupo de investigación de Rathisanamy, demuestran por primera vez cambios importantes en la redistribución de los linfocitos Treg entre médula ósea, sangre periférica y tejido tumoral. De hecho había un aumento de Treg en sangre periférica, disminución en médula ósea y aumento en el tejido tumoral. Observaron que, en pacientes con cáncer de mama, la distribución de los Treg se correlacionaba de forma inversa entre la médula ósea y el tejido tumoral. Evaluaron el patrón de distribución de los Treg en 50 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama y vieron que se correlacionaba con los diferentes

grados de enfermedad (I, II, III). Los niveles de Treg específicos de antígenos tumorales eran inferiores en médula ósea en comparación con los de sangre periférica, lo que puede suponer que haya un vínculo entre la estimulación del TCR y el agotamiento de las células Treg en médula ósea.

Este estudio sugiere que la médula ósea puede ser un lugar importante para la activación de Treg específicos de antígeno tumoral, que se movilizan preferentemente desde médula ósea a sangre periférica a través de S1P1.

Tanto el aumento de los niveles de S1P en sangre, como la capacidad de las APC para inducir la expresión de S1P1 en los Treg, a través de la estimulación del TCR, podrían generar el mecanismo de tolerancia periférica.

En pacientes con cáncer, la movilización de los Treg específicos de antígeno tumoral mediado por S1P1 en médula ósea podría dar lugar a su acumulación en el tumor dando esto lugar a pobres respuestas clínicas. Además, el efecto de S1P1 sobre los Treg podría estar en parte mediado por el efecto de reclutamiento de las MDSC.

Así que este estudio viene a proponer que disminuir los niveles de S1P en sangre de pacientes con cáncer, podría ser una futura estrategia terapéutica, reteniendo así a los Treg en médula ósea y por tanto reduciendo la infiltración de los mismos en el tumor.

Por tanto, las pacientes con cáncer de mama podrían beneficiarse de la eliminación de las células Treg, tanto en sangre periférica como en el tejido tumoral.

1.3 Expresión de la molécula co-estimuladora OX40 (CD134) en linfocitos CD4+ y CD8+ en pacientes con CMA tratadas en primera línea.

Para comprobar que los cambios en las células inmunosupresoras (MDSC y Treg) se traducían en cambios en el estado de activación de los linfocitos T y por tanto de la inmunocompetencia en las

pacientes con cáncer de mama avanzado y en respuesta al tratamiento, estudiamos la expresión del marcador de activación de superficie, OX40.

En cáncer, hay estudios que ponen de manifiesto que OX40 se expresa en los TILs en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Bell RB et al., 2016), cáncer de ovario (Guo Z. et al., 2014), carcinoma cutáneo de células escamosas (Lai C et al., 2016) , cáncer de mama (Hamidinia M et al., 2013) y colon (Weisler B et al., 2015).

En nuestra investigación, hemos obtenido niveles en sangre periférica mejorados de linfocitos T CD4+ y CD8+ con expresión de OX40+ en pacientes con CMA de debut o recaída, en comparación con una cohorte de mujeres sanas (Fig. 55). Así como en las pacientes que alcanzaron BC a lo largo del tratamiento, lo cual se puede observar en las figuras 56, 57 y 58, se han alcanzado niveles mucho más altos de estos linfocitos T con expresión de OX40, a medida que pasaba más tiempo de la administración del tratamiento, unos 6 meses aproximadamente. Y lo contrario observamos en las pacientes que progresaron. Por tanto los linfocitos T OX40+ pueden ser no sólo un buen marcador de respuesta al tratamiento, sino que pueden participar en la fisiopatología del cáncer de mama, y por tanto podrían ser una importante diana terapéutica.

El grupo de Morris A y colaboradores (2001), demostró que tanto en tumores murinos como humanos, había una regulación positiva del receptor de OX40 tanto en los TILs como en las células de los ganglios linfáticos que drenan los tumores (TDLNC). Para ello plantearon un experimento con 28 ratones, a los cuales les inocularon una línea de cáncer de mama murino, SM1, y luego los trataron con la forma soluble de OX40L, inoculándoles dos inyecciones intraperitoneales de 100µg de ésta forma soluble.

Observaron que 7 de los 28 ratones tratados, habían desarrollado tumor y habían sobrevivido demostrando además de forma significativa beneficio en la supervivencia. El resto que no había desarrollado tumor, se les inoculó otra línea de células de cáncer de mama, 4T1 y se volvieron a tratar con la forma soluble de OX40L. Observaron que los linfocitos T CD4+ que expresaban OX40+ ejercían actividad antitumoral y ésto dió como resultado una supervivencia mejorada e inmunidad

protectora antitumoral. Después de obtener estos resultados, ellos proponen que estos deberían tener aplicación terapéutica en pacientes con cáncer de mama.

En otro trabajo llevado a cabo por el grupo de Hamidinia M. et al., 2013, plantean evaluar los transcritos de FOXP3 y OX40 en sangre periférica de mujeres diagnosticadas de cáncer de mama frente a una cohorte de mujeres sanas. Reclutaron 40 mujeres con carcinoma ductal infiltrante, en diferentes estadios (I-IV), tumores tanto de bajo como de alto grado, entre otras características y 40 mujeres sanas sin antecedentes oncológicos.

La cuantificación de los niveles de los genes transcritos de FOXP3 y OX40, se cuantificó por PCR a tiempo real (qRT-PCR). Los resultados obtenidos mostraron un aumento de la expresión de OX40 en sangre periférica en las pacientes y que además se correlacionaba con el estadio de la enfermedad. Demuestran con ello que se puede revertir la función inmunosupresora de los Treg a través de OX40, que mejora además, la función de las células T efectoras, manteniendo un equilibrio entre ambos tipos de linfocitos T con lo cual ayudaría a generar inmunidad tumoral. Estos hallazgos parecen prometedores para su aplicación terapéutica en cáncer de mama. El estudio de OX40 en los Treg podría conducir al desarrollo de nuevas estrategias para aumentar o disminuir situaciones de inmunosupresión en las que nos interesara disminuir la tolerancia inmunológica tumoral o bien aumentar la respuesta inmune contra el tumor (Yu Fu et al.,2020).

En la actualidad hay en marcha ensayos clínicos centrados en el estudio de moléculas dirigidas a OX40 (J. Deng et al.,2019). Una de ellas es MEDI6469 (anticuerpo agonista IgG1 anti-OX40 murino). Está siendo ampliamente estudiada en pacientes con cáncer colorrectal metastásico en el ensayo clínico NCT02559024 (Fase 1) y en cáncer de cabeza y cuello en el ensayo NCT02274155 (Fase 1)

También se están llevando a cabo estrategias de combinación de anticuerpos agonistas anti-OX40 con otros tipos de tratamientos, a través de ensayos clínicos. En el ensayo clínico NCT01862900 (Fase 2), se ha probado la seguridad y eficacia de la combinación de MEDI6469 con SBRT en pacientes con cáncer de mama metastásico, se espera de ello una respuesta inmune amplificada y

dirigida. El ensayo NCT02315066 (Fase 1), evalúa la seguridad y la dosis máxima tolerada de PF-04518600, un anticuerpo IgG2 agonista anti-OX40 humano, sólo o en combinación con PF-05082566, anticuerpo agonista anti-4-1BB, en pacientes con carcinoma avanzado o metastásico.

Otro ensayo clínico en curso, NCT02410512 (Fase 1), evalúa la seguridad y farmacocinética de MOXR0916, anticuerpo monoclonal agonista humanizado anti-OX40, con MPDL3280A, un anticuerpo anti-PDL1, en pacientes con tumores sólidos metastásicos.

Existen numerosos ensayos clínicos en fases 1 y 2 en curso, puesto que se considera la terapia anti-OX40 una estrategia prometedora en la inmunoterapia contra el cáncer. A pesar de ello existen todavía considerables limitaciones e incertidumbres a la hora de actuar sobre este biomarcador, ya que aún se desconoce el momento óptimo de la administración, efectos secundarios inesperados, la necesidad de administración con otras terapias y las diferencias en la expresión de OX40 entre el ratón y el humano. Por lo tanto se necesita investigación clínico-traslacional en el desarrollo de terapias relacionadas con OX40.

1.4 Expresión de la molécula co-inhibidora PD-1 en linfocitos CD4+ y CD8+ en pacientes con CMA tratadas en primera línea.

A principios de 1990, el inmunólogo japonés Tasuku Honjo, identificó la proteína PD-1 (del inglés Programmed Cell Death-1), que se expresa en la superficie de los linfocitos T, después de la activación de los mismos por antígenos extraños presentados por el MHC y su unión al TCR. Por este gran descubrimiento fue galardonado en 2018 con el premio Nobel en Medicina y Fisiología junto a otro gran científico, James Allison, descubridor de la molécula CTLA-4 (del inglés Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4). Estos grandes descubrimientos han permitido el diseño de fármacos que destruyen el tumor por medio de la activación del sistema inmunológico. De ahí que se les conozca como los “padres de la moderna inmunoterapia”.

La vía de PD-1 juega un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia de los linfocitos T

periféricos. No induce muerte celular programada directamente, parece que reduce los factores de crecimiento celular y las señales de supervivencia. Se une a dos ligandos, PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC). La activación de PD-1 a través de su unión a PD-L1 o PD-L2, tiene como resultado la regulación negativa de la actividad de los linfocitos T, producción de citocinas, lisis de células T y favorece la tolerancia a antígenos. Cuando las células T se activan, PD-1 se expresa simultáneamente para que la célula atacada pueda escaparse de la respuesta inmunológica. La expresión de PD-1 disminuye una vez que el antígeno es eliminado.

La vía PD-1/PD-L1 juega un papel importante en, diabetes , miocardiopatía, VIH, lupus y otras enfermedades autoinmunes y también en tumores sólidos.

En tumores sólidos, como el cáncer de mama, la expresión de PD-L1 se asocia a tumores de gran tamaño y alto grado de proliferación, como los inmunofenotipos TNBC y HER2 positivo.

Se ha demostrado, in vivo, que PD-L1 aumenta la tumorigénesis y la invasividad y favorece que la célula tumoral sea menos susceptible a la acción de los linfocitos T CD8+ específicos. En modelos murinos knockout para PD-1, el crecimiento del melanoma está drásticamente disminuido.

In vivo, se ha observado que el bloqueo del eje PD-1/PD-L1, utilizando anticuerpos específicos, anti-PD-1/anti-PD-L1, conduce a una regresión tumoral bastante evidente, por activación de las células T.

En nuestro estudio, para completar el análisis del estado de inmunocompetencia de las pacientes con cáncer de mama avanzado, medimos los niveles de linfocitos que expresan este marcador de tolerancia o de célula exhausta. Nuestro trabajo consistió en evaluar los niveles celulares en sangre periférica de linfocitos TCD4+ y CD8+ que expresaban PD-1+, en pacientes con CMA en comparación con una cohorte de mujeres sanas, donde pudimos objetivar que esos niveles celulares eran ligeramente más altos en la población sana en comparación con las pacientes, antes de comenzar el tratamiento sistémico de primera línea (Fig.59).

