

Figura 13: Amplificación de los RNAm de citocinas en tejidos sanos de mama, provenientes de pacientes de cirugía estética de la mama. La amplificación de los RNAm de IL-10, IL-2, IFN- $\gamma$  y G3PDH se llevó a cabo por RT-PCR. Las líneas 1-5 representan los tejidos sanos de mama; la línea 6, células MNP estimuladas con PHA (control positivo) y la línea 7, células MNP no estimuladas (control negativo).

### **6.2.1 Determinación del patrón Th1 o Th2 predominante en cada microambiente**

Teniendo en cuenta la expresión del RNAm de cada citocina estudiada, se analizó el patrón de citocinas predominante en cada microambiente. En el microambiente tumoral se observa una predominancia del patrón de respuesta Th2, caracterizado por la presencia de la interleucina IL-10, como citocina representativa de este patrón, esta predominancia se manifiesta en un 53% de los casos (16/30). En el microambiente de ganglios linfáticos regionales se observa contrariamente una predominancia del patrón Th1 observado en el 40% de los sujetos, a consecuencia de la expresión de IL-2 e IFN- $\gamma$ , dado en 8 y 4 pacientes respectivamente (12/30). Hay que destacar que en el microambiente tumoral no se observó expresión de IFN- $\gamma$  (Tabla 4).

La intensidad con que se expresa el factor supresor en el microambiente tumoral es la misma con que se expresa el factor activador en el microambiente sano (ganglios linfáticos no metastáticos) ya que la diferencia es de 6 sujetos en cada caso: 16 que expresan IL-10 contra 10 que expresan IL-2 en los tumores (citocinas que representan las respuestas Th2/Th1 en este microambiente) y en el caso de los ganglios tendríamos que 6 casos expresan IL-10 mientras que 8 sujetos expresan IL-2 y 4 expresan IFN- $\gamma$ , lo que representarían, en estos últimos casos, un total de 12 sujetos mostrando una respuesta Th1, por lo tanto en el microambiente sano también se obtuvo una diferencia Th2/Th1 de 6 sujetos al igual que en el caso de los tumores.

Tabla 4. Expresión de Citocinas en microambiente Tumoral y Sano.

Expresión de Citocinas	Microambiente Tumoral Frecuencia (%)	Microambiente de ganglios linfáticos Frecuencia (%)
<b>• Patrón Th1</b>		
IL-2 (-) & IFN- $\gamma$ (-)	20 (66.7%)	18 (60.0%)
IL-2 (+) & IFN- $\gamma$ (-)	10 (33.3%)	8 (26.7%)
IL-2 (+) & IFN- $\gamma$ (+)		4 (13.3%)
<b>• Patrón Th2</b>		
IL-10 (-)	14 (46.7%)	24 (80.0%)
IL-10 (+)	16 (53.3%)	6 (20.0%)

Del total de pacientes incluidas en nuestro estudio, 13 no expresan ningún patrón Th1/Th2 en el tumor y 16 no expresan ningún patrón en sus ganglios. De estos grupos, 7 (23.3%) sujetos resultaron negativos a la expresión de algún patrón ya sea en ganglios o en tumores, la mayoría de estas pacientes son de etapa I (5/7) y 9 sujetos, expresaron un patrón en sus tumores, pero no en sus ganglios, este último grupo de pacientes pertenecen a la etapa II (tabla 5). El hecho de que las pacientes en etapa II presentaran algún patrón de citocinas en su microambiente tumoral, pudiera ser indicativo de la presencia de una respuesta inmune con el desarrollo de la neoplasia, aún en etapas tempranas, por la expresión de IL-2 en 6 de ellas; pero este patrón también se caracterizó por la expresión de RNAm de IL-10 en 8 de estas pacientes; lo cual implica una predominancia de un factor supresor de la respuesta inmune local en este grupo.

**Tabla 5: Distribución de las pacientes que no expresan patrón de citocinas en ganglios o en tumores**

Expresión de algún patrón Th1 o Th2 en tumor	Expresión de algún patrón Th1 o Th2 en ganglio		
	No	Si	Total
No	7	6	13
Si	9	8	17
Total	16	14	30

### **6.2.2 Relación entre IL-2 e IL-10 dentro del mismo microambiente**

Al estudiar dentro de cada microambiente la relación entre la presencia de IL-2 e IL-10 (tablas 6 y 7), se observa que:

En el caso del microambiente tumoral se tiene una asociación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre la presencia o no de IL-10 e IL-2. De los 14 sujetos que no expresan IL-10, 13 (93%) tampoco expresan IL-2 y de los 16 sujetos que expresan IL-10, 9 (56%) también expresan IL-2. Se observa una concordancia en el 73% de los casos para la expresión de ambas citocinas, este porcentaje se refiere al total de sujetos que expresan las dos citocinas a la vez (13/30) y los que no las expresan (9/30).

En el microambiente de los ganglios linfáticos no metastáticos, si bien no se observa una relación estadísticamente significativa entre la presencia de ambas citocinas, el comportamiento resulta similar al observado en los tumores de las pacientes. Un 66% (16/24) de los sujetos que no expresan IL-10 tampoco expresa IL-2 e igual porcentaje se tiene al analizar los casos que sí expresan IL-10 y que también expresan IL-2 (4/6).

Tabla 6. Relación entre las citocinas IL-2 e IL-10 en el microambiente tumoral.

IL-10 en Tumor	IL-2 en Tumor		
	Neg	Pos	Total
Neg	13	1	14
Pos	7	9	16
Total	20	10	30

Tabla 7. Relación entre las citocinas IL-2 e IL-10 en Ganglios No Metastáticos.

IL-10 en Ganglios	IL-2 en Ganglios		
	Neg	Pos	Total
Neg	16	8	24
Pos	2	4	6
Total	18	12	30

Se tiene un porcentaje ligeramente más elevado, con relación a la coincidencia de expresión entre ambas citocinas en el microambiente tumoral (66%), que en el microambiente de los ganglios linfáticos no metastáticos (56%). Esto pudiera estar dado porque en el caso de los tumores la producción de citocinas es heterogénea en las diferentes zonas del tumor dado por la distribución de los linfocitos asociados al tumor y los linfocitos infiltrantes y en el caso de los ganglios, a pesar de ser ganglios no metastáticos ("sanos"), se trata de individuos que padecen cáncer de mama y por lo tanto sus ganglios están relacionados con la enfermedad por el tránsito de linfocitos de una región a la otra. No obstante, en los dos microambientes es más predominante la situación en la que ambas citocinas son negativas.

Es importante señalar que el IFN- $\gamma$  no se analiza en su interacción con otras citocinas porque resultó negativo en los tumores y solo 4 pacientes lo

expresaron en sus ganglios axilares y resulta insuficiente ese número de pacientes para hacer un análisis estadístico.

### 6.2.3 Relación entre microambientes en cuanto a IL-10 e IL-2

Tabla 8. Relación entre Microambientes para la misma citocina.

Microambiente Tumoral	IL-10 Tumor	Microambiente Sano			
		IL-10 Ganglios			
		Neg	Pos	Total	
	Neg	13	1	14	
	Pos	11	5	16	
	Total	24	6	30	
	IL-2 Tumor	IL-2 Ganglios			
		Neg	Pos	Total	
		Neg	10	10	20
		Pos	8	2	10
Total		18	12	30	

Al estudiar la relación de la presencia de IL-2 y de IL-10 entre microambientes (tabla 8), se tiene que:

En el caso de la IL-10, se observó que el 93% (13/14) de los pacientes que no expresan IL-10 en el microambiente tumoral tampoco la expresan en el microambiente de los ganglios, mientras que, el 69% (11/16) de los pacientes que expresan IL-10 en el tumor dejan de expresarla en los ganglios linfáticos regionales no metastáticos, no obstante, hay un 31% (5/16) que la continúa expresando en este microambiente, de los cuales, 4 no expresan IL-2 en el tumor.

Al analizar la expresión de IL-2, se observó que, de la totalidad de sujetos que no expresan la IL-2 en microambiente tumoral, un 50% (10/20) sí la expresa en

el microambiente de los ganglios linfáticos regionales no metastáticos; en este grupo de pacientes el 40% expresa IL-10 en los tumores y también el 40% expresa IL-10 en sus ganglios, el 75% coincide en la expresión de IL-10 en los dos microambientes, un 30% de este grupo expresa IFN- $\gamma$  en sus ganglios y estos coinciden en el 100% con la expresión de IL-10 en los tumores.

La otra mitad de las pacientes que no expresan IL-2 en sus tumores, no expresan IL-2 en sus ganglios, en este grupo ningún paciente expresó IFN- $\gamma$  en sus ganglios y solo 1 de ellos expresó IL-10 en este microambiente y el 30% expresó IL-10 en los tumores, esto nos sugiere que aunque en estas pacientes no se observa una respuesta activadora en sus dos microambientes, tampoco hay una elevada frecuencia de respuesta supresora en ambos sitios anatómicos.

El 80% (8/10) de los sujetos que sí expresaban la IL-2 en el microambiente tumoral dejan de expresarla en microambiente de los ganglios linfáticos no metastáticos. De este grupo, el 87% (7/8) son de etapa II e igual porcentaje corresponden a carcinoma ductal infiltrante; solo un paciente de etapa I, expresa IL-10 en su ganglios axilares; en ningún caso hubo expresión de IFN- $\gamma$  en ganglios; es importante señalar que el 87% porcentaje expresa IL-10 en los tumores. Tres de estos sujetos presentaron invertida, la proporción CD4/CD8 en sangre periférica.

#### **6.2.4 Relación de la expresión de citocinas en el microambiente tumoral y en ganglios linfáticos con la presencia de ganglios metastáticos en las pacientes**

La relación entre la presencia de las diferentes citocinas estudiadas en microambiente tumoral y la presencia de ganglios metastáticos, según la clasificación TNM (N1); se muestra en la tabla 9. De los 7 sujetos que presentan metástasis en ganglios, 5 (71%) expresan IL-10 y 3 (43%) expresan IL-2, en microambiente tumoral.

Tabla 9. Relación entre la expresión de citocinas en microambiente tumoral y la presencia de metástasis en ganglios.

Ganglios Metastáticos (TNM)	Citocinas en Microambiente Tumoral								
	IL-10			IL-2			IFN- $\gamma$		
	Neg	Pos	Total	Neg	Pos	Total	Neg	Pos	Total
N0	12	10	22	15	7	22	22		22
N1	2	5	7	4	3	7	7		7
Nx		1	1	1		1	1		1
Total	14	16	30	20	10	30	30		30

La relación entre la presencia de las diferentes citocinas estudiadas en microambiente de los ganglios axilares y la presencia de ganglios metastáticos, según la clasificación TNM (N1); se muestra en la tabla 10. De los 7 sujetos que presentan metástasis en ganglios, 1 expresa IL-10, 4 expresan IL-2 y 3 expresan IFN- $\gamma$  en ganglios no metastáticos. La citocina que con más frecuencia se expresa en el microambiente ganglionar de los sujetos que no presentan metastasis en ganglios (Clasificación N0 o Nx) es la IL-2 (8/23 sujetos: 35%).