Ésto podría deberse a la gran complejidad de los mecanismos de interrelación entre los elementos que componen el sistema inmunológico más allá de los descritos en este trabajo, liberación de citocinas inhibitorias, expansión de los linfocitos Treg y TAM, la expresión de puntos de control inmunológico y la presencia de MDSC, trabajando todos juntos para crear un ambiente inmunosupresor. A pesar de este resultado, en la pacientes que obtuvieron BC a lo largo del tratamiento, los niveles de linfocitos TCD4+PD-1+ y CD8+PD-1+ disminuyeron de forma significativa, lo contrario ocurrió en las pacientes que progresaron. (Fig.60, 61 y 62)

Hay otros grupos de investigación estudiando la expresión de este biomarcador en linfocitos T CD4 y CD8 en sangre periférica en pacientes con cáncer avanzado/metastásico.

Uno de ellos es el grupo de Bian Shi y colaboradores (2018), que diseñaron un estudio para explorar la expresión de PD-1 en células T (CD3+, CD3+/CD4+ y CD3+/C8+) en sangre periférica y su relación con las características clinico-patológicas y con el pronóstico en pacientes con cáncer gástrico metastásico y se analizó por citometría de flujo. Reclutaron 100 pacientes diagnosticados de cáncer gástrico metastásico, los resultados que obtuvieron dilucidaron que había una alta expresión de PD-1 en pacientes con cáncer gástrico en estadíos avanzados, CD3+ (20.4%), CD3+/CD4+ (13.0%) y CD3+/CD8+ (9.4%), respectivamente. Los resultados obtenidos para la OS y para la PFS fueron de 12.2 vs 3.9 meses, por lo tanto se confirma una tasa de supervivencia general más baja en pacientes con cáncer gástrico en estadíos avanzados. Por lo tanto, este grupo propone con estos resultados que la alta expresión de PD-1 en las células T puede ser un biomarcador pronóstico para estos pacientes.

Otro estudio fue llevado a cabo por Witold Zgodzinski et al., 2019. Este grupo determinó determinar la expresión de PD-1/PD-L1 en linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre periférica de 40 pacientes diagnosticados de cáncer gástrico avanzado. Las características principales del tumor a tener en cuenta fueron: tumores de histología adenocarcinoma difuso vs intestinal, según la clasificación de Lauren, estadiaje (I-IV) y grado (I-III) . Como grupo control, 20 donantes sanos. El análisis se hizo por citometría de flujo. Sus resultados revelaron que el % de linfocitos CD4+PD-1+ y CD8+PD-1+ es más alto en los pacientes que en la población sana, también ocurre lo mismo con la

expresión de PD-L1. En el análisis por subtipos, el tipo difuso fue el que reflejaba un alto % de linfocitos CD4+PD-1+, comparado con los de tipo intestinal.

Un alto % de CD8+PD-1+ se encontró en los tumores pobremente diferenciados (Grado III), comparados con los de grado I-II.

Sin embargo, no encontraron diferencias estadísticamente significativas en el % de células que expresaban PD-1+/PD-L1+.

Con todo ello, demostraron que, en cáncer gástrico avanzado, PD-1 y PD-L1, se expresan en un alto % en los linfocitos TCD4+ y CD8+ en sangre periférica, comparado con una cohorte sana y que además hay mayor expresión en el tipo difuso vs intestinal, lo cual se asocia a un pobre pronóstico. Estos resultados, podrían contribuir a una mejor comprensión de las funciones de los linfocitos T efectores en la respuesta inmune en esta patología.

Otro estudio destacable, es el de Hong Zheng y colaboradores (2016), en cáncer de pulmón no microcítico avanzado(NSCLC), estadios IIIB-IV. En este caso se reclutaron 42 pacientes y 25 donantes sanos, se llevó a cabo el estudio en sangre periférica y se analizaron las células por citometría de flujo. En este trabajo se observó, que había mayor expresión de linfocitos TCD4+PD-1+ en pacientes que la población sana. Sin embargo, la expresión de linfocitos TCD8+PD-1+, fue comparable entre ambos grupos de estudio. Para los investigadores, este dato sugiere que los linfocitos CD4+ juegan un papel fundamental en la tolerancia inmune dependiente de PD-1 en pacientes con NSCLC, y no así los linfocitos CD8+. También lo correlacionaron con el resultado clínico. De hecho, la alta expresión de PD-1+ en CD4+, se asoció a un pobre resultado clínico con una corta tasa de OS y PFS para estos pacientes. Este grupo de investigación además llevó a cabo el análisis de la expresión de PD-1+ después del tratamiento con anti-PD-L1 y concluyeron que la expresión de PD-1+ en linfocitos CD4+ tiene un alto valor predictivo en este grupo de pacientes ya que se asocia con mal resultado clínico después del tratamiento. Por lo tanto, proponen que su estudio podría determinar el pronóstico de los pacientes con NSCLC.

Con todos estos resultados, PD-1 se revela como una importante diana terapéutica, y como se ha hecho mención anteriormente, ya se dispone de fármacos aprobados por la FDA como nivolumab o pembrolizumab y numerosos ensayos clínicos en marcha en distintas patologías tumorales como melanoma, cáncer de pulmón, cáncer renal y cáncer de mama entre otros. Algunos estudios han demostrado la eficacia del bloqueo PD-1 o PD-L1 con pembrolizumab o atezolizumab en cáncer de mama triple negativo metastásico (F. Shütz et al., 2017).

1.5 Niveles en sangre periférica de las diferentes subpoblaciones celulares en pacientes con CMA tratadas en primera línea.

Diferentes estudios epidemiológicos y clínicos han evidenciado que el tumor mamario y la inflamación están interrelacionados. La inflamación forma parte del microambiente tumoral favoreciendo la progresión, proliferación, migración, invasión y metastásis.

El análisis en sangre periférica de parámetros, como los leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos y plaquetas, así como la ratio neutrófilos/linfocitos (NLR), linfocitos/monocitos (LMR), plaquetas/linfocitos (PLR), son indicadores de respuesta inflamatoria y han sido propuestos como factores pronósticos en muchos tipos de neoplasias (C. Van Berckelaer et al., 2020).

El estudio de la relación entre los parámetros en sangre periférica, el pronóstico y el tratamiento del cáncer de mama será de una gran importancia clínica ya que proporciona información para su aplicación médica.

A. Pacientes vs cohorte sana

En nuestro estudio medimos los niveles en sangre periférica de: Leucocitos, neutrófilos, monocitos, linfocitos (linfocitos totales, linfocitos T CD4, linfocitos T CD8, linfocitos B y NK), y la ratio CD4/CD8, ratio linfocitos/monocitos, ratio CD8/Treg y ratio neutrófilos/linfocitos, tanto en pacientes diagnosticadas de CMA y lo comparamos con una cohorte de mujeres sanas.

En las pacientes obtuvimos niveles ligeramente más altos de leucocitos totales (Fig.23) y de neutrófilos (Fig.25) comparado con la población sana, sin obtenerse diferencias estadísticamente significativas. La ratio neutrófilos/linfocitos también es más alta en las pacientes que en la población sana, alcanzándose diferencias estadísticamente significativas (Fig.53). Sin embargo, en la cohorte sana, se alcanzaron niveles más altos que en las pacientes, para los linfocitos totales (Fig.29) linfocitos T (Fig.31), linfocitos TCD4 (Fig.37), linfocitos TCD8 (Fig.39), obteniéndose diferencias estadísticamente significativas. La ratio CD4/CD8 (Fig.47) y la ratio CD8/Treg (Fig.49), también es más alta en las mujeres sanas que en las pacientes, pero no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas.

Con estos resultados se pone de manifiesto el estado inflamatorio y de inmunodepresión en el que se encuentran las pacientes antes de comenzar el tratamiento y el estado de inmunocompetencia de la población sana. Como se ha puesto de manifiesto al principio, los leucocitos y dentro de ellos, los neutrófilos y la ratio neutrófilos/linfocitos, son parámetros involucrados en el proceso inflamatorio del desarrollo y metástasis tumoral (K.A.Mouchemore et al.,2018). Mientras que la población de linfocitos forma parte de las respuestas inmunitarias específicas y juega un papel primordial en la vigilancia inmune.

B. BC vs PE

En nuestra investigación también medimos los niveles de los parámetros en sangre periférica expuestos en el apartado anterior, en las pacientes a lo largo del tratamiento. Con los resultados obtenidos demostramos que la población de leucocitos y neutrófilos, principalmente, fue disminuyendo de forma drástica a lo largo del tratamiento en las pacientes que alcanzaron BC (RC, RP, EE), obteniéndose diferencias estadísticamente significativas con respecto al estado basal (Fig.24 y 26). En las pacientes que progresaron ocurrió lo contrario. En cuanto a la población de linfocitos nos encontramos un aumento de los linfocitos totales (Fig.30), linfocitos T (Fig.32), linfocitos TCD4 (Fig.38) y linfocitos TCD8 (Fig.40), junto con la ratio CD4/CD8 (Fig.48), ratio CD8/Treg (Fig.50), ratio linfocitos/monocitos (Fig.52) y la ratio neutrófilos/linfocitos disminuyó en las pacientes con BC a lo largo del tratamiento, alcanzándose diferencias estadísticamente

significativas (Fig.54). Interesante destacar los resultados obtenidos para la ratio CD8/Treg y la ratio linfocitos/monocitos donde podemos ver una disminución bastante pronunciada en el grupo de pacientes que progresa, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas. En las pacientes con BC el resultado de la ratio a destacar es la ratio neutrófilo/linfocitos, donde se alcanzaron valores mucho más bajos que en la población que progresa.

Con los resultados alcanzados, volvemos a dilucidar las poblaciones celulares que están involucradas tanto en el estado de inmunocompetencia, que sería el alcanzado por las pacientes que obtienen BC con el tratamiento y en el estado de inmunosupresión donde estarían las pacientes con PE.

Hay diferentes grupos de investigación dedicados al estudio de estos parámetros hematológicos y su implicación en el pronóstico del cáncer de mama, que vienen a confirmar nuestros resultados.

Xu et al., encontraron en su investigación que la elevación de neutrófilos en pacientes con cáncer de mama antes de someterse a cirugía, venía a predecir pacientes con mal pronóstico y un corto tiempo de supervivencia.

En el estudio de Li Sen, demostraron que los neutrófilos favorecían la invasividad y la EMT en células de cáncer gástrico por acción de la IL-17.

El grupo de Huang JJ., propone que las células mononucleares de sangre periférica pueden contribuir a la progresión en tumores malignos y es un factor relacionado con la tumorigénesis.

Gotow et al., reportaron que los cambios observados en sangre periférica de los niveles de monocitos y linfocitos y la ratio linfocitos/monocitos, es un factor pronóstico en cáncer de mama y puede afectar a la SLE.

J. Wen y et al.,(2015), evaluaron el valor pronóstico del recuento absoluto de linfocitos, de monocitos y de la proporción linfocitos/monocitos, en pacientes con cáncer de mama. Los análisis

por subgrupos reveló que el valor absoluto de monocitos era un factor pronóstico desfavorable en pacientes con cáncer de mama en estadios II/III y luminal B con sobreexpresión de Her 2 y TNBC.

En cuanto a la ratio neutrófilos/ linfocitos , Elyasinia y colaboradores, han demostrado que está asociada a la estadificación tumoral según el TNM en cáncer de mama y tiene valor pronóstico, ya que un alto valor indica mal pronóstico.

En un meta-análisis llevado a cabo por el grupo de Ethier J-L (2017), mostraron que esta ratio está asociada al pronóstico en cáncer de mama, valores altos de la misma dan lugar a un menor tiempo de SLE y SG y mal pronóstico. Además, un alto valor de la ratio neutrófilos/linfocitos está relacionado con el número de metástasis y observaron que la incidencia de metástasis a ganglios linfáticos aumentaba 1.7 veces.