Tabla 10. Relación entre la expresión de citocinas en ganglios linfáticos y la presencia de metástasis en ganglios.

Ganglios Metastáticos (TNM)	Citocinas en Ganglios No Metastáticos								
	IL-10			IL-2			IFN- $\gamma$		
	Neg	Pos	Total	Neg	Pos	Total	Neg	Pos	Total
N0	18	4	22	15	7	22	22	0	22
N1	6	1	7	3	4	7	4	3	7
Nx	0	1	1	0	1	1	0	1	1
Total	24	6	30	18	12	30	26	4	30



### **6.3 Expresión de proteínas relacionadas con la activación de las células T en el microambiente tumoral y en ganglios linfáticos regionales**

La expresión de proteínas relacionadas con la activación de las células T, se determinó, mediante la técnica de Western Blot, específicamente de las cadenas CD3- $\zeta$  y CD3- $\epsilon$ , las cuales forman parte de la molécula CD3 y se asocia no covalentemente con el TCR. La importancia de las cadenas CD3- $\zeta$  y CD3- $\epsilon$ , radica en dos razones fundamentales: en primer lugar, la síntesis de estas dos cadenas es imprescindible para la formación del receptor y su expresión en la superficie celular y en segundo lugar, después del reconocimiento del antígeno son los primeros sustratos que se fosforilan y desencadenan la cascada de eventos intracelulares que conducen finalmente a la activación de las células T. Una deficiencia en alguna de ellas provocaría una deficiencia tanto en el reconocimiento del antígeno como en el mecanismo de activación de las células T y por lo tanto se afectaría la capacidad de desarrollar una respuesta atitumoral específica.

Del total de sujetos que integran nuestro estudio el 33% (10/30) no expresó la cadena CD3- $\zeta$  en su microambiente tumoral, en cambio el 90% (27/30) la expresó en sus ganglios linfáticos. Fue más marcada la deficiencia de la cadena CD3- $\epsilon$  en el microambiente tumoral, debido a que el 53% (16/30) de los pacientes no la expresaron, en cambio el 83% (25/30) de los sujetos la expresó en sus ganglios linfáticos no metastáticos. La expresión de las cadenas CD3- $\epsilon$  y CD3- $\zeta$  se resume en la tabla 11.

La figura 14 (A y B) muestra la expresión de las cadenas  $\zeta$  y  $\epsilon$ , en el microambiente del tumor y en los ganglios linfáticos regionales en un grupo de las pacientes estudiadas. A las muestras de tumor se les determinó la expresión del marcador de células T: CD2 (figura 14 C), como el objetivo de tener el control, de que realmente estábamos trabajando con linfocitos provenientes del microambiente tumoral. La detección del control de actina resultó exitosa en

todas las muestras de tejido analizadas, en la figura 14 (D) se observa un ejemplo de las muestras de tumor analizadas; en el estudio se efectuó el análisis para todas las muestras, tanto del tumor como de los ganglios. Los tejidos sanos de mama, que fueron analizados no expresaron ninguna de las dos cadenas de CD3 estudiadas (figura 15).

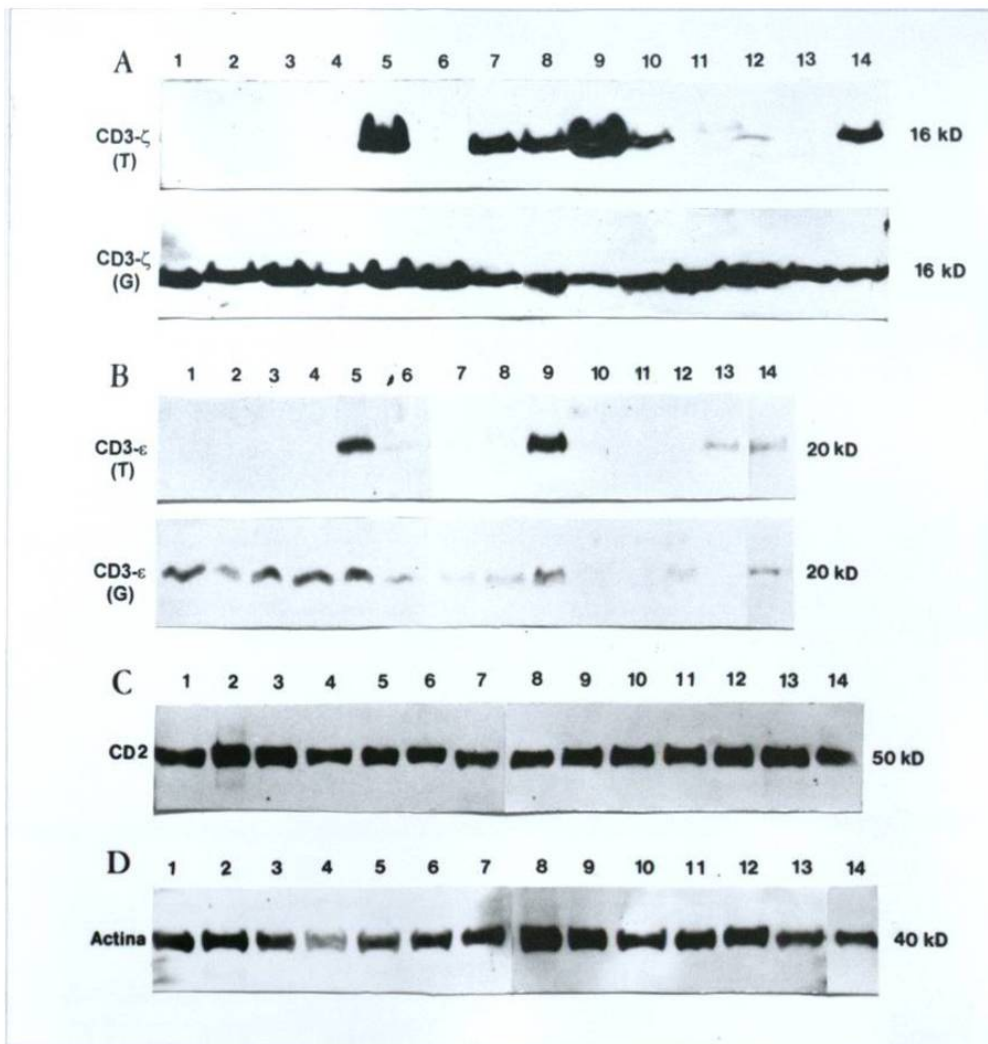


Figura 14: Expresión de las proteínas de activación linfocitaria CD3- $\zeta$  y CD3- $\epsilon$  en el microambiente tumoral y en ganglios linfáticos no metastáticos de pacientes con cáncer de mama, determinada por Wester Blot, se usaron 20  $\mu$ g de proteína por línea. Las líneas 1-13 representan los pacientes 21-34, la línea 14 representa el control de células MNP estimuladas con PHA. A: Expresión de la cadena  $\zeta$  en los tumores (T) y en los ganglios (G), B: Expresión de la cadena  $\epsilon$  en los tumores (T) y en los ganglios (G), C: Expresión del marcador linfocitario CD2 en las muestras de tumor, D: Expresión del control de actina en las muestras de tumor.

Tabla 11: Expresión de los polipéptidos de CD3 ( $\epsilon$  y  $\zeta$ ) en las pacientes con cáncer de mama.

Código	CD3 $\epsilon$ (T)	CD3 $\epsilon$ (G)	CD3 $\zeta$ (T)	CD3 $\zeta$ (G)
1	+	+	+	+
4	-	+	+	+
5	+	+	+	+
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
12	+	+	+	+
13	-	+	-	+
14	-	+	+	-
15	-	+	-	+
16	+	+	-	+
17	+	+	+	+
18	+	+	+	+
19	+	-	+	-
20	-	+	+	+
21	-	+	-	+
22	-	+	-	+
24	-	+	-	+
25	-	+	-	+
26	+	+	+	+
27	-	+	-	+
28	-	+	+	+
29	-	+	+	+
30	+	+	+	+
31	-	-	+	+
32	-	-	-	+
33	-	+	+	+
34	+	-	-	+
36	+	+	+	+
37	+	-	+	+

(T) muestras de tumor

(G) muestras de ganglios linfáticos regionales no metastáticos

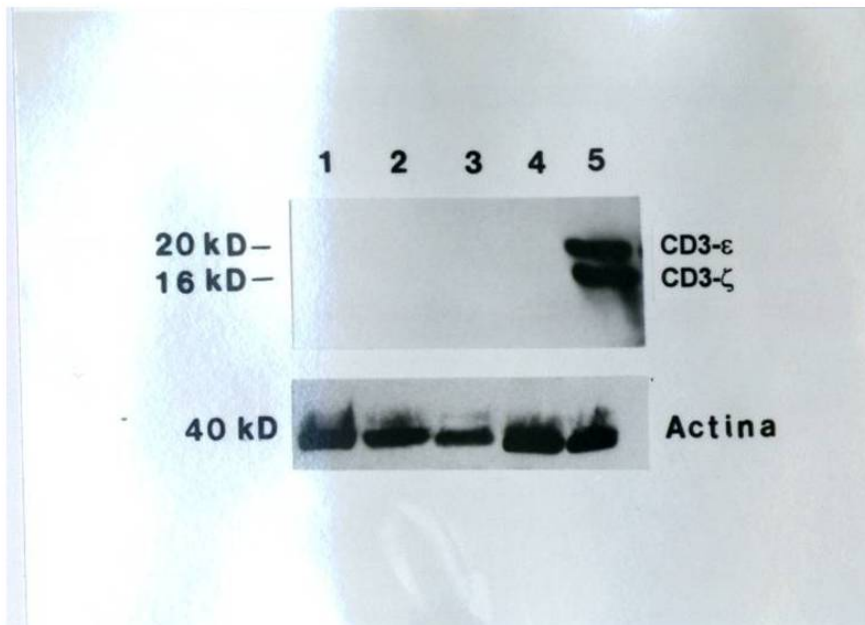


Figura 15: Expresión de las proteínas de activación linfocitaria CD3- $\zeta$  y CD3- $\epsilon$  en muestras de tejido sano de mama, determinada por Wester Blot, se usaron 20  $\mu$ g de proteína por línea. Las líneas 1-4 representan los tejidos sanos 1-4, la línea 5 representa el control de células MNP estimuladas con PHA. Se muestra el control de actina para cada línea.

### 6.3.1 Determinación de la relación de CD3- $\zeta$ y CD3- $\epsilon$ con IL-10

#### En el microambiente del tumor:

Se estudió la relación entre los polipéptidos de CD3 ( $\zeta$  y  $\epsilon$ ) y la expresión del RNAm de IL-10 en el microambiente tumoral. No se observó asociación estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) entre ninguna de las dos cadenas de CD3 e IL-10 (RNAm) en el microambiente tumoral (tabla 12).

Tabla 12: Relación de CD3- $\zeta$  y CD3- $\epsilon$  con la expresión del RNAm de IL-10 en las muestras de tumor.

IL-10 (T) (RNAm)	CD3- $\zeta$ (T)		
	Neg	Pos	Total
Neg	6	8	14
Pos	4	12	16
Total	10	20	30
IL-10 (T) (RNAm)	CD3- $\epsilon$ (T)		
	Neg	Pos	Total
Neg	8	6	14
Pos	8	8	16
Total	16	14	30

Sin embargo, al estudiar la asociación de ambas cadenas con la expresión directa de la proteína IL-10 en las muestras de tumor, se observa una asociación estadísticamente significativa entre CD3- $\zeta$  y la presencia de IL-10 en el tejido tumoral ( $p < 0.05$ ): cuando IL-10 en el tejido es negativo, se tiene también CD3- $\zeta$  negativo y cuando IL-10 en el tejido es positivo se tiene que el 63% de la población es positivo (17 sujetos) a CD3- $\zeta$  (tabla 13A). Entre estos dos parámetros existe una elevada coincidencia de expresión, de 26 sujetos en los que se hicieron las mediciones, hay 20 sujetos (77%) en los que coinciden los resultados obtenidos: 4 expresan las dos proteínas a la vez y 16 dejaron de expresarlas. Al medir la relación de CD3- $\epsilon$  e IL-10 en el tejido tumoral, no se encontró significación estadística entre esos parámetros (tabla 13B).

Tabla 13: Relación de CD3- $\zeta$  y CD3- $\epsilon$  con IL-10 (medida por inmunohistoquímica) en el tejido tumoral.

**A**

IL-10 Tejido	CD3- $\zeta$ (T)		
	Neg	Pos	Total
Neg	4	0	4
Pos	6	17	23
Total	10	17	27

**B**

IL-10 Tejido	CD3- $\epsilon$ (T)		
	Neg	Pos	Total
Neg	4	0	4
Pos	11	12	23
Total	15	12	27

**En el microambiente de ganglios linfáticos regionales:**

Al estudiar la asociación entre las cadenas de CD3 ( $\zeta$  y  $\epsilon$ ) y la expresión del RNAm de IL-10 en los ganglios linfáticos regionales, no observamos una asociación estadísticamente significativa entre la IL-10 y CD3- $\epsilon$ , ni tampoco entre IL-10 y CD3- $\zeta$  (en ambos casos  $p > 0.05$ ). No obstante, tenemos que para el total de pacientes negativas (24/30) a IL-10 en los ganglios, la mayoría de las pacientes resultaron positivas a ambas cadenas, el 87% de las pacientes en ambos casos (21/24) (tabla 14 A y B). Estos resultados resultan contrarios a los obtenidos en el microambiente tumoral, pensamos que se deba a la influencia de diferentes factores regulatorios en cada microambiente.

Tabla 14: Asociación de la expresión de CD3- $\zeta$  y CD3- $\epsilon$  con el RNAm de IL-10 en los ganglios linfáticos regionales

**A**

IL10_G (RNAm)	CD3- $\zeta$ Ganglio		
	Neg	Pos	Total
Neg	3	21	24
Pos	0	6	6
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>27</b>	<b>30</b>

**B**

IL10_G (RNAm)	CD3- $\epsilon$ Ganglio		
	Neg	Pos	Total
Neg	3	21	24
Pos	2	4	6
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>30</b>

### 6.3.2 Relación de la cadena CD3- $\zeta$ con los patrones Th1 y Th2, en tumor y en ganglio linfáticos regionales

Teniendo en cuenta los resultados anteriores procedimos a determinar la asociación entre la cadena CD3- $\zeta$  y la presencia de un patrón de citocinas Th1 y Th2 en los tumores y en los ganglios linfáticos no metastáticos de las pacientes (tabla 15 A y B). Observamos que no existe una relación estadísticamente significativa entre CD3- $\zeta$  y los patrones Th1 y Th2 ( $p > 0.05$ ). No obstante, el comportamiento que se observa es inverso para el caso del patrón Th1 en los dos microambientes: de 20 casos que expresan CD3- $\zeta$ , 13 no expresan un patrón Th1 en el caso de los tumores y de 27 casos que expresan CD3- $\zeta$  en los ganglios linfáticos, 17 no expresan un patrón Th1. La asociación de CD3- $\zeta$  y el patrón Th2 en los tumores es directa pero tampoco resultó ser estadísticamente significativa: de los 20 casos que expresan CD3- $\zeta$ , 12 expresaron un patrón Th2; mientras que en los ganglios linfáticos ocurre lo contrario: de los 27 casos que expresaron CD3- $\zeta$ , 21 no expresaron un patrón Th2, observándose una relación inversa entre un patrón Th2 y la cadena CD3- $\zeta$  en los ganglios linfáticos. En los ganglios se observó que para el total de casos que expresan la cadena CD3- $\zeta$ , la mayoría no expresa ninguno de los dos patrones de citocinas. Estos resultados coinciden con la asociación que se

presenta entre CD3- $\zeta$  e IL-10 (citocina Th2), lo cual nos confirmaría la posible influencia de diferentes factores regulatorios en cada microambiente.

Tabla 15: Relación de la expresión de CD3- $\zeta$  con la presencia de un patrón Th1 y Th2.

**A**

CD3- $\zeta$ (T)	Patrón Th1 (T)			Patrón Th2 (T)		
	NO	SI	Total	NO	SI	Total
Neg	7	3	10	6	4	10
Pos	13	7	20	8	12	20
<b>Total</b>	20	10	30	14	16	30

**B**

CD3- $\zeta$ (G)	Patrón Th1 (G)			Patrón Th2 (G)		
	NO	SI	Total	NO	SI	Total
Neg	1	2	3	3	0	3
Pos	17	10	27	21	6	27
<b>Total</b>	18	12	30	24	6	30

### 6.3.3 Asociación de las diferentes formas de expresión de la cadena CD3- $\zeta$ con la expresión de IL-10

La cadena CD3- $\zeta$  en las muestras de tumor y en los ganglios de algunas pacientes se expresó en sus cuatro formas: monómero, monómero fosforilado, dímero, y dímero fosforilado, los pesos moleculares de cada una de ellas son: 16, 21, 32 y 42 kD respectivamente (tabla 16). Las formas fosforiladas muestran una condición de activación en esas muestras, ya que la fosforilación de la cadena CD3- $\zeta$  es uno de los primeros fenómenos que se producen en la activación de las células T después del reconocimiento antigénico. La figura 16 muestra algunas pacientes representativas que expresaron las diferentes formas en que se puede presentar la cadena CD3- $\zeta$ .



Tabla 16: Expresión de las diferentes formas de CD3- $\zeta$  en el tumor y en los ganglio linfáticos regionales no metastáticos de las pacientes

Código	TUMOR				GANGLIOS			
	M	M-f	D	D-f	M	M-f	D	D-f
1			+	+	+	+	+	+
4			+	+			+	+
5			+	+			+	
7			+	+				
8			+	+	+		+	+
9			+	+			+	+
12			+	+			+	+
13							+	+
14			+	+				
15					+	+	+	+
16						+	+	
17			+	+	+	+	+	+
18			+	+		+	+	
19			+	+				
20			+	+	+	+	+	+
21					+			
22					+			
24					+			
25					+			
26	+				+			
27					+			
28	+				+			
29	+				+			
30	+				+			
31	+				+			
32					+			
33	+				+			
34					+			
36			+	+	+	+	+	+
37			+	+	+	+	+	+

M: Monómero de CD3- $\zeta$ , M-f: Monómero fosforilado de CD3- $\zeta$ , D: Dímero de CD3- $\zeta$ ,

D-F: Dímero fosforilado de CD3- $\zeta$

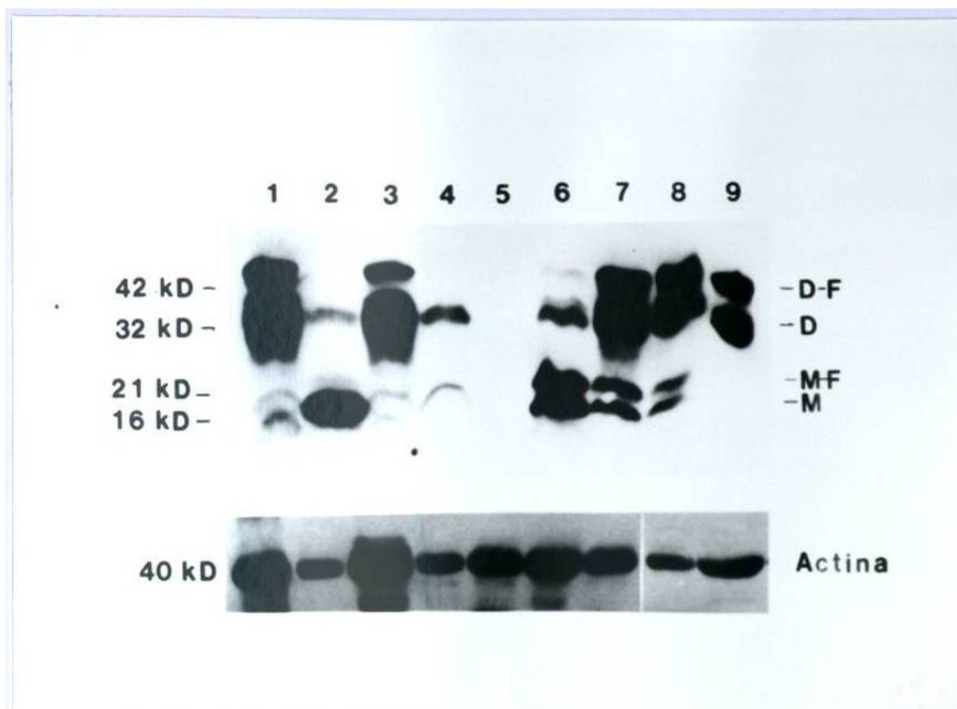


Figura 16: Expresión de las diferentes formas de la cadena  $\zeta$  en muestras de ganglios linfáticos no metastáticos de pacientes con cáncer de mama, determinada por Western Blot, se usaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína por línea. Las líneas 1-6, representan los pacientes 1-6, las líneas 7 y 8, los pacientes 36 y 37 y la línea 9, células MNP estimuladas con ConA. Se muestra el control de actina para cada línea.