Otros estudios centrados en la valoración de esta ratio con respecto al pronóstico en cáncer de mama, es el llevado a cabo por Atak Ibrahim et al., 2019, investigan la relación entre NLR y la metástasis en ganglios linfáticos no centinela en cáncer de mama temprano. Las principales conclusiones del estudio fueron: 1. la invasión linfovascular, la extensión extracapsular y NLR son parámetros predictivos de positividad en galnglios linfáticos no centinela y 2. NLR pre-cirugía era una herramienta de diagnóstico para predecir metástasis en ganglios linfáticos no centinela.

Fujimoto Y et al., 2019, analizaron la relación entre NLR y el recuento absoluto de linfocitos (WBC) en pacientes con cáncer de mama. Los resultados obtenidos fueron: 1. NLR es un factor pronóstico para valorar la SLE en pacientes con cáncer de mama con alto recuento absoluto de linfocitos. 2. Tanto NLR como el recuento absoluto de linfocitos pueden ser útiles para comprender mejor los mecanismos e identificar a las pacientes con alto riesgo de recurrencia que necesiten tratamientos adicionales.

En cuanto a la ratio linfocitos/monocitos en pacientes con cáncer de mama, encontramos varios estudios que ponen de manifiesto la correlación de dicho parámetro con un mejor pronóstico de la enfermedad. Marín Hernández C. y colaboradores, han reportado que LMR pre-cirugía está

asociada a las pacientes con cáncer de mama que recibieron quimioterapia neoadyuvante. Cuanto mayor es el valor de este parámetro, mayor es el tiempo de supervivencia y mejor el pronóstico. Hu RJ y colegas en su estudio llegan a la misma conclusión que el grupo de Marín Hernández.

Otros estudios publicados recientemente como el de Zenan H et al., 2019, analiza de forma retrospectiva la relación entre los parámetros en sangre periférica preoperatorios y los resultados clínicos postoperatorios en pacientes con diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama. Las conclusiones obtenidas por este grupo fueron: 1. LMR es un buen predictor en cáncer de mama Luminal A y sobreexpresión de HER2. 2. WBC Y NLR fueron predictores adversos para el subtipo TNBC. 3. Estos parámetros en sangre periférica juegan un papel importante en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama.

Lee KH et al., 2018, investigaron el significado clínico y la relación entre los TILs y los parámetros hematológicos en pacientes con cáncer de mama. Los resultados obtenidos:

1. Demostraron que hay una relevancia importante entre los TILs y los parámetros hematológicos en pacientes con cáncer de mama. 2. La influencia del sistema inmune en la progresión en cáncer de mama difiere entre los diferentes subtipos.

A pesar de todos los estudios publicados referentes a la relación entre los parámetros hematológicos y su implicación en el pronóstico del cáncer de mama, que parece bastante esperanzador en cuanto al pronóstico en cáncer de mama, aún se necesita más investigación en este campo para alcanzar conclusiones definitivas (L. Chen et al., 2020).

Consideraciones Finales.

En base a todo lo expuesto con anterioridad, nuestros hallazgos parecen prometedores, ya que sugieren fuertemente el carácter inmunosupresor de las MDSC en conjunción con los Tregs y la función co-estimuladora y co-inhibidora de OX40 y PD-1, respectivamente. La disminución en sangre periférica de las MDSC y de los Tregs junto con el aumento de la expresión de OX40 en los linfocitos TCD4+ y linfocitos TCD8+, a lo largo del tratamiento antineoplásico de nuestras

pacientes, tratadas con HT en monoterapia, quimioterapia, HT+ i CDK4/6, inmunoterapia o estrategias combinadas, sugieren que existe una mejoría del perfil inmunológico de las pacientes revirtiéndose el estado de inmunosupresión. Estas determinaciones podrían convertirse en potenciales biomarcadores para monitorizar de forma sencilla, mediante una extracción de sangre, la respuesta al tratamiento.

Se están llevando a cabo estudios preclínicos, para diseñar combinaciones de tratamientos que se dirigen hacia las MDSC y a los puntos de control inmunológico, lo que aumenta la actividad efectora inmunitaria contra las células tumorales. Recientemente se ha reportado que la inhibición de las vías PI3K, JAK/AKT y CDK4/6, mejora la infiltración de TILs citotóxicos de tipo linfocitos TCD8+ en modelos de ratón que han desarrollado cáncer de mama triple negativo. Este efecto parece estar estrechamente relacionado con la disminución de los niveles de MDSC, lo que facilita la acción de las células T efectoras. Además de eso, este efecto puede potenciarse bloqueando algunos inhibidores de puntos de control inmunitarios específicos.

En consecuencia, dirigirse a las MDSC para reducir sus niveles, puede aumentar potencialmente la eficacia de los inhibidores de puntos de control inmunitarios que se utilizan en la actualidad para varias enfermedades oncológicas.

Los resultados de este estudio se centraron en biomarcadores potenciales fácilmente detectables en sangre periférica para controlar la respuesta a los diferentes tratamientos antineoplásicos en CMA. Así mismo, permite prever nuevas dianas inmunomoduladoras para aplicar en cáncer de mama.

Existen innumerables posibilidades terapéuticas en este sentido, ya que hay diferentes opciones para potenciar la respuesta inmune del huésped, ya sea empleando agentes clásicos como doxorubicina, ciclofosfamida, gemcitabina, etc o agentes más novedosos como los inhibidores del punto del control inmunológico, los anti-PD-1, que bloquean el efecto inhibitor y pro-apoptótico de las células T y los anti-OX40 o anti-CD40, que estimulan la activación de la señalización de los linfocitos T y combinaciones del tipo de la bioquimioterapia.

Aunque consideramos que los datos comunicados en este trabajo de Tesis son relevantes y robustos, se necesitan estudios confirmatorios adicionales con un tamaño muestral mayor y/o con otros tipos tumorales. No obstante, se pueden sugerir nuevas vías de investigación a partir de estos hallazgos, ya que una especie de biopsia líquida inmunitaria podría proporcionar información extraordinariamente valiosa y complementaria en cáncer de mama, no sólo en el contexto de enfermedad avanzada, sino también durante el seguimiento de pacientes con cáncer de mama previamente tratadas con fines curativos.

Conclusiones

Según los resultados obtenidos podremos identificar un “inmuno score” o partir de una serie de biomarcadores inmunológicos claves que nos permitan conocer qué grupos de pacientes son de peor o mejor pronóstico y cuáles son los efectos inmunes de las diferentes terapias sistémicas. Con éstos hallazgos podemos concluir:

1. El perfil inmunitario de las pacientes con cáncer de mama avanzado, es diferente al de la población sana.
2. El estado de inmunocompetencia de la población sana se caracteriza por bajos niveles en sangre periférica de MDSC, Treg y altos niveles de linfocitos TCD4+ y CD8+.
3. En las pacientes con cáncer de mama avanzado en estado basal, antes de comenzar el tratamiento, observamos en sangre periférica, altos niveles de MDSC, Treg, leucocitos, neutrófilos y bajos niveles de linfocitos TCD4+ y CD8+.
4. El estudio comparador con la cohorte sana, pone de manifiesto el estado inmunosupresor de las pacientes con cáncer de mama avanzado.
5. En las pacientes que obtienen beneficio clínico, con el tratamiento de primera línea, se objetiva un marcado descenso de los niveles de MDSC, Tregs y de los linfocitos T CD4+PD-1+ y CD8+PD-1+ y un marcado aumento de los linfocitos T CD4+ OX40+ y CD8+OX40+. Lo contrario observamos en las pacientes que progresaron.
6. El tratamiento de primera línea, parece tener un cierto carácter inmunomodulador, capaz de revertir el estado de inmunosupresión de las pacientes.
7. Las MDSC y los Treg, prometen ser un potencial marcador de respuesta a los tratamientos.
8. Las MDSC, principalmente, podrían considerarse como posible diana terapéutica.

9. Los biomarcadores, OX40+ y PD-1+, tendrían utilidad para monitorizar la respuesta a los tratamientos.

10. La biopsia líquida como método ventajoso sobre la biopsia tumoral, en la determinación de los componentes circulantes del tumor, de manera que podemos obtener el perfil inmunológico de cada paciente en diferentes momentos de la enfermedad.

A la luz de los resultados arrojados en esta Tesis Doctoral, podemos decir, que en cáncer de mama avanzado, en principio se cumpliría la “Hipótesis de la inmuoedición”. Aunque harían falta más estudios con mayor tamaño muestral y mayor poder estadístico para poder asentar a las diferentes poblaciones celulares que forman parte del sistema inmunitario, tanto como marcadores predictivos como pronósticos en cáncer de mama, principalmente a las MDSC.

Bibliografía

- A Ben Baruch. Host microenvironment in breast cancer development. Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor microenvironment interactions. *Breast Cancer Res* 2003, 5: 31-36.
- A.K.Abbas; A.H.Lichtman; S, Pillai. 8ª Edición.
- A. Eguiara et al. Células madre tumorales: una diana terapéutica en el cáncer de mama. *Rev Senol Patol Mamar*. 2012; 25 (3): 107-115.
- A.L. Rodríguez- Perea; E.D. Arcia; C.M. Rueda and P.A. Velilla. Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. *Clinical and Experimental Immunology* 185: 281-291.
- Alfonso Alba- Bernal; Rocío Lavado- Valenzuela; María Emilia Domínguez- Recio et al. Challenges and achievements of liquid biopsy technologies employed in early breast cancer. *EbioMedicine* 62 (2020).
- Ali Masjedi; Vida Hashemi; Mohammad Hojjat-Farsangi et al. The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Bimedicine & Pharmacotherapy* 108 (2018) 1415-1424.
- Amit K. Menta; Donald T. Gracias and Michael Croft. TNF Activity and T Cells. *Cytokine*. 2018 January; 101:14-18.
- Anchana Rathinasamy; Christoph Domschke; Yingzi Ge et al. Tumor specific regulatory T cells in the bone marrow of breast cancer patients selectively upregulate the emigration receptor S1P1. *Cancer Immunol Immunother* (2017) 66: 593-603.
- Antero Salminen, Anu Kauppinen, Kai Kaarniranta. AMPK activation inhibits the functions of myeloid-derived suppressor cells (MDSC): impact on cancer and aging. *Journal of Molecular Medicine* (2019) 97: 1049-1064.
- Arenas-Ramirez, Natalia; Woytschak, Janine; Boyman, Onur (2015). Interleukin-2: biology, design and application. *Trends in Immunology*, 36(12):763-777.
- Atul Purohit ; Simon P Newman and Michael J Reed. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002, 4:65-69.
- Bashar Emon; Jessica Bauer; Yasna Jain; Barbara Jung; Taher Saif. Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis- A Mini Review. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 16 (2018) 279-287.