### En el microambiente tumoral:

Se determinó la asociación de las formas fosforiladas de CD3- $\zeta$ , en el microambiente tumoral, con la expresión del RNAm de IL-10 y con la proteína IL-10 determinada por inmunohistoquímica, la forma fosforilada del dímero fue la única que se encontró en los tumores de las pacientes. No se observó

asociación estadísticamente significativa en ninguno de los dos casos ( $p > 0.05$ ) (tabla 17 A y B).

Tabla 17: Relación entre el dímero fosforilado de CD3- $\zeta$  con la expresión de IL-10 en los tumores

**A**

IL-10 (RNAm)	Forma D-F de CD3- $\zeta$ Tumor		
	Neg	Pos	Total
Neg	9	5	14
Pos	7	9	16
Total	16	14	30

**B**

IL-10 (Tejido)	Forma D-F de CD3- $\zeta$ Tumor		
	Neg	Pos	Total
Neg	4	0	4
Pos	12	11	23
Total	16	11	27

#### En los ganglios linfáticos regionales:

En el caso de los ganglios linfáticos regionales se observó en algunas pacientes expresión de las formas monomérica y diméricas fosforiladas de la cadena CD3- $\zeta$  y aunque no obtuvimos asociación estadística con la expresión del RNAm de IL-10, si se pudo observar que de los 8 pacientes que expresaron la forma monomérica, 6 no expresaron IL-10 y en el caso del dímero fosforilado, de los 11 pacientes que lo expresaron, 9 resultaron negativos a IL-10 (tabla 18).

**Tabla 18: Relación de las formas fosforiladas de CD3- $\zeta$  con la expresión de IL-10 en los ganglios linfáticos**

IL-10 (G)	Forma M-F de CD3- $\zeta$ (G)		
	Neg	Pos	Total
Neg	18	6	24
Pos	4	2	6
Total	22	8	30

IL-10 (G)	Forma D-F de CD3- $\zeta$ (G)		
	Neg	Pos	Total
Neg	15	9	24
Pos	4	2	6
Total	19	11	30

#### **6.3.4 Asociación de la expresión de CD3- $\epsilon$ y CD3- $\zeta$ en las muestras de tumor, con el estado del marcador linfocitario CD3 en sangre periférica**

Se determinó si existía alguna asociación de la expresión de las cadenas CD3- $\epsilon$  y CD3- $\zeta$ , en las muestras de tumor, con el estado del marcador linfocitario CD3 en sangre periférica, en las pacientes que lo mostraron por debajo del rango de referencia (tabla 19 A y B). Este análisis se realiza teniendo en cuenta que la presencia de ambas cadenas es importante para la expresión del complejo TCR/CD3 en la superficie celular de los linfocitos T y una deficiencia de ellas pudiera implicar una disminución en la expresión de CD3. Aunque no estamos analizando estos parámetros en el mismo sitio anatómico, si nos pudiera sugerir, si la disminución en el marcador linfocitario CD3 guarda alguna relación con deficiencias en la expresión de los polipeptidos del CD3 ( $\zeta$  y  $\epsilon$ ) encontrados en estas pacientes.

Tabla 19: Asociación de la expresión de las cadenas CD3-ε y CD3-ζ, en las muestras de tumor con el estado del marcador linfocitario CD3

**A**

CD3 en sangre bajo	CD3-ζ		
	Neg	Pos	Total
NO	6	13	19
SI	4	7	11
<b>Total</b>	10	20	30

**B**

CD3 en sangre bajo	CD3-ε		
	Neg	Pos	Total
NO	9	10	19
SI	7	4	11
<b>Total</b>	16	14	30

En ninguno de los dos casos se observó asociación estadísticamente significativa entre el hecho de tener los niveles de CD3 en sangre periférica por debajo de los valores de referencia y la expresión de CD3-ε y CD3-ζ ( $p > 0.05$  en ambos casos). Sin embargo, de los sujetos que tienen CD3 por debajo de los niveles normales, el 73% (8/11) expresaron deficiencia, al menos, en una de las dos cadenas de CD3 y se observó que la mayoría de estos sujetos (64%) resultó negativo para CD3-ε.

#### 6.4 Marcadores tumorales

Se determinaron por inmunohistoquímica los marcadores tumorales: RE, Her2, p53, Bcl<sub>2</sub>, Bax y la interleucina IL-10. Estos parámetros se determinaron en una totalidad de 27 pacientes excepto para Bax, que se pudo determinar en 26 casos. Se clasificaron en cuatro grupos según el porcentaje de células marcadas: 1+ para <25%; 2+ de 25-50%; 3+ de 50-75% y 4+ de 75% hasta más del 90%. Esta clasificación de la inmunotinción se llevó a cabo por igual para todos los marcadores, exceptuando a Her-2 para el cual se siguieron las recomendaciones del fabricante. En la tabla 20 se resume la expresión de los marcadores tumorales analizados.

Tabla 20: Expresión de los marcadores tumorales e IL-10 en las muestras de tumor

<b>CÓDIGO</b>	<b>RE</b>	<b>BAX</b>	<b>HER2</b>	<b>p53</b>	<b>IL-10</b>	<b>Bcl-2</b>
1	No útil	No útil	No útil	No útil	No útil	No útil
4	0	No útil	0	1+	4+	0
5	0	2+	0	0	4+	3+
7	No útil	No útil	No útil	No útil	No útil	No útil
8	2+	4+	0	0	4+	4+
9	No útil	No útil	No útil	No útil	No útil	No útil
12	4+	3+	0	0	4+	3+
13	4+	4+	0	0	4+	3+
14	4+	4+	1+	3+	4+	3+
15	2+	0	0	0	0	3+
16	0	4+	0	4+	4+	0
17	0	4+	0	4+	4+	0
18	4+	4+	3+	0	4+	4+
19	4+	4+	2+	0	4+	4+
20	4+	4+	3+	0	3+	4+
21	0	0	0	0	0	2+
22	0	4+	0	0	4+	1+
24	0	4+	2+	0	4+	4+
25	0	3+	3+	4+	0	0
26	3+	4+	1+	0	3+	4+
27	3+	3+	3+	0	4+	4+
28	0	4+	3+	0	4+	3+
29	3+	3+	0	0	4+	2+
30	4+	4+	1+	0	4+	4+
31	0	3+	2+	0	4+	3+
32	4+	3+	0	3+	0	3+
33	0	4+	3+	4+	4+	2+
34	0	4+	2+	4+	4+	0
36	0	4+	3+	0	4+	0
37	4+	3+	0	0	4+	4+

La clasificación de la tinción de los diferentes marcadores se realizó según se describe en la sección de Resultados

La tinción de L-10 resultó heterogénea, pero fundamentalmente se observó un marcaje citoplasmático, en las células epiteliales tumorales de la mama y en los linfocitos infiltrantes, solo en algunos casos se obtuvo un marcaje nuclear, sugerimos que pudiera ser debido a la presencia de una proteína homóloga a la IL-10 proveniente del virus Epstein-Barr. En el 85% (23/27) de las pacientes se observó la presencia de la proteína IL-10 en el tejido tumoral. La figura 17 muestra un ejemplo de la tinción de IL-10 en el tejido tumoral de cuatro pacientes representativas

El patrón de tinción inmunohistoquímica de Bcl2 y Bax mostró características de localización celular citoplasmática en las células de cáncer de mama. En algunas células tumorales se observó una intensificación de la tinción perinuclear en el caso de Bcl2. Los linfocitos infiltrantes de tumor resultaron positivos para ambos marcadores. Bax resultó positivo en el 92.3% de los casos (24/26) y Bcl2 en el 77.8% (21/27). Las figuras 18 y 19 muestran la tinción de los marcadores Bax y Bcl-2, respectivamente, en cuatro pacientes representativas.

La inmunorreactividad observada en el caso del receptor de estrógeno y p53 fue en el núcleo de las células epiteliales tumorales de la mama. p53 resultó positiva en el 29.6% (8/27) de los sujetos y en el caso del receptor de estrógenos fue en el 51.8% (14/27) de los casos. En las figuras 20 y 21 se observan la tinción de p53 y RE, respectivamente, en cuatro pacientes representativas para cada marcador.

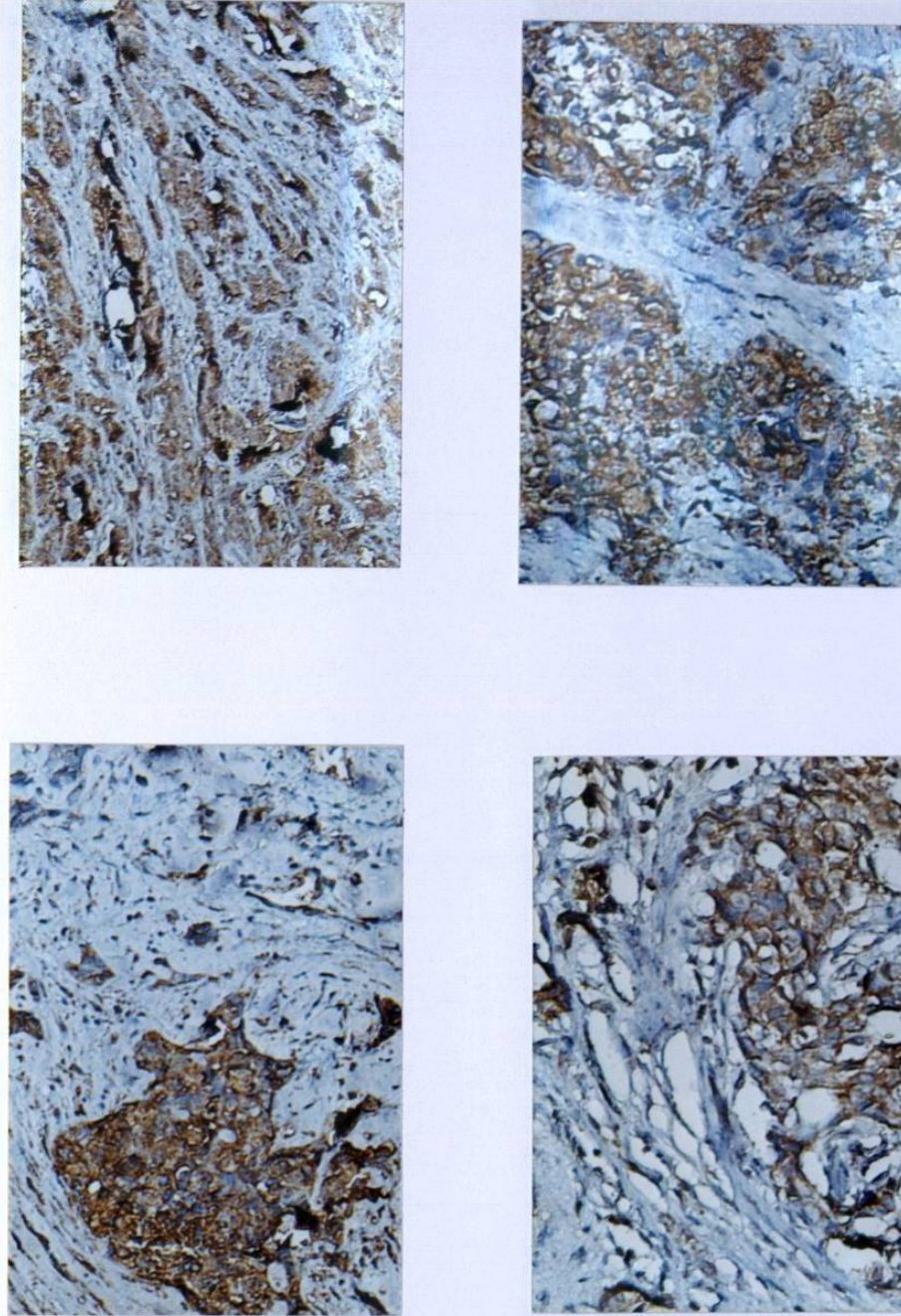


Figura 17: Expresión de IL-10 en cuatro pacientes representativos. La detección del marcador se realizó por inmunohistoquímica a partir de fragmentos de muestras de tumor embebidos en parafina siguiendo la metodología que se describe en materiales y métodos.



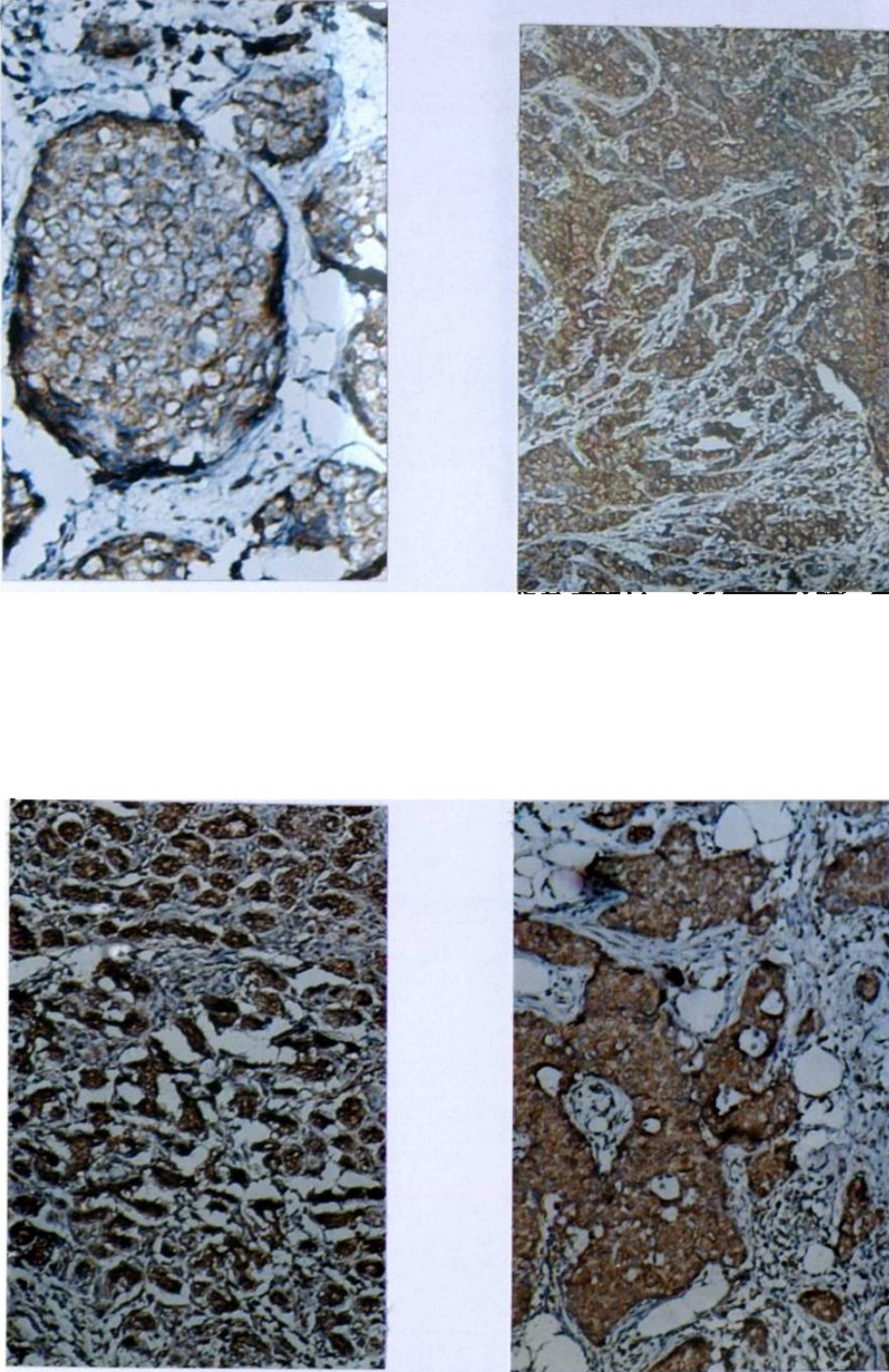


Figura 18: Expresión de Bax en cuatro pacientes representativos. La detección del marcador se realizó por inmunohistoquímica a partir de fragmentos de muestras de tumor embebidos en parafina siguiendo la metodología que se describe en materiales y métodos.



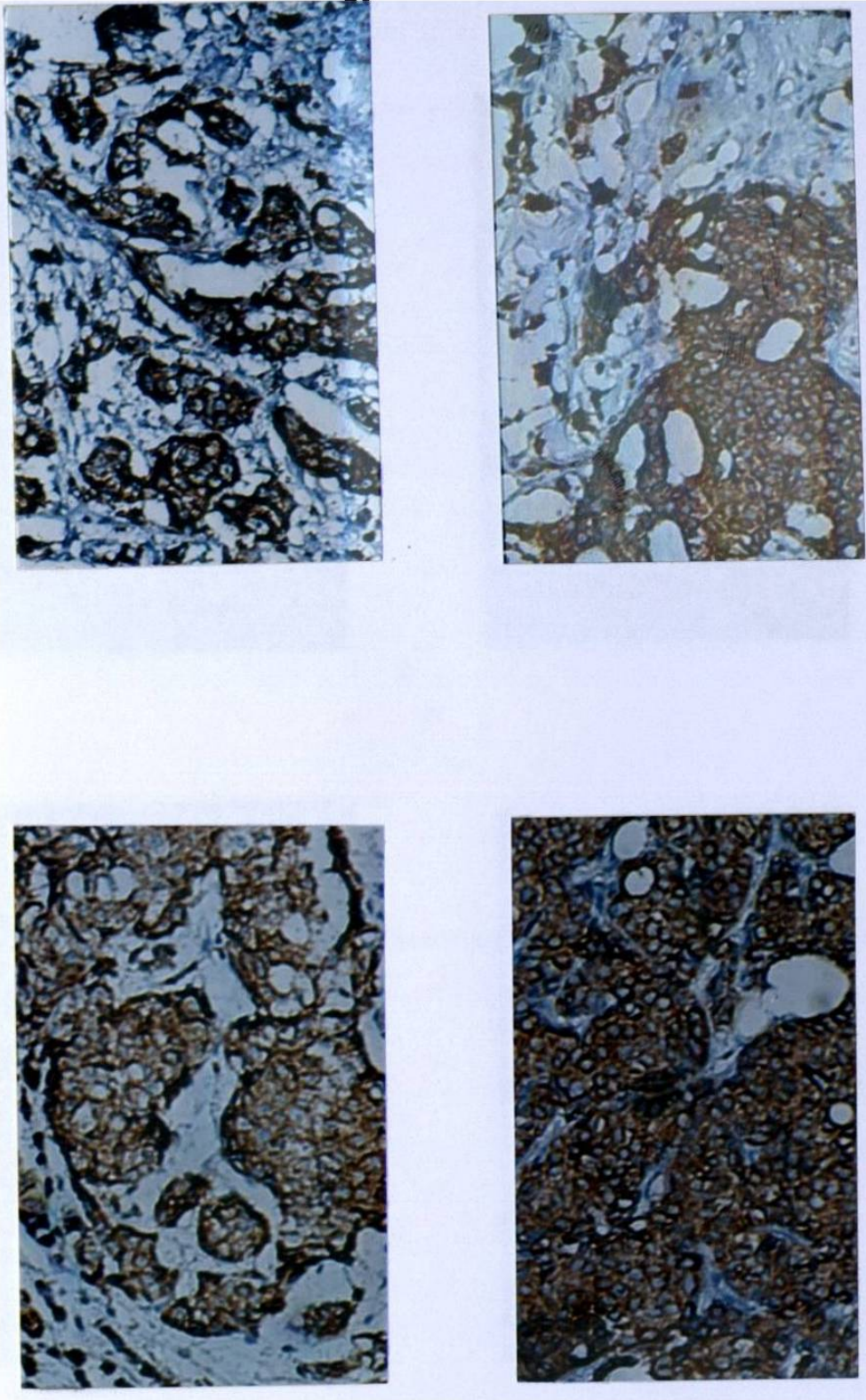


Figura 19: Expresión de Bcl-2 en cuatro pacientes representativos. La detección del marcador se realizó por inmunohistoquímica a partir de fragmentos de muestras de tumor embebidos en parafina siguiendo la metodología que se describe en materiales y métodos.