- Bian Shi; Qiujian Li; Xuhui Ma, et al. High expression of programmed cell death protein 1 on peripheral blood T-cell subsets is associated with poor prognosis in metastatic gastric cancer. *ONCOLOGY LETTERS* 16 : 4448- 4454, 2018.
- Biswajit Roy; Ashish Bhattacharjee; Bo Xu et al. IL-13 signal transduction in human monocytes: phosphorylation of receptor components, association with Jaks and phosphorylation / activation of Stats. *Journal of Leukocyte Biology* Volume 72, September 2002.
- Bond Almand; Joseph I. Clark; Ekaterina Nikitina et al. Increased Production of Immature Myeloid Cells in Cancer Patients: A Mechanism of Immunosuppression in Cancer. *J Immunol* 2001; 166:678-689.
- Borsig, L.; Wolf. Monika Julia; Roblek, Marko et al. Inflammatory chemokines and metastasis-tracing the accessory. *Oncogene*, 33(25): 3217-3224.
- Breast. GLOBOCAN 2018. International Agency for Research on Cancer (IARC). World Health Organization.
- C. Van Berckelaer; M. Van Geyt; S. Linders et al. A high neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio are associated with a worse outcome in inflammatory breast cancer. *The Breast* 53 (2020) 212-220.
- Camilla Rydberg Millrud; Caroline Bergenfelz and Karin Leandersson. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (NO 2), pp: 3649-3665.
- Carlos J Montoya; Paula A Velilla; María T. Rugeles. Caracterización de las células T reguladoras por citometría de flujo: estado del arte y controversias. *Biomédica* 2010; 30 (Supl):37-44.
- Carmen Ruiz-Ruiz; Carmen Ruiz de Almodóvar; Antonio Rodriguez et al. The Up-regulation of Human Caspase-8 by Interferon- γ in Breast Tumor Cells Requires the Induction and Action of the Transcription Factor Interferon Regulatory Factor-1. *The Journal of Biological Chemistry* Vol.279, No 19, Issue of May 7, pp:19712-19720, 2004.
- Caroline Aspord; Alexander Pedroza- Gonzalez; Mike Gallegos et al. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13 secreting CD4+T cells that facilitate tumor development. *JEM* Vol 204, No 5, May 14 2007, 1037-1047 .
- Caroline Bergenfelz and Karin Leandersson. The Generation and Identity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Frontiers in Oncology* February 2020, Volume 10, Article 109.

- Caroline Bergenfelz, Anna- Maria Larsson; Kristoffer von Stedingk et al. Systemic Monocytic-MDSCs Are Generated from Monocytes and Correlate with Disease Progression in Breast Cancer Patients. *PLoS ONE* 10(5): e0127028.
- Catherine E. Steding; Sung-tse Wu; Yanping Zhang et al. The role of interleukin-12 on modulating myeloid-derived suppressor cells, increasing overall survival and reducing metastasis. *Immunology* 133, 221-238.
- Cédric Rébéc, Frédérique Végran; Héléne Berger and François Ghiringhelli. STAT3 activation. A key factor in tumor immunoescape. *JAK-STAT* 2:1, e23010; January/February/March 2013; ©2013 Landes Bioscience.
- C-H. Heldin; J.Lennartsson & B. Westermark. Involvement of platelet- derived growth factor ligands and receptors in tumorigenesis. *Journal of Internal Medicine* 2018; 283:16-44.
- Charles V. Clevenger. Roles and Regulation of Stat Family Transcription Factors in Human Breast Cancer. *American Journal of Pathology*, Vol.165: 1449-1460, No 5, November 2004.
- Charlotta Lindvall; Wen Bu; Bart O Williams, Yi Li. Wnt signaling stem cells, and the cellular origin of breast cancer. *Stem Cell Rev.* 2007 Jun; 3(2):157-68.
- Chiara Fazio and Luigi Ricciardiello. Inflammation and Notch signaling: a crosstalk with opposite effects on tumorigenesis. *Cell Death and Disease* (2016) 7 e2515.
- Cho-Rong Lee; Wongeun Lee; Steve K. Cho and Sung-Gyoo Park. Characterization of Multiple Cytokine Combinations and TGF- β on Differentiation and Functions of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19, 869.
- Chris Siebel and Urban Lendahl. NOTCH SIGNALING IN DEVELOPMENT, TISSUE HOMEOSTASIS, AND DISEASE. *Physiol Rev* 97: 1235-1294, 2017. Published August 9, 2017.
- Christina M. Paluskiewicz; Xuefang Cao; Reza Abdi et al. T Regulatory Cells Prime the Suppressive Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology* October 2019, Volume 10, Article 2453.
- Christine N. Vrakas; Ryan M. O'Sullivan; Samantha E. Evans et al. The Measure of DAMPs and a role for S100A8 in recruiting suppressor cells in breast cancer lung metastasis. *Immunological Investigations*, Early Online : 1-5, 2014.
- Clara Gómez-Aleza et al. Inhibition of RANK signaling in breast cancer induces an anti-tumor immune response orchestrated by CD8⁺T cells. *NATURE COMMUNICATIONS* (2020) 11: 6335.

- Claudia Tulotta and Penelope Ottewell. The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. *Endocrine- Related Cancer* (2018)25, R421-434.
- Claudia Tulotta; Diane V Lefley; Katy Freeman et al. (2019). Endogenous production of IL-1B by breast cancer cells drives metastasis and colonisation of the bone microenvironment. *Clinical Cancer Research*. ISSN 1078-0432.
- D. Narita; E. Seclaman; A. Angnel et al. Altered levels of plasma chemokines in breast cancer and their association with clinical and pathological characteristics. *Neoplasma* 63, 1, 2016.
- Dagmar Gottharat; Jana Trifinopoulos; Veronika Sexl and Eva Maria Diaz. JAK-STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation. *Frontiers in Immunology* November 2019, Volume 10, Article 2590.
- Damya Laoui; Kiavash Movahedi; Eva Van Overmeire et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int. J. Dev. Biol.* 55:861-867.
- Daniele M Gilkes and Gregg L Semenza. Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. *Future Oncol.* 2013 November; 9(11): 1623-1636.
- Daniele M. Gilkes. Implications of Hypoxia in Breast Cancer Metastasis to Bone. *Int.J.Mol.Sci.* 2016, 17, 1669.
- Datos cáncer de mama 2018. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC).
- Dawei Shou; Liang Wen; Zhenya Song; Jian Yin; Qiming Sun and Weihua Gong. Suppressive role of myeloid- derives suppressor cells (MDSCs) in the microenvironment of breast cancer and targeted immunotherapies. *Oncotarget*, Vol. 7, NO. 39 .
- De la Cruz- Merino L; Chiesa M; Caballero R, et al. Breast cancer immunology and immunotherapy current status and future perspectives. *Int Rev Cel Mol Bio.* 2017; 331:1-53.
- Dmitry I. Gabilovich. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res.* 2017 January; 5(1):3-8.
- Dongjun Peng; Takashi Tanikawa; Wei Li et al. Myeloid- derived suppressor cells endow stem- like qualities to breast cancer cells through IL-6/STAT3 and NO/NOTCH crosstalk signaling. *Cancer Res.* 2016 June 1; 76(11): 3156-3165.
- Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, March 4, 2011.

- Eduard Batlle; Joan Massagué. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 2019 April 16; 50(4): 924-940.
- Eleni- Kyriaki Vetsika; Aristeidis Koukos and Athanasios Kotsakis. Myeloid-Derived Suppressor Cells. Major Figures that shape the Immunosuppressive and Angiogenic Network in Cancer. *Cells* 2019,8,1647.
- Elham Fakhrehani and Masakazu Toi. Antiangiogenesis Therapy for Breast Cancer: An Update and Perspectives from Clinical Trials. *Jpn J Clin Oncol* 2014; 44(3) 197-207.
- Elia D. Tait Wojno; Christopher A. Hunter and Jason S. Stumhofer. The immunobiology of the Interleukin- 12 family: Room for discovery. *Immunity* 2019 April 16, 50(4):851-870.
- Elnaz Sheikhpour ; Parisa Noorbakhsh; Elnaz Foroughi et al. A Survey on the Role of Interleukin-10 in Breast Cancer: A Narrative. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology Vol 7, NO 1, Oct 2018.*
- Elton Rexhepaj; Karin Jirstrom Darran PO'Connor et al. Validation of cytoplasmic-to-nuclear ratio of survivin as an indicator of improved prognosis in breast cancer. *BMC Cancer* 2010, 10:639.
- Emmanuel N. Kontomanolis; Sofia Kalagasidou; Stamatia Pouliliou et al. The Notch pathway in Breast Cancer Progression. *The Scientific World Journal, Volume 2018, Article ID 2415489, 11 pages.*
- Estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2019. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), 2019.
- Estimated incidence and mortality by cancer, Spain, Female, All ages, 2018. Source: ECIS- European Cancer Information System. From: <https://ecis.jrc.europa.eu>. © European union 2018.
- Estimated incidence by cancer- percentage distribution, Spain, Female, All ages, 2018. Source: ECIS- European Cancer Information System. From: <https://ecis.jrc.europa.eu>. © European union 2018.
- Estimated incidence by cancer, Spain, Female, All ages, 2018. Source: ECIS- European Cancer Information System. From: <https://ecis.jrc.europa.eu>. © European union 2018.
- Evgenii Tcyganov; Jerome Mastio; Eric Chen and Dmitry I. Gabrilovich. Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Curr Opin Immunol.* 2018 April; 51: 76-82.
- Fan et al. MicroRNAs, a subpopulation of regulators, are involved in breast cancer progression through regulating breast cancer stem cells. *Oncology Letters* 14: 5069-5076, 2017.

- Federica Laudisi; Fabio Cherubini; Giovanni Monteleone and Carmine Stolfi. STAT3 Interactors as Potential Therapeutic Targets for Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018,19, 1787.
- Filippo Veglia; Michela Perego and Dmitry Gabrilovich. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* . 2018 February ; 19(2): 108-119.
- Florian Schütz; Stefan Stefanovic; Luisa Mayer, et al. PD-1/PD-L1 Pathway Breast Cancer. *Oncol Res Treat* 2017; 40;294-297.
- Fokhrul Hossan; Samarpan Majumder; Deniz A. Ucar et al. Notch Signaling in Myeloid Cells as a Regulator of Tumor Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, June 2018, Volume 9, Article 1288.
- Francois- Clement Bidard; Charlotte Proudhon; Jean- Yves Pierga. Circulating tumor cells in breast cancer. *MOLECULAR ONCOLOGY* 10 (2016) 418-430.
- Freddie Bray; Jacques Ferlay; Isabelle Soerjomataram; Rebecca L. Siegel; Lindsey A. Torre; Ahmedin Jemal. Global Cancer Statistics 2018. *GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries CA: Cancer J Clin*. 2018; 68:394-424. © 2018 American Cancer Society.
- Freddy Radtke; Nicolas Fasnacht and H. Robson MacDonald. Notch Signaling in the Immune System. *Immunity* 32, January 29, 2010.
- Gaynor J. Bates; Stephen B. Fox; Cheng Han et al. Quantification of Regulatory T Cells Enables the Identification of High- Risk Breast Cancer Patients and Those at Risk of Late Relapse. *Journal of Clinical Oncology* Volume 24, Number 34, December 1 2006.
- George D. Kalliolias and Lionel B. Ivashkiv. TNF biology pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 January; 12(1): 49-62.
- Gerard M. Doherty; Leslie Boucher; Kathy Sorenson and Jennifer Lowney. Interferon Regulatory Factor Expression in Human Breast Cancer. *ANNALS OF SURGERY*. Vol.233, NO 5, 623-629.
- Gregg L. Semenza. Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Trend Mol Med*.2012 September; 18(9): 534-543.
- Guangyong Sun; Xiaojing Sun; Wei Li, et al. Critical role of OX40 in the expansion and survival of CD4 T- cell- derived double-negative T cells. *Cell Death and Disease* (2018) 9:616.