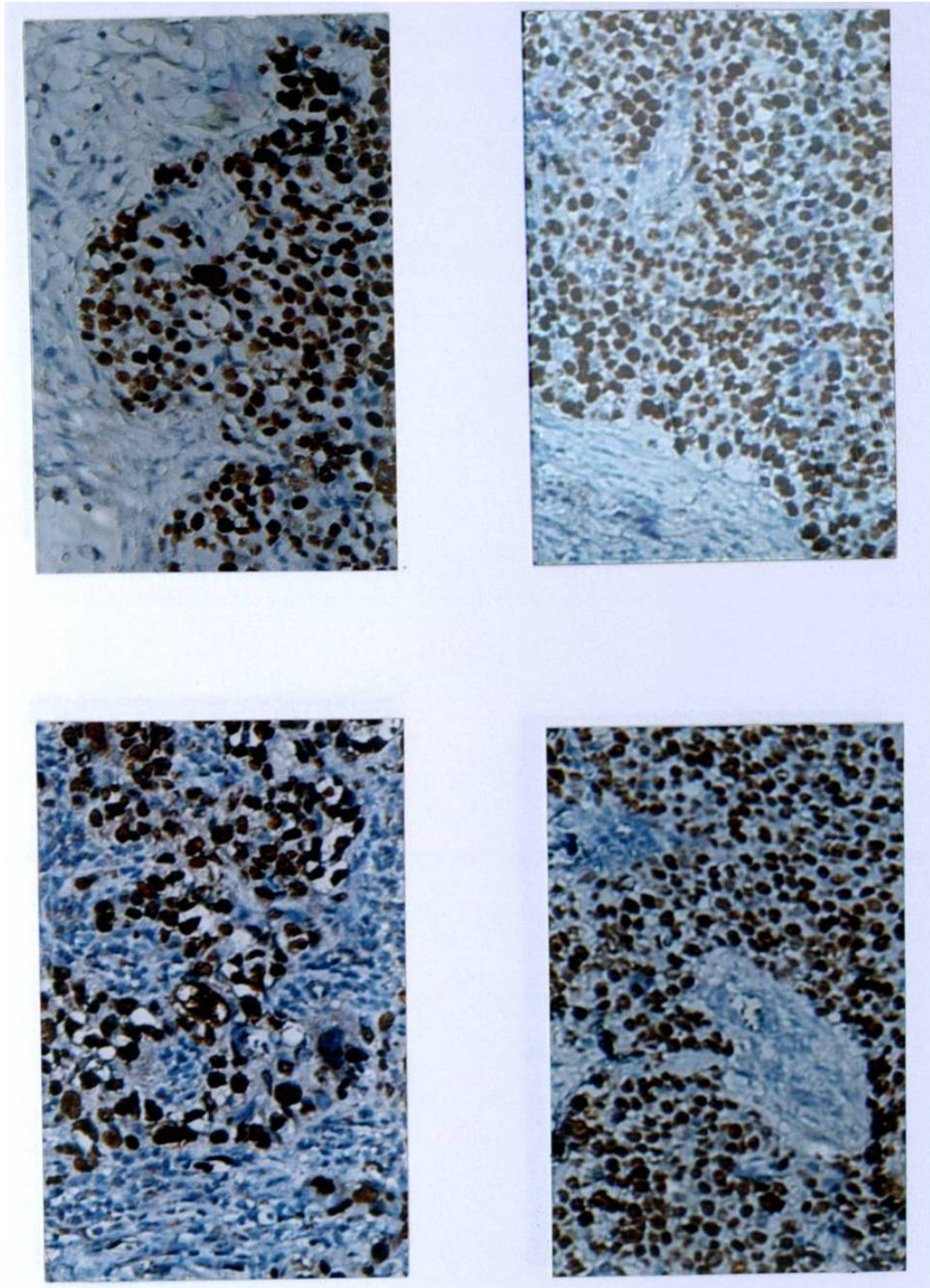


Figura 20: Expresión de p53 en cuatro pacientes representativos. La detección del marcador se realizó por inmunohistoquímica a partir de fragmentos de muestras de tumor embebidos en parafina siguiendo la metodología que se describe en materiales y métodos.



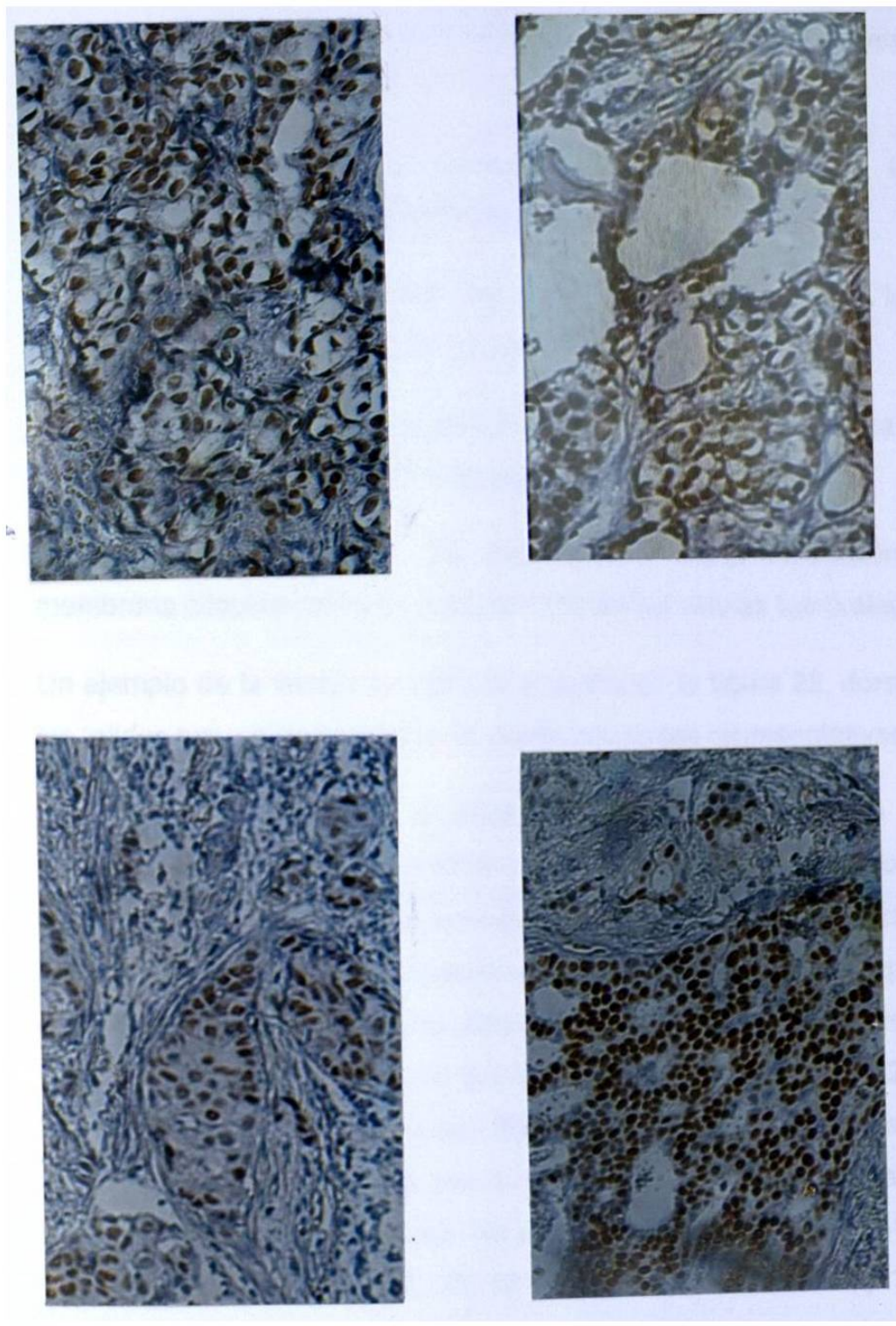


Figura 21: Expresión del receptor de estrógenos en cuatro pacientes representativos. La detección del marcador se realizó por inmunohistoquímica a partir de fragmentos de muestras de tumor embebidos en parafina siguiendo la metodología que se describe en materiales y métodos.

En el caso de Her2 el marcaje se obtuvo en el 51.8% (14/27) de los casos, se observó un marcaje de membrana el cual se clasificó según el porcentaje de células marcadas y las características de la tinción de la membrana, así tenemos que:

Negativo (0): Ausencia de coloración en toda o parte de la membrana citoplasmática en menos del 10% de las células tumorales.

Negativo (1+): Fina barrera de coloración en parte de la membrana citoplasmática en más del 10% de las células.

Ligeramente positivo (2+): De leve a moderada coloración en toda la membrana citoplasmática en más del 10% de las células tumorales.

Fuertemente positivo (3+): De moderada a fuerte coloración en toda la membrana citoplasmática en más del 10% de las células tumorales.

Un ejemplo de la tinción de Her2 se muestra en la figura 22, donde se observan los tejidos tumorales marcados de cuatro pacientes representativas.

La relación entre IL-10 en el tejido tumoral y los marcadores tumorales se muestra en la tabla 21. Al analizar IL-10 en su interacción con los marcadores estudiados, se observó una asociación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre IL-10 y Bax; de los 22 sujetos que marcan IL-10 y para los que fue posible tener el marcaje con Bax, este último resultó ser también positivo en todos los casos. La relación de IL-10 con Bcl-2 también fue directa, de los 23 sujetos que marcan IL-10, 18 (78%) marcan Bcl-2. Sin embargo, en el caso de p53, se observó una relación inversa con IL-10, de los 23 sujetos que marcan IL-10, 17 (74%) resultan negativos a p53. No se observa relación entre IL-10 y el RE; de los 23 sujetos que marcan IL-10, 12 resultaron positivos a RE y 11 negativos y tampoco se observó relación entre IL-10 y Her2, ya que de los 23 casos positivos a IL-10, 13 fueron positivos a Her2 y 10 negativos.