- Guojun Bu; Wenyan Lu; Chia-Chen Liu et al. Breast Cancer – derived Dickkopf 1 Inhibits Osteoblast Differentiation and Osteoprotegerin Expression: Implication for Breast Cancer Osteolytic Bone Metastases. *Int J Cancer*. 2008 September 1, 123 (5): 1034-1042.
- Haiyan Dai; Huaxi Hu; Shengjun Wang and Jie Ma. Connections between Metabolism and Epigenetic Modification in MDSCs. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 7356;.
- Hajar Yaghoobi; Hakim Azizi; Vahid Khoghi Oskooli et al. Assessment of expression of interferon γ (INF-G) gene and its antisense (IFNG-AS1) in breast cancer. *World Journal of Surgical Oncology* (2018) 16:211.
- Harold Moses and Mary Helen Barcellos- Hoff. TGF- β Biology in Mammary Development and Breast Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3:a003277.
- Helen Tower; Meagan Ruppert and Kara Britt. The Immune Microenvironment Breast Cancer Progression. *Cancers* 2019, 11, 1375.
- Hidemitsu Kitamura; Yosuke Ohno; Yujiro Toyoshima et al. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci* 108 (2017) 1947-1952.
- Hira Lal Goel and Arthur M. Mercurio. VEGF targets the tumor cell. *Nat Rev Cancer*. 2013 December; 13(12):871-882.
- Hong Zheng; Xin Liu; Jianhong Zhang, et al. Expression of PD-1 on CD4+ T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non- small cell lung cancer. *Oncotarget*, Vol.7, NO. 35
- Ignacio García-Tuñón; Mónica Ricote; Antonio Ruiz et al. Interleukin-2 and its receptor complex (α , β and γ chains) in in situ and infiltrative human breast cancer: an immunohistochemical comparative study. *Breas Cancer Res* 2004; 6: R1-R7.
- Ingunn Holen; Diane V. Lefley; Sheila E. Francis et al. IL-1 drives breast cancer growth and bone metastasis in vivo. *Oncotarget*, Vol. 7, NO46.
- J Zhan; Y Li; Q Liu et al. Wnt signaling activation and mammary gland hyperplasia in MMTV-LRP6 transgenic mice: implication for breast cancer tumorigenesis . *Oncogene* 2010 January 28; 29(4):539-549.

- Jennifer L. Hsu and Mien- Chie Hung. The Role of HER2, EGFR nad other receptor tyrosine kinases in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2016 December; 35 (4): 575-588.
- Jiafeng Shou; Zhigang Zhang; Yucheng Lai; Zhigang Chen and Jian Huang. Worse outcome in breast cancer with higher tumor infiltrating FOXP3+ Tregs: a systematic review and meta- analysis. *BMC Cancer* (2016) 16:687.
- Jiahudi Wen; Feng Ye; Xiaojia Huang et al. Prognostic Significance of Preoperative Circulating Monocyte Count in Patients With Breast Cancer. *Medicine* 94(49): e2266.
- Jiang Jian; Yanli Pang; H.Hannah Yan et al. Platelet factor 4 is produced by subsets of myeloid cells in premetastatic lung and inhibits tumor metastasis. *Oncotarget*, 2017, Vol.8, (NO17), pp:27725-27739 .
- Joan Seoane and Roger R. Gomis. TGF- β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression . *Cold Spring Harb Perspct Biol* 2017; 9: a022277.
- Joanna Magdalena Zarzynska. Two faces of TGF-Beta1 in Breast Cancer. *Mediators of Inflammation* Volume 2014, Article ID141747, 16 pages.
- Jordi Rius; Monica Guma; Christian Schachtrup et al. NF-kB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature*. 2008 June 5; 453(7196):807-811
- Jorg van Loosdregt and Paul J. Coffey. The Role of Wnt signaling in Mature T Cells: T Cell Factor Is Coming Home. *The Journal of Immunology* 2018; 201:2193-2200.
- Josee- Lyne Ethier; Danielle Desautels; Arnoud Templeton, Prakesh S. Shah and Eitan Amir. Prognostic role of neutrophil- to- lymphocyte ratio in breast cancer: a systematic review and meta- analysis. *Breast Cancer Research* (2017) 19:2.
- Joseph Markowitz. Myeloid Derived Suppressor Cells in Breast Cancer. *Breas Cancer Res Treat.* 2013 July; 140 (1): 13-21.
- Joshua P. Bates; Roshanak Derakhshandeh; Laundette Jones and Tonya J. Webb. Mechanisms of immune evasion in breast carcer. *BMC Cancer* (2018) 18:556.
- Juan Deng; Sha Zhao; Xiaoshen Zhang, et al. OX40 (CD134) and OX40 ligand, important immune checkpoints in cancer. *Oncotargets and Therapy* 2019;12 7347-7353.
- Juanita L. Merchant and Lin Ding. Hedgehog signaling links Chronic Inflammation to Gastric Cancer Precursor Lesions. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017; 3:201-210.

- Kasturi Banerjee and Haluk Resat. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *Int J Cancer*. 2016 June 1; 138(11): 2570-2578.
- Katherine Venmar Bankaitis and Barbara Fingleton. Targeting IL-4/IL-4R for the treatment of epithelial cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2015 December; 32(8): 847-856.
- Katie L. Owen; Natasha K. Brokwell and Belinda S. Parker. JAK-STAT Signaling: A Double Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers* 2019, 11, 2002.
- Kay T. Yeung and Jing Yang. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Molecular Oncology* 11 (2017) 28-39.
- Kazem Zibara; Asad Zeidan; Hassan Bjeije et al. ROS mediates interferon gamma induced phosphorylation of Scr, through the Raf/ERK pathway in MCF-7 human breast cancer cell line. *J. Cell. Commun. Signal.* (2017) 11: 57-67.
- Kellie A. Mouchemore; Robin L. Anderson and John A. Hamilton. Neutrophils, G-CSF and their contribution to breast cancer metastasis. *The FEBS Journal* 285 (2018) 665-679.
- Kiyoshi Takatsu. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B87* (2011).
- Konrad Dziobek; Marta Biedka; Tomasz Nowikilwicz et al. Analysis of Treg cell population in patients with breast cancer with respect to progesterone receptor status. *Contemp Oncol (Pozn)* 2018; 22 (4): 236-239.
- Kwuan Ho Lee; Eun Young Kim; Ji Sup Yun, et al. The prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes and hematologic parameters in patients with breast cancer. *BMC Cancer* (2018) 18:938.
- L. de la Cruz Merino; N. Palazón Carrión; F. Henao Carrasco; E. Nogales Fernández; M. Álamo-de la Gala; A. Vallejo Benítez; M. Chiesa; V. Sánchez-Margalet. New horizons in breast cancer: the promise of immunotherapy. *Clinical and Translational Oncology*.
- Laura D'Ignazio; Daniel Bandarra and Sonia Rocha. NF-κB and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS Journal* 283 (2016) 413-424.
- Laura D'Ignazio; Michael Batie and Sonia Rocha. Hypoxia and Inflammation in Cancer, Focus on HIF and NF-κB. *Biomedicines* 2017, 5, 21.

- Leisha A Emens. Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012 December ; 12(12): 1597-1611.
- Li Chen; Xiangyi Kong; Chengrui Yan; Yi Fang; Jing Wang. The Research Progress on the Prognostic Value of the Common Hematological Parameters in Peripheral Venous Blood in Breast Cancer. *Oncotargets and Therapy* 2020;13 1397-1412.
- Liang Guo; Chunmei Cao; Shyamal Goswani, et al. Tumoral PD-1hi CD8+ T cells are partially exhausted and predict favorable in outcome triple-negative breast cancer. *Clinical Science (2020)* 134 711-726.
- Lin Ding; Ramon Ocadiz-Ruiz; Juanita L. Merchant. Schlafen 4-expressing myeloid-derived suppressor cells are induced during murine gastric metaplasia. *The Journal of Clinical Investigation*,2016; 126: 2867-2880.
- López- Martín JA; De la Cruz-Merino L; Rodríguez Abreu D, et al. Cáncer y Sistema inmunológico. Bases de la inmunoterapia (Módulo 1). Transworld Editor y Génica, 2018.
- Luis de la Cruz Merino; Antonio Barco- Sánchez; Fernando Henao Carrasco; Victor Sánchez-Margalet et al. New Insights into the Role of the Immune Microenvironment in Breast Carcinoma. *Clinical and Developmental Immunology*, Volume 2013, Article ID 785317, 11 pages.
- Luis Fernando Tume Farfán. La inmunoterapia en la búsqueda de antígenos contra las células madre del cáncer. *Inmunología* 2014; 33 (3):96-109.
- M. Isabel Palacios – Arreola; Karen E. Nava- Castro; Julieta I. Castro et al. The Role of Chemokines in Breast Cancer Pathology and Its Possible Use a Therapeutic Targets. *Journal of Immunology Research* Volume 2014, Article ID849720, 8 pages.
- M. Raza Zaidi and Glenn Merlino. The Two Faces of Interferon- γ in cancer. *Clin Cancer Rev.* 2011 October 1; 17(19):6118-6124.
- M-A Forget; S Turcotte; D Beauseigle et al. The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *British Journal of Cancer* (2007) 96, 646-653.
- Madhura Joglekar-Javadekar; Steven Van Laere; Michael Bourne et al. Characterization and Targeting of Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha (PDGFRA) in Inflammatory Breast Cancer (IBC). *Neoplasia*, Volume 19, Number 7, July 2017, pp: 654-573.

- Mahnaz Janghorban; Li Xin; Jeffrey M. Rosen and Xiang H.-F. Zhang. Notch Signaling as a Regulator of the Tumor Immune Response: To Target or Not To Target?. *Frontiers in Immunology*, July 2018, Volume 9, Article 1649.
- Mansour Moghimij; Hossein Ahrar; Mojgan Karimi-Zarchi et al. Association of IL-10 rs 1800871 and rs 1800872 Polymorphisms with Breast Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 19.
- Marcelina Zabinska; Magdalena Krajewska; Katarzyna Kóscielska- Kasprzak et al. CD4+CD25+CD127- and CD4+CD25+FoxP3+ Regulatory T Cell Subsets in Mediating Autoimmune Reactivity in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (2016) 64:399-407.
- Marco Infante; Alessandra Fabi; Francesco Cognetti et al. RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling involvement in breast cancer and clinical perspectives. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2019) 38:12.
- Maria Florencia Mercogliano; Sofia Bruni; Patricia V. Elizalde and Roxana Schillaci. Tumor Necrosis Factor α Blockade: An Opportunity to Tackle Breast Cancer. *Frontiers in Oncology* April 2020, Volume 10, Article 584.
- Mark A. Travis and Dean Sheppard. TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annu Rev Immunol* 2014; 32: 51-82.
- Marta Lukaszewicz; Barbara Mnoczko; Maciej Szmikowski. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. *Pol Arch Med Wewn* 2007, 117 (5-6):247-251.
- Mary Helen Barcellos-Hoff and Kenneth BR Ewan. Transforming growth factor- β and breast cancer Mammary gland development. *Breast Cancer Res* 2000, 2:92-99.
- Maryam Hamidinia, Mehri Ghafourian Boroujerdnia; Abdolhassan Talaiezhadeh, et al. Concomitant Increase of OX40 and FOXP3 Transcripts in Peripheral Blood Patients with Breast Cancer. *Iran. J. Immunol.* March 2013, 10(1), 22-30. ISSN 1735-1383.
- Mei Zhang; Adrian V. Lee and Jeffrey M. Rosen. The Cellular Origin and Evolution of Breast Cancer . *Cold Spring Harb Perspect Med*; 7 (3).
- Michael Bartos Chek; Kristian Pietras. PDGF family funtion and prognostic value in tumor biology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503(2018)984-990.

- Michael H Kagey and Xi He. Rationale for targeting the Wnt signalling modulator Dickkopf-1 for oncology. *British Journal of Pharmacology* (2017) 174 4637-4650.
- Ming Liu; Shun Li and Ming O. Li. TGF- β Control of Adaptive Immune Tolerance: a Break from Treg Cells. *Bioessays* 2018 November ; 40(11): e1800063.
- Mingli Xu; Izuru Mizoguchi; Noriko Morishima et al. Regulation of Antitumor Immune Responses by the IL-12 Family Cytokines, IL-12, IL-23 and IL-27. *Clinical and Developmental Immunology* Volume 2010, Article ID:832454, 9 pages.
- Miranda A. Hallet; Katherine T. Venmar and Barbara Fingleton. Cytokine stimulation of epithelial cancer cells: the similar and divergent functions of IL-4 and IL-13. *Cancer Res.* 2012 December 15; 72(24): 6338-6343.
- Muhammad Haseeb; Rameez Hassan Pirzada; Qurat Ul Ain and Sangdun Choi. Wnt signaling in the Regulation of Immune Cell and Cancer Therapeutics. *Cells* 2019, 8, 1380.
- Nahida Srabovic; Zlata Mujagic; Jasminka Mujanovic-Mustedanagic et al. Interleukin 13 expression in the primary breast cancer tumor tissue. *Biochemia Medica* 2011; 21(2):131-8.
- Nianhua Ding; Juan Huang; Ningsha Li; Jiaqi Yuan; Shouman Wang and Zhi Xiao. Roles of neutrophil/lymphocyte ratio in prognosis and in differentiation of potential beneficiaries in Her2-positive breast cancer with trastuzumab therapy. *BMC Cancer* (2020) 20:235.
- Nicholas M. Clark; Leandro M. Martinez; Steven Murdock et al. Regulatory T Cells Support Breast Cancer Progression by Opposing INF- γ - Dependent Functional Reprogramming of Myeloid Cells. *Cell Reports* 33, 108482. December 8, 2020.
- Nisha Nagarsheth; Max S. Wicha and Weiping Zou. Chemokines in the microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2017 September; 17 (9); 559-572.
- Nithya Krishnamurthy and Razelle Kurzrock. Targeting the Wnt/beta-catenin Pathway in cancer: Update on Effectors and Inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2018 January; 62: 50-60.
- Pallavi Chaturvedi; Daniele M. Gilkes et al. Hypoxia-inducible-factor-dependent breast cancer-mesenchymal stem cell bidirectional signaling promotes metastasis. *J Clin Invest.* 2013; 123(1):189-205.
- Paola Grazioli, Maria Pia Felli, Isabella Screpanti and Antonio Francesco Campese. The mazy case of Notch and immunoregulatory cells. *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 102: 361-368, August

2017 .

- Paul H. Krebsbach and Luis G. Villa-Diaz. The Role of Integrin $\alpha 6$ (CD49f) in Stem Cells: More Than a Conserved Biomarker. *Stem Cells and Development*. Volume 26, Number 15, 2017.
- Priyanka Bhateja, Mathew Cherian, Sarmula Majumder and Bhuvanewari Ramaswamy. The Hedgehog Signaling Pathway: A Viable Target in Breast Cancer?. *Cancers* 2019, 11, 1126.
- Qingjun Liu; Zhongjie Sun; Ligong Chen. Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. *Protein Cell* 2020, 11 (8): 549-564.
- Rachel Eyre; Denis G. Alf  rez; Ang  lica Santiago – Gómez et al. Microenvironmental IL-1 β promotes breast cancer metastatic colonisation in the bone via activation of Wnt signalling. *Nature Communications*.
- Rafeul Alam; Konrad Pazdrak; Susan Stafford; Patricia Forsythe. The Interleukin-5/Receptor Interaction Activates Lyn and jak2 Tyrosine Kinases and Propagates Signals via the Ras-Raf-1-MAP Kinase and the Jak-STAT Pathways in Eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:226-227.
- Rajendra S. Apte; Daniel S. Chen and Napoleone Ferrara. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 176, March 7, 2019.
- Remco van Horssen; Timo L.M. Ten Hagen ; Alexander M.M. Eggermont. TNF- α in cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects and Clinical Utility. *The Oncologist* 2006, 11:397-408 .
- Renaud Sabatier; Pascal Finetti; Emilie Mamessier, et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget*, Vol.6, NO 7.
- Ricardo H. Álvarez; Valentina Guarneri; Fikri Icli et al. Bevacizumab Treatment for Advanced Breast Cancer. *The Oncologist* 2011; 16:1684-1697.
- Rith Khosla; Ashish Kumar Vyas; Nirupma Trehanpati. Dicotomy of Notch Signalling in regulating tumour immune surveillance. *Scand J Immunol*. 2019;89: e12744.
- Robert McCuaig; Fan Wu; Jenny Dunn; Sudha Rao and Jane E. Dahlstrom. The biological and clinical significance of stromal-epithelial interactions in breast cancer. *Pathology* (February 2017) 49(2), pp.133-140.
- Ryan Montler; R Bryan Bell; Collin Thalhoffer et al. OX40, PD-1 and CTLA-4 are selectively expressed on tumor- infiltrating T cells in head and neck cancer. *Clinical & Translational Immunology* (2016) 5, e70.

- Sachin Gopalkrishna Pai; Benedito A. Carneiro; Jose Mauricio Mota et al. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology & Oncology* (2017) 10:101.
- Sánchez-Margalet V; Barco- Sánchez A; Vilariño-García T, et al. Circulating regulatory T cells from breast cancer patients in response to neoadjuvant chemotherapy. *Transl Cancer Res.* 2019; 8(1):59-65.
- Sandra Grund- Gröschke; Georg Stockmaier and Fritz Aberger. Hedgehog/GLI signaling in tumor immunity new therapeutic opportunities and clinical implications. *Cell Communication and Signaling* (2019) 17:172.
- Sara H. Ross and Doreen A. Cantrell. Signaling and Function of Interleukin-2 in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2018 April 26; 36:411-433.
- Sara Jansson; Kristina Aaltonen; Pär-Ola Bendahl et al. The PDGF pathway in breast cancer is linked to tumour aggressiveness, triple- negative subtype and early recurrence. *Breast Cancer Research and Treatment* (2018) 169:231-241.
- Sasha E. Stanton and Mary L. Disis. Clinical significance of tumor- infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* (2016) 4:59.
- Savas D. Soysal; Alexandar Tzankov; Simone E. Muenst. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology* 2015; 82:142-152.
- Sébastien Gingras, Richard Moriggl; Bernard Groner and Jacques Simard. Induction of 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ 5 – Δ 4 Isomerase Type 1 Gene Transcription in Human Breast Cancer Cell Lines and Normal Mammary Epithelial Cells by Interleukin-4 and Interleukin-13. *Molecular Endocrinology* 13:66-81, 1999.
- Seisuke Kusano; Mutsuko Kukimoto-Niino; Nobumasa Hino et al. Structural basis of interleukin-5 dimer recognition by its α receptor. *PROTEIN SCIENCE* 2012 VOL 21:850-864.
- SEOM. Las cifras del cáncer en España 2018. 2018.
- SEOM. Las cifras del cáncer en España 2020. 2020.
- Shanchum Guo; Mingli Liu and Ruben R. González-Pérez. Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011 April 1815(2): 197-213.

- Sheinei J. Saleem and Daniel H. Conrad. Hematopoietic Cytokine- Induced Transcriptional Regulation and Notch Signaling as Modulators of MDSC Expansion. *Int Immunopharmacol.* 2011 July ; 11(7): 807-813.
- Sina Halvaei; Shiva Daryani; Zahra Eslami- S et al. Exosomes in Cancer Liquid Biopsy: A Focus on Breast Cancer. *Molecular Therapy: Nucleic Acids* Vol. 10 March 2018.
- Stéphane Perrier, Florence Caldefie Chézet; Marie Paule Vasson. IL-1 family in breast cancer: Potential interplay with leptin and other adipocytokines. *FEBS Letters* (2009) 259-265.
- Steven F. Josephs; Thomas E. Ichim; Stephen M. Prince. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. *J. Transl Med* (2018) 16:242.
- Sunali Y. Mehta; Brianna C. Morten; Jisha Antony et al. Regulation of the interferon-gamma (INF γ) pathway by p63 and Δ 133p53 isoform in different breast cancer subtypes. *Oncotarget*, 2018, Vol.9, (NO 49), pp:29146-29161 .
- Suryakant Niture; Xialan Dong; Elena Arthur et al. Oncogenic Role of Tumor Necrosis Factor α Induced Protein 8 (TNFAIP8). *Cells* 2019, 8,9.
- Sushil Kumar; David W. Wilkes; Nina Samuel et al. Δ p63- driven recruitment of myeloid- derived suppressor cells promotes metastasis in triple- negative breast cancer. *J Clin Invest.* 2018: 128(11):5095-5109 .
- Suzanne Ostrand- Rosenberg and Catherine Fenselau. Myeloid-derived suppressor cells: Immune suppressive cells that impair antitumor immunity and are sculpted by their environment. *J Immunol.* 2018 January 15; 200(2): 422-431.
- Swaminathan Sethu and Alirio J. Melendez. New developments on the TNF α mediated signaling pathways. *Biosci. Rep.* (2011)/31/63-76.
- Theresa L. Whiteside. Regulatory T cells subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression?. *Cancer Immunol Immunother.* 2014 January; 63(1): 67-72.
- Theresa L. Whiteside. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why?. *Semin Cancer Biol.* 2012 August; 22(4):327-334.
- Theresa L. Whiteside; Patrick Schuler and Bastian Schilling. Induced and natural regulatory T cells in human cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2012 October; 12 (10): 1383-1397.

- Tsutomu Tanaka; Toshimitsu Kajiwara; Toshihiko Torigoe et al. Cancer- Associated Oxidoreductase ERO1- α Drives the Production of Tumor- Promoting Myeloid-Derived Suppressor Cells via Oxidative Protein Folding. *J Immunol* 2015; 194:2004-2010.
- Vincenzo Bronte; Sven Brandan; Shu-Hsia Chen et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *NATURE COMMUNICATIONS* 7:12150.
- Vinit Kumar and Dmitry I Gabrilovich. Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment. *Immunology*, 143, 512-519.
- Wei Wang; Subhasree A. Nag; Ruiwen Zhang. Targeting the NF- κ B Signaling Pathway for Breast Cancer Prevention and Therapy. *Curr Med Chem*. 2015; 22(2): 264-289.
- Weihong Liu; Amy L. Putnam; Zhon Xu-yu et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells. *JEM* Vol. 203, No .7, July 10, 2006 1701-1711.
- Wenkai Sun; Jian Shang; Jianguo Zhang et al. Correlations of DKK1 with incidence and prognosis of breast cancer. *JBUON* 2019; 24(1):26-32.
- Witold Zgodzinski; Ewelina Grywalska; Krzysztof Zinkiewicz, et al. Peripheral blood T lymphocytes are downregulated by the PD-1/PD-L1 axis in advanced gastric cancer. *Arch Med Sci* 3, May 2019; 15(3):774-783.
- Wook- Jin Chae; Alfred L.M. Bothwell. Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling in Immune Cells. *Trends Immunol.* 2018 October; 39(10): 830-847.
- Yann Duchartre; Yong- Mi Kim and Michael Kahn. The Wnt signaling Pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 March; 99:141-149.
- Yifan Wang and Binhua P. Zhou. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chin J Cancer*; 2011; Vol. 30; Issue 9.
- Yingli Shang; Sinead Smith; Xiaoyu Hu. Role of Notch signaling in regulating innate immunity and inflammation in health and disease. *Protein & Cell* 2016, 7 (3): 159-174.
- Yu Fu; Qing Lin; Zhirong Zhang; Ling Zhang. Therapeutic strategies for the costimulatory molecule OX40 in T-cell-mediated immunity. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2020, 10(3):414-433.
- Yufei Wang; Anna Jia; Yujing Bi; Yuexin Wang and Guangwei Liu. Metabolic Regulation of Myeloid- Derived Suppressor Cell Function in Cancer. *Cells* 2020, 9, 1011.