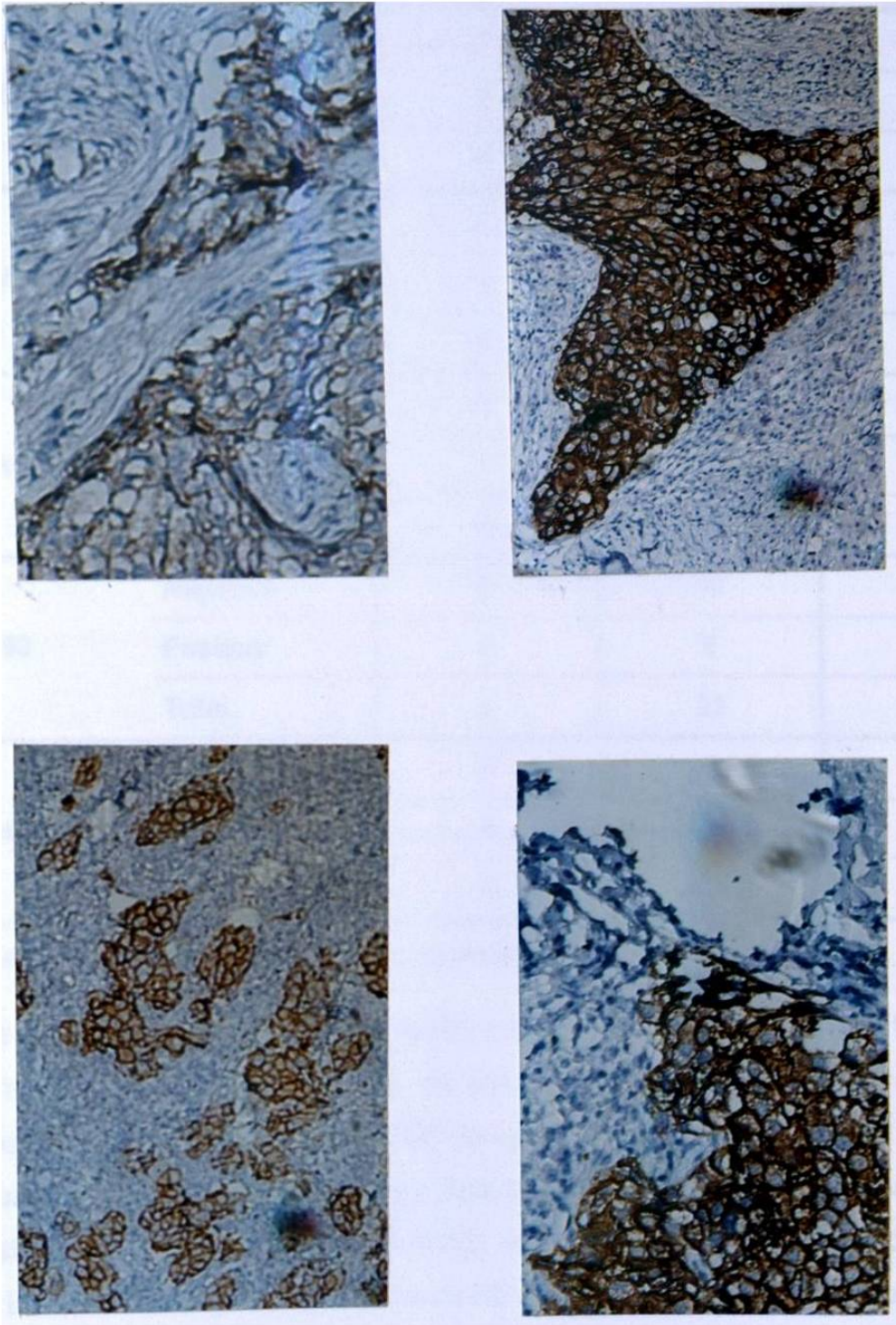


Figura 22: Expresión de Her2 en cuatro pacientes representativos. La detección del marcador se realizó por inmunohistoquímica a partir de fragmentos de muestras de tumor embebidos en parafina siguiendo la metodología que se describe en materiales y métodos.

Tabla 21: Relación entre IL-10 en el tejido tumoral y los marcadores tumorales

Marcador	IL-10		TOTAL	
	Negativo	Positivo		
RE	Negativo	2	11	13
	Positivo	2	12	14
	Total	4	23	27
BAX	Negativo	2	0	2
	Positivo	2	22	24
	Total	4	22	26
Her/2	Negativo	3	10	13
	Positivo	1	13	14
	Total	4	23	27
P53	Negativo	2	17	19
	Positivo	2	6	8
	Total	4	23	27
BCL2	Negativo	1	5	6
	Positivo	3	18	21
	Total	4	23	27

Los resultados expresan el número de pacientes

Se analizó la interacción entre el RE y el resto de los marcadores. La relación entre el RE y Bax fue directa, de los 14 pacientes que expresaron RE, 13 expresaron Bax; la relación de RE con p53 resultó inversa, de los 14 positivos para RE, 12 resultaron negativos para p53 y con Bcl-2 se obtuvo una relación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), de los 14 RE<sup>+</sup>, resultaron todos positivos a Bcl-2. En el caso de la relación de RE con Her2 no se comportó como ha sido descrita en la literatura, en nuestro trabajo, de los 14 casos que marcan RE solo la mitad marcó positiva a Her2.

Al analizar la interacción entre p53 y algunos de los marcadores, tenemos por ejemplo, que se obtuvo una relación inversa, pero no significativa entre p53 y Her2, de los 14 casos que fueron positivos para Her2, solo 4 lo fueron para p53. Entre p53 y Bcl-2 se obtuvo una asociación inversa estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) observándose que de los 19 sujetos que fueron negativos para p53, 18 (94.7%) sí marcaron para Bcl-2, mientras que la asociación entre Bax y p53 también resultó inversa pero no estadísticamente significativa, teniendo que de los 24 sujetos que marcan positivos a Bax, hay 17 que marcan p53 negativo.

La relación que se obtuvo entre Bax y Bcl-2 fue directa pero no estadísticamente significativa, debido a que de las 24 pacientes que fueron positivas para Bax, 19 también fueron positivas para Bcl-2.

#### **6.4.1 Relación entre la expresión de algunos marcadores tumorales con el resto de los parámetros inmunológicos estudiados en las pacientes con cáncer de mama**

Tres de las pacientes que presentaron la proporción CD4/CD8 invertida coincidieron en la expresión de los marcadores: Bax, Bcl-2, Her-2 y todos expresaron IL-10 en su tejido tumoral

El grupo de pacientes que no expresan RNAm de IL-10 en el microambiente tumoral y que tampoco lo expresan en el microambiente de los ganglios presentó una elevada expresión de los marcadores Bax y Bcl-2. Por otra parte, las pacientes que no expresan RNAm de IL-2 en sus tumores y que tampoco expresan IL-2 en sus ganglios, presentaron una elevada expresión de Bax, Bcl-2 y Her-2 en sus tumores, además de una alta expresión de la proteína IL-10 determinada por inmunohistoquímica.

Se determinó la asociación de las cadenas CD3- $\zeta$  y CD3- $\epsilon$  con los marcadores tumorales debido a que como la deficiencia de estas cadenas implica una deficiencia en la respuesta inmunológica queríamos conocer si algunos de los marcadores tumorales pronóstico se encontraba asociado con una deficiencia en



Al analizar la interacción entre p53 y algunos de los marcadores, tenemos por ejemplo, que se obtuvo una relación inversa, pero no significativa entre p53 y Her2, de los 14 casos que fueron positivos para Her2, solo 4 lo fueron para p53. Entre p53 y Bcl-2 se obtuvo una asociación inversa estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) observándose que de los 19 sujetos que fueron negativos para p53, 18 (94.7%) sí marcaron para Bcl-2, mientras que la asociación entre Bax y p53 también resultó inversa pero no estadísticamente significativa, teniendo que de los 24 sujetos que marcan positivos a Bax, hay 17 que marcan p53 negativo.

La relación que se obtuvo entre Bax y Bcl-2 fue directa pero no estadísticamente significativa, debido a que de las 24 pacientes que fueron positivas para Bax, 19 también fueron positivas para Bcl-2.

#### **6.4.1 Relación entre la expresión de algunos marcadores tumorales con el resto de los parámetros inmunológicos estudiados en las pacientes con cáncer de mama**

Tres de las pacientes que presentaron la proporción CD4/CD8 invertida coincidieron en la expresión de los marcadores: Bax, Bcl-2, Her-2 y todos expresaron IL-10 en su tejido tumoral

El grupo de pacientes que no expresan RNAm de IL-10 en el microambiente tumoral y que tampoco lo expresan en el microambiente de los ganglios presentó una elevada expresión de los marcadores Bax y Bcl-2. Por otra parte, las pacientes que no expresan RNAm de IL-2 en sus tumores y que tampoco expresan IL-2 en sus ganglios, presentaron una elevada expresión de Bax, Bcl-2 y Her-2 en sus tumores, además de una alta expresión de la proteína IL-10 determinada por inmunohistoquímica.

Se determinó la asociación de las cadenas CD3- $\zeta$  y CD3- $\epsilon$  con los marcadores tumorales debido a que como la deficiencia de estas cadenas implica una deficiencia en la respuesta inmunológica queríamos conocer si algunos de los marcadores tumorales pronóstico se encontraba asociado con una deficiencia en

los polipéptidos a nivel local. No se observó asociación estadísticamente significativa entre CD3- $\zeta$  y CD3- $\epsilon$  con los marcadores tumorales ( $p > 0.05$ ). No obstante, en el caso del marcador Bcl-2, se observó que cuando este es positivo (20 sujetos), la mayoría de los sujetos (13/20= 65%) resultan negativos a CD3- $\epsilon$ ; mientras que para CD3- $\zeta$  un porcentaje análogo resultan positivos.

De nuestros resultados se observa que las pacientes que tienen alguna deficiencia en los parámetros inmunológicos estudiados presentan una elevada expresión de los marcadores Bcl-2, Bax y Her2, excepto en el caso de la cadena  $\zeta$  y Bcl-2, lo cual pudiera estar relacionado con la regulación del mecanismo de apoptosis a nivel local.

### **6.5 Estimación de la supervivencia, el intervalo libre de enfermedad y posibles factores pronóstico**

**Supervivencia:** En la serie estudiada la supervivencia a los dos años resultó de un 92%, o sea, la probabilidad de sobrevivir a los dos años es de 0.92. En general este valor debe ir disminuyendo a medida que pasa el tiempo, pero en el caso de este estudio el seguimiento es corto, debido a que no es un estudio de supervivencia y el análisis que se hace es solo descriptivo.

De la totalidad de las pacientes (30 sujetos) una falleció y las restantes se encontraban vivas al término del seguimiento. La mediana del tiempo de seguimiento resultó ser de 2.20 años, es decir, alrededor de 24 meses.

**Intervalo Libre de Enfermedad:** El Intervalo Libre de Enfermedad (ILE) es el tiempo que media entre la fecha en la que el paciente se declara en remisión completa y la fecha de recaída, si es que esta ocurre. En este estudio podemos hablar de remisión completa dado que a los pacientes se les extirpa el tumor, por lo tanto a la fecha de la cirugía, las pacientes deben declararse en remisión completa. El ILE se calcula entre la fecha de la cirugía y la fecha de recaída (si recae) o la fecha de última noticia (si no recae). En la muestra estudiada recayeron cuatro pacientes, pero para el análisis de la curva del ILE se ha

excluido uno de ellos debido a que no tenemos información de la fecha en que entró en remisión completa. Se estima un Intervalo Libre de Enfermedad al año del 96%, a los dos años del 92% y a los tres años del 82%. El gráfico de la curva para el ILE puede verse en la figura 23. La mediana para el ILE resultó ser de 1.96 años, o sea, alrededor de 27 meses.