- Yu-Zhang; Zi-Yan Xie; Xuan- Tong Guo, Xing-Hua Xiao and Li-Xia Xiong. Notch and breast cancer metastasis: Current knowledge, new sights and targeted therapy (Review). *Oncology Letters* 18: 2743-2755, 2019.
- Zhalen J. Amini-Vaughan; Margarita Martinez-Moczygemba and David P. Huston. Therapeutic Strategies for Harnessing Human Eosinophils in Allergic Inflammation, Hypereosinophilic Disorders and Cancer. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2012 October ; 12(5): 402-412.
- Zhila Khalkhali-Ellis; Daniel E. Abbott; Caleb M. Bailey. INF- γ Regulation of Vacuolar pH, Cathepsin D Processing and Autophagy in Mammary Epithelial Cells. *J Cell Biochem.* 2008 September 1;105(1):208-218.
- Zoran Culig. Cytokine disbalance in common human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813(2011)308-314.

Anexos

Anexo 1. Informe favorable del Comité de Ética de la Investigación (CEI).



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Informe Dictamen Favorable
Proyecto Investigación Biomédica

C.P. LCM-3NM-2015-01 - C.I.

03 de julio de 2015

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

Dr. Víctor Sánchez Margalet

Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

CERTIFICA

1º. Que el CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío en su reunión del día 30/06/2015, acta 06/2015 ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

Título: ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO

Código Promotor: LCM-3NM-2015-01 **Código Interno:**

Promotor: Investigador

Representante Legal:

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEI emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

3º. Este CEI acepta que dicho estudio sea realizado en los siguientes CEI/Centros por los Investigadores:

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y
Virgen del Rocío

Dr. Luis De la Cruz Merino
(*Oncología Médica*) Hospital Universitario Virgen
Macarena

Lo que firmo en Sevilla, a 03 de julio de 2015

Fdo: NOMBRE
SANCHEZ
MARGALET
VICTOR MANUEL
NIF 28691159Q

Firmado digitalmente por
NOMBRE SANCHEZ MARGALET
VICTOR MANUEL - NIF 28691159Q
Nombre de reconocimiento (DN):
c=es, o=FNMT, ou=firm, cn=SANCHEZ
MARGALET VICTOR
MANUEL - NIF 28691159Q
Fecha: 2015.07.03 11:49:01 +0200

Dr. Víctor Sánchez Margalet

Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

Anexo 2. Consentimiento Informado. Hoja de información al paciente.

CONSENTIMIENTO INFORMADO-INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

TÍTULO: “ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO”.

- **Participación:**

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. Su inclusión en el estudio está sujeta a los procedimientos de selección que se describen a continuación, y a otros criterios de entrada. Antes de que usted pueda formar parte en este estudio, es importante que entienda qué implica. Por favor lea detenidamente este documento y haga todas las preguntas que le puedan surgir; además, puede consultar con las personas que considere oportuno. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente.

- **Objetivo:**

El objetivo de este estudio es analizar el perfil inmunológico basal de las pacientes con debut metastásico de cáncer de mama, así como la evolución durante el tratamiento antineoplásico de primera línea. Estos datos se compararán con una cohorte de pacientes sanas que servirán de control.

Los parámetros inmunológicos a estudiar serán correlacionados con la respuesta antitumoral específica, con la intención de elaborar una puntuación inmunológica mediante la cual se pueda reconocer el eventual impacto que su sistema inmune pueda tener sobre la evolución de su enfermedad.

- **Importancia:**

Este estudio puede ayudar a conocer más y mejor su enfermedad, lo que puede ayudar a diseñar mejor los tratamientos en un futuro inmediato.

Su participación en este estudio no supone ningún beneficio directo para usted, si bien otros pacientes en el futuro podrían beneficiarse de los resultados de su colaboración.

- **Implicaciones para la paciente:**

- Su participación es totalmente voluntaria.
- Usted podrá retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Con el fin de garantizar la fiabilidad de los datos recogidos en este estudio y de dar cumplimiento a la normativa vigente, puede ser necesario que miembros del equipo investigador, Autoridades Sanitarias, o miembros del Comité Ético de Investigación Clínica tengan acceso a sus propios datos personales, comprometiéndose a la más estricta confidencialidad.
- Toda su información de carácter personal se tratará con arreglo a la Directiva 95/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de octubre de 1995, relativa a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales, a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y a su normativa de desarrollo
- La información que se solicita es necesaria para el desarrollo del estudio científico y se encontrará referida por medio de un código numérico asignado por orden de entrada en el estudio, no vinculados en ningún caso con su nombre y apellidos. Los resultados del estudio podrán ser dados a conocer a la comunidad científica a través de congresos o publicaciones, de forma que no sea posible la identificación de los participantes en el mismo. La información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.
- De acuerdo con la Ley vigente, tiene usted derecho al acceso de sus datos personales y a su rectificación, cancelación y oposición, que podrá ejercer dirigiéndose al médico que le atiende en este estudio.

- **Riesgo de la investigación para la paciente:**

- Para participar en el estudio necesitamos que nos permita obtener dos muestras de

sangre periférica que se recogerán en 2 tubos de EDTA-K3 y otras dos muestras que se recogerán en 2 tubos de suero con gel separador centrifugados para analizar una serie de determinaciones inmunológicas medidas antes , al 2º y 6º mes (o a la finalización) del tratamiento oncológico.

- Este procedimiento no supondrá ningún riesgo ni molestia para usted, ya que la extracción se hará coincidir con una venopunción prevista en las pruebas de vigilancia que su oncólogo indicará y que son las habituales para el seguimiento de su enfermedad, por lo que no será necesario realizar ningún procedimiento adicional ni exploración.
- Tampoco hay programada ninguna visita específica para este estudio, ya que se llevará a cabo coincidiendo con las visitas de vigilancia habituales de su enfermedad.
- Adicionalmente a la extracción de la muestra, se recogerán datos relativos a la evolución de su enfermedad durante los primeros tres años.

- **Información adicional:**

Su médico estará encantado de contestar cualquier pregunta adicional que usted pudiera tener.

Si las investigaciones adicionales hacen surgir nuevas circunstancias que hagan necesario obtener su consentimiento para continuar en el estudio, su médico le informará a la mayor brevedad.

Se le proporcionará una copia de esta hoja de información y de su consentimiento informado firmado, para que lo guarde.

El médico que proporciona la información es:
.....

Nombre:

Teléfono:

TITULO: “ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO”.

Yo (Nombre y Apellidos):

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al paciente).
- He podido hacer preguntas sobre el estudio “ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO”.
- He recibido suficiente información sobre el estudio “ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO”.
- He hablado con el profesional sanitario informador:
.....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- Deseo ser informado de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.
 - SI NO
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio titulado “ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO”.

Firma de la paciente
informador
(O representante legal en su caso)

Firma del profesional sanitario

Nombre y Apellidos:.....
.....

Nombre y Apellidos:

Fecha:

Fecha:

Anexo 3. Consentimiento Informado. Hoja de información al voluntario sano.

CONSENTIMIENTO INFORMADO-INFORMACIÓN VOLUNTARIO SANO

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

TÍTULO: “ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO”.

- **Participación:**
Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. Su inclusión en el estudio está sujeta a los procedimientos de selección que se describen a continuación, y a otros criterios de entrada. Antes de que usted pueda formar parte en este estudio, es importante que entienda qué implica. Por favor lea detenidamente este documento y haga todas las preguntas que le puedan surgir; además, puede consultar con las personas que considere oportuno. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente.
- **Objetivo:**
El objetivo de este estudio es analizar el perfil inmunológico basal de las pacientes con debut metastásico de cáncer de mama, así como la evolución durante el tratamiento antineoplásico de primera línea. Estos datos se compararán con una cohorte de voluntarias sanas, de la cual usted formaría parte, que servirán de control, para poder comparar la información generada por las mujeres de su grupo y el de las mujeres con cáncer de mama metastásico.
- **Importancia:**
Este estudio puede ayudar a conocer más y mejor esta enfermedad, lo que puede ayudar a

diseñar mejor los tratamientos en un futuro inmediato.

Su participación en este estudio no supone ningún beneficio directo para usted, pero las pacientes en el futuro podrían beneficiarse de los resultados de su colaboración.

- **Implicaciones para usted:**

- Su participación es totalmente voluntaria.
- Usted podrá retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones.
- Con el fin de garantizar la fiabilidad de los datos recogidos en este estudio y de dar cumplimiento a la normativa vigente, puede ser necesario que miembros del equipo investigador, Autoridades Sanitarias, o miembros del Comité Ético de Investigación Clínica tengan acceso a sus propios datos personales, comprometiéndose a la más estricta confidencialidad.
- Toda su información de carácter personal se tratará con arreglo a la Directiva 95/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de octubre de 1995, relativa a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales, a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y a su normativa de desarrollo.
- La información que se solicita es necesaria para el desarrollo del estudio científico y se encontrará referida por medio de un código numérico asignado por orden de entrada en el estudio, no vinculados en ningún caso con su nombre y apellidos. Los resultados del estudio podrán ser dados a conocer a la comunidad científica a través de congresos o publicaciones, de forma que no sea posible la identificación de los participantes en el mismo. La información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.
- De acuerdo con la Ley vigente, tiene usted derecho al acceso de sus datos personales y a su rectificación, cancelación y oposición, que podrá ejercer dirigiéndose al médico que le atiende en este estudio.

- **Riesgo de la investigación para usted:**

- Para participar en el estudio necesitamos que nos permita obtener dos muestras de sangre periférica que se recogerán en 1 tubo de EDTA-K3 y otra muestra que se recogerán en 1 tubo de suero con gel separador centrifugados para analizar una serie

de determinaciones inmunológicas.

- Este procedimiento no supondrá ningún riesgo ni molestia para usted.
- Adicionalmente a la extracción de la muestra, se recogerán datos relativos a su historia clínica, como, por ejemplo: Diabetes, Hipertensión, Enfermedad del tiroides, Cardiopatías, entre otras. Otros datos que se le pedirán son de tipo demográfico como (edad, sexo, etc).

● **Información adicional:**

El personal investigador estará encantado de contestar cualquier pregunta adicional que usted pudiera tener.

Si las investigaciones adicionales hacen surgir nuevas circunstancias que hagan necesario obtener su consentimiento para continuar en el estudio, se le informará a la mayor brevedad.

Se le proporcionará una copia de esta hoja de información y de su consentimiento informado firmado, para que lo guarde.

El médico que proporciona la información es:

.....

Nombre:

Teléfono:

TITULO: “ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO”.

Yo (Nombre y Apellidos):

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al paciente).
- He podido hacer preguntas sobre el estudio “ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO”.

- He recibido suficiente información sobre el estudio “ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO”.
- He hablado con el profesional sanitario informador :
.....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- Deseo ser informado de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.
 - SI NO
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio titulado “ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO”.

Firma de la participante
informador

Firma del profesional sanitario

Actividades científicas relacionadas

PREMIOS CONCEDIDOS

* N. Palazón Carrión, C. Jiménez Cortegana, E. Holgado, J. Cruz, JL. Alonso, **ML.Sánchez León**, et al. Myeloid-derived suppressor cells evolution in advanced breast cancer and comparative analysis with a healthy population cohort. **Primer Premio Comunicación oral 12º Simposio Internacional GEICAM**. Toledo, 29 Marzo 2019.

PUBLICACIONES

* Palazón Carrión N, Jimenez Cortegana C, **Sánchez León ML**, Henao Carrasco F, Nogales Fernandez E, Sanchez Margalet V, de la Cruz Merino.

“L. Evolution of cytotoxic and regulatory T cells in blood and in tissue after neoadjuvant treatment in breast carcinoma”. Annals of Oncology. Volume 31, Supplement 2. May 2020. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.03.150>.

* Palazón Carrión N, Jimenez Cortegana C, Holgado E, Cruz J., Alonso JL., **Sánchez León ML**, et al. “Evolution of the myeloid-derived suppressor cells in advanced breast cancer and comparative analysis with a healthy population cohort”. Journal of Clinical Oncology 37, no. 15_suppl (May 20 2019) 2543-2543. Published online May 26, 2019. doi:10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2543.

* Palazón Carrión N, **Sánchez León ML**, Jimenez Cortegana C, et al. “Myeloid derived-suppressor cells in healthy women and in advanced breast cancer patients”. Annals of Oncology. Volume 30, Supplement 3. May 2019. doi:10.1093/annonc/mdz095.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Autores: **M^aLuisa Sánchez León**, Omar Saavedra Santa Gadea, Carlos Jimenez Cortegana, Isabel Araujo Fernández, Victor Sánchez Margalet, Luis de la Cruz Merino.

Título: “Cambios inmunogénicos acontecidos en sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama metastásico en tratamiento sistémico”.

Tipo de participación: Póster

Congreso: III FORO de Inmunología Traslacional e Inmunoterapia del Cáncer (GETICA). Sevilla 9-11 de Marzo de 2017.

Autores: Isabel Araujo Fernandez, Victor Sánchez Margalet, Pedro Berraondo López, Juan José Lasarte, Carlos Jiménez Cortegana, **M^aLuisa Sánchez León**, Sara Benito Casado, Massimo Chiesa, Ana Blach Leyenda, Eva Carrasco Carrascal, Rosalía Caballero Velázquez, Lorenzo Galluzi, Federico Rojo, Luis de la Cruz Merino.

Título: Perfil de respuesta Inmune en tejido y sangre periférica de pacientes con cáncer de mama avanzado tratadas con terapia sistémica combinada del Ensayo GEICAM/2015-04 PANGEA-BREAST

Tipo de participación: Póster

Congreso: III FORO de Inmunología Traslacional e Inmunoterapia del Cáncer (GETICA). Sevilla 9-11 de Marzo de 2017.

Autores: **M^a Luisa Sánchez León**, Omar Saavedra Santa Gadea; Carlos Jimenez Cortegana; Victor Sánchez Margalet; Luis de la Cruz Merino.

Título: “Cambios inmunogénicos acontecidos en sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama metastásico en tratamiento sistémico”.

Tipo de participación: Póster

Congreso: 11^º Simposio Internacional GEICAM (Grupo Español de Investigación en cáncer de mama). Zaragoza Abril 2017

Autores: **M^aLuisa Sánchez León**, Isabel Araujo Fernández; María Candón Fernández; M^a Angustias Diaz Santos, Irene Junco Vicente; Eduardo Jesús Montilla Burgos.

Título: “Análisis del perfil de respuesta inmune en sangre periférica inducido por tratamiento sistémico en carcinoma de mama avanzado”.

Tipo de participación: Póster

Congreso: III Congreso Internacional en Contextos Clínicos y de Salud”. Almería Marzo 2017.

Autores: **M^aLuisa SánchezLeón**; Omar Saavedra Santa Gadea; Carlos Jiménez Cortegana; Isabel Araujo Fernández; Victor Sánchez Margalet, Fernando Henao Carrasco, Luis de la Cruz Merino.

Título: “Cambios inmunogénicos acontecidos en sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama metastásico en tratamiento sistémico”.

Tipo de participación: Póster

Congreso: Congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica. SEOM 24, 25, 26 y 27 de Octubre de 2017 en Madrid.

Autores: Araujo Fernández Isabel; Vallejo Benitez Ana; Rodriguez Zarco Enrique; Macias Garcia Laura; Álamo de la Gala Maria del Carmen; Virizuela Echaburu Juan Antonio; Vicente Baz David; Henao Carrasco Fernando; Garcia Manrique Teresa; **M^aLuisa Sánchez León**; Nogales Fernández Esteban; Marcos Rodriguez Jose Antonio; Rios Martín Juan José; Nieto Garcia Adoración Sánchez Margalet Victor; De la Cruz Merino Luis.

Título: “Análisis retrospectivo para evaluar el valor predictivo de los biomarcadores inmunológicos PD-L1 y TILs en pacientes tratados con anticuerpos monoclonales inmunomoduladores en la práctica asistencial”.

Tipo de participación: Póster

Congreso: IV FORO de Inmunología Traslacional e Inmunoterapia del Cáncer- FITCáncer 4. Real Fábrica de Tapices de Madrid. 8, 9 y 10 de Marzo de 2018.

Autores: Natalia Palazón Carrión, Carlos Jiménez Cortegana, Esther Holgado, Josefina Cruz, Jose Luis Alonso, **María Luisa Sánchez León**, Victor Sánchez Margalet, Esteban Nogales Fernández, Fernando Moreno, Vanesa Quiroga, Raquel Andrés, Marta Santisteban, Javier Cortés, Luz Milva Rodríguez Rodríguez, Asunción Soto, María Gión, María Adoración Nieto-García, Massimo Chiesa, Susana Bezares, Luis de la Cruz Merino.

Titulo: “Evolution of the Myeloid-derived Suppressor cells in advanced breast cancer and comparative analysis with a healthy population cohort”.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 55ª Reunión Anual de la American Society of Clinical Oncology (55th ASCO Annual Meeting). Chicago 2019.

Autores: Natalia Palazón Carrión, **María Luisa Sánchez León**, Carlos Jiménez Cortegana; Francisco J. Valdivia Garcia; Isabel Araujo Fernández; Fernando Henao Carrasco; Adoración Nieto; Victor Sánchez Margalet; Luis de la Cruz Merino.

Titulo: “ Myeloid-derived Suppressor cells in healthy women and in advanced breast cancer patients”.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: European Society for Medical Oncology (ESMO BREAST). Celebrado en Berlin (Alemania) del 2-4 de Mayo de 2019.

Autores: **MªLuisa SánchezLeón**; Natalia Palazón Carrión; Carlos Jiménez Cortegana; Francisco J. Valdivia Garcia; Isabel Araujo Fernández; Fernando Henao Carrasco; Victor Sánchez Margalet; Luis de la Cruz Merino.

Título: “Cambios inmunogénicos acontecidos en sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama metastásico en tratamiento sistémico”.

Tipo de participación: Póster

Congreso: 12º Simposio Internacional del Grupo Español de Investigación en Cáncer de mama (GEICAM). Toledo 27-29 Marzo 2019.

Autores: **M^aLuisa SánchezLeón**; Natalia Palazón Carrión; Carlos Jiménez Cortegana; Francisco J. Valdivia Garcia; Isabel Araujo Fernández; Fernando Henao Carrasco; Victor Sánchez Margalet; Luis de la Cruz Merino.

Título: “Cambios inmunogénicos acontecidos en sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama metastásico en tratamiento sistémico”.

Tipo de participación: Póster

Congreso: V Foro de Inmunología Traslacional e Inmunoterapia del Cáncer -FIT Cáncer 5. Celebrado en la Real Fábrica de Tapices de Madrid 7, 8 y 9 de Marzo de 2019.

Autores: Natalia Palazón Carrión, Carlos Jiménez Cortegana, Esther Holgado, Josefina Cruz, Jose Luis Alonso, **María Luisa Sánchez León**, Victor Sánchez Margalet, Esteban Nogales Fernández, Fernando Moreno, Vanesa Quiroga, Raquel Andrés, Marta Santisteban, Javier Cortés, Luz Milva Rodriguez Rodriguez, Asunción Soto, Maria Gión, Maria Adoración Nieto-García, Massimo Chiesa, Susana Bezares, Luis de la Cruz Merino.

Título: “ Evolución de las células supresoras derivadas de línea mieloide (MDSC) en cáncer de mama avanzado y comparativa con cohorte sana”.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: V Foro de Inmunología Traslacional e Inmunoterapia del Cáncer -FIT Cáncer 5. Celebrado en la Real Fábrica de Tapices de Madrid 7, 8 y 9 de Marzo de 2019.

Autores: **M^aLuisa SánchezLeón**; Carlos Jiménez Cortegana; Natalia Palazón Carrión; Fernando Henao Carrasco; Esteban Nogales Fernández; M. Carmen Álamo de la Gala; Victor Sánchez Margalet; Luis de la Cruz Merino.

Título: “ Evolución de los niveles de células mieloides supresoras en sangre periférica en Cáncer de Mama Avanzado y en Linfoma Difuso de células B grandes refractarios o en recaída”.

Tipo de participación: Póster

Congreso: VI Congreso de la Sociedad Andaluza de Oncología Médica (SAOM). Celebrado en Sevilla 27 y 28 de Junio de 2019.

Autores: Natalia Palazón Carrión, Carlos Jiménez Cortegana, Esther Holgado, Josefina Cruz, Jose Luis Alonso, **María Luisa Sánchez León**, Victor Sánchez Margalet, Esteban Nogales Fernández, Fernando Moreno, Vanesa Quiroga, Raquel Andrés, Marta Santisteban, Javier Cortés, Luz Milva Rodríguez Rodríguez, Asunción Soto, María Gión, María Adoración Nieto-García, Massimo Chiesa, Susana Bezares, Luis de la Cruz Merino.

Título: “ Evolución de las células supresoras derivadas de línea mieloide (MDSC) en cáncer de mama avanzado y comparativa con cohorte sana”.

Tipo de participación: Comunicación Oral.

Congreso: Congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Celebrado en Pamplona 22, 23, 24 y 25 de Octubre de 2019.

Autores: **M^aLuisa SánchezLeón**; Carlos Jiménez Cortegana; Natalia Palazón Carrión; Fernando Henaó Carrasco; Esteban Nogales Fernández; Victor Sánchez Margalet; Luis de la Cruz Merino.

Título: “Cambios observados en las poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ con expresión de biomarcadores de respuesta inmune estimuladores OX40 (CD134) e inhibidores PD-1, en cancer de mama avanzado o metastásico en tratamiento sistémico de primera línea”.

Tipo de participación: Comunicación Oral.

Congreso: VI Foro de Inmunología Traslacional e Inmunoterapia del Cáncer -FIT Cáncer 6. Celebrado en formato online, del 22 de Septiembre al 1 de Diciembre.