**Factores Pronóstico:** Se realizó un análisis univariado utilizando el método de Kaplan Meier y la prueba de LogRank para identificar diferentes factores pronóstico de tipo inmunológico. Fueron consideradas en este análisis las interleucinas, los marcadores tumorales y la proporción invertida CD4/CD8. Se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) para el caso del marcador p53, la curva que describe el ILE de los sujetos que marcan p53 es diferente de la que describe el ILE de los sujetos que no marcan. El ILE es mayor para los sujetos que no marcaron p53 (figura 24).

Para ningún otro factor se observó una diferencia estadísticamente significativa. Aunque es importante señalar que en el caso del análisis de la proporción CD4/CD8 (figura 25), los pacientes que la tienen invertida tienen un ILE menor que el resto. En el caso de la presencia de IL-10 en los tejidos tumorales, los pacientes que tienen expresión de la citocina IL-10 tienen una ILE menor que los que no la tienen (figura 26).

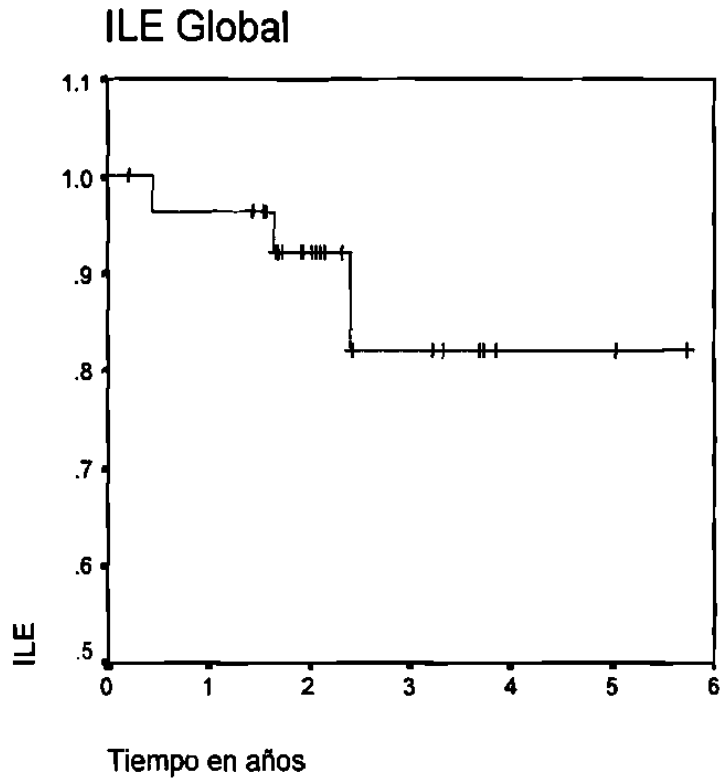


Figura 23: Gráfico de ILE Global

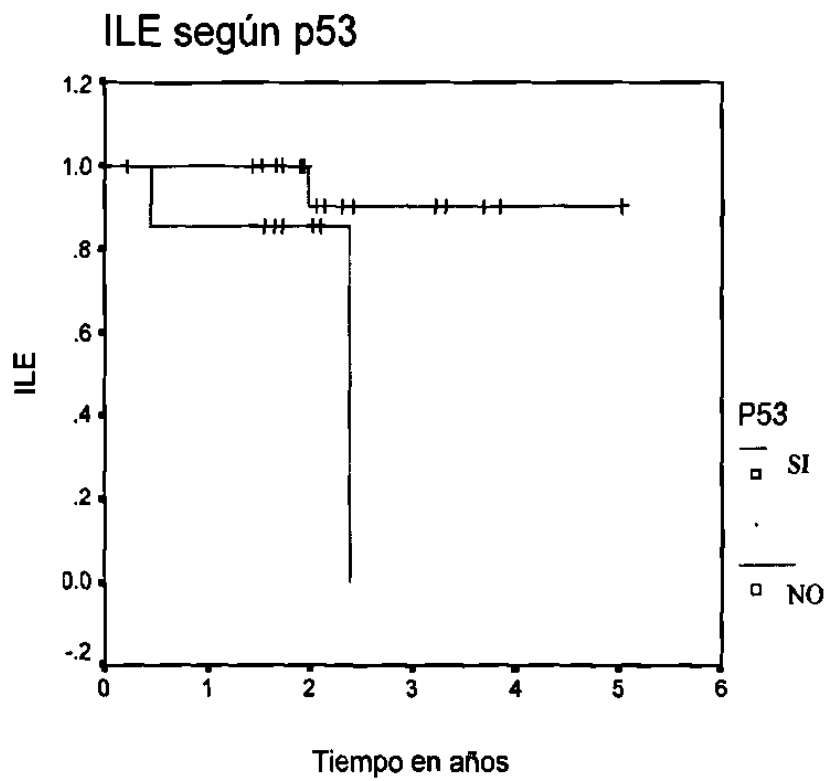


Figura 24: Gráfico de ILE según la expresión de p53 en los tejidos tumorales.

### ILE según razón CD4/CD8 invertida

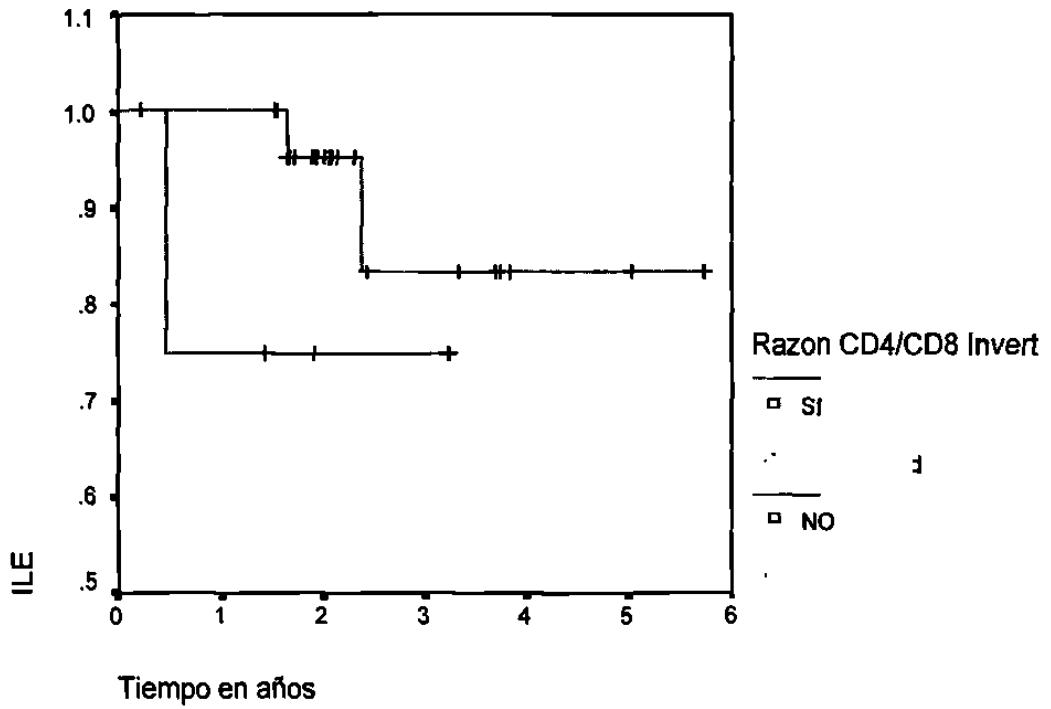


Figura 25: Gráfico de ILE según la proporción CD4/CD8 invertida.

### ILE según IL10 en tejido

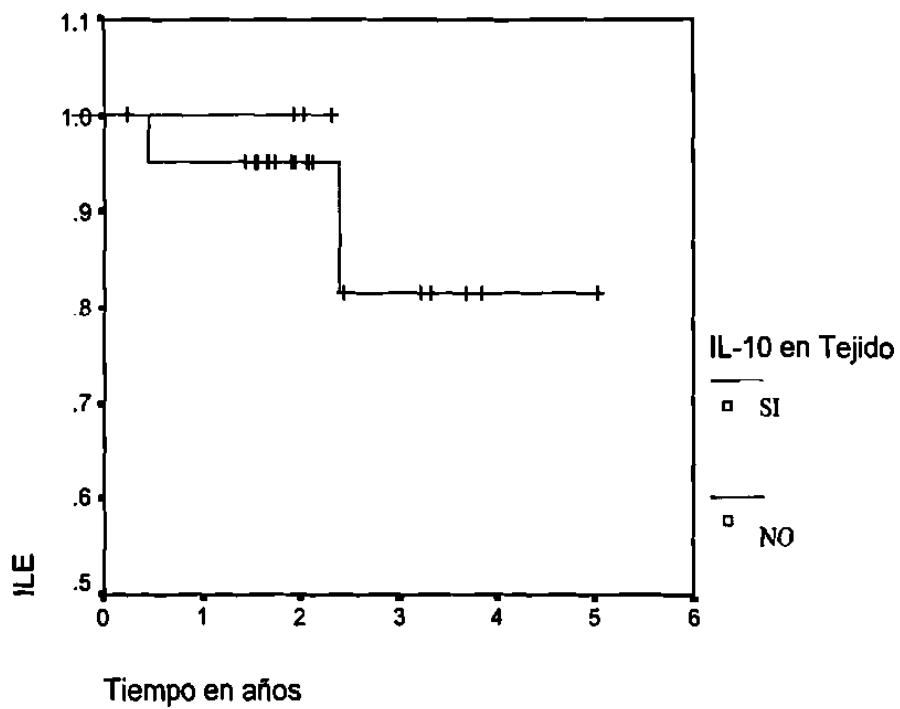


Figura 26: Gráfico de ILE según la expresión de IL-10 en los tejidos tumorales.

## 7. DISCUSIÓN

El estado inmune de los pacientes con cáncer es de crucial importancia, en muchos casos se pueden encontrar inmunosuprimidos, ya sea como resultado de la enfermedad o de tratamientos previos. Los pacientes incluidos en este estudio no presentaban tratamientos oncológicos previos. Cuando se analizó la expresión fenotípica de algunos marcadores de activación linfocitaria, no se observaron graves alteraciones en la población de células T. Aunque aproximadamente el 50% de los pacientes se encontraban fuera de su rango de referencia, para los 3 marcadores, estas variaciones no resultaron muy alejadas de los valores normales, los cuales habían sido calculados en un rango cerrado como la media del por ciento de células positivas de una población de 50 sujetos +/- una desviación estándar. Solamente hubo 4 casos que presentaron una inversión en su proporción CD4/CD8, se trataron en su totalidad de pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante, de ellos uno en etapa I y los restantes en etapa II, uno de ellos presentaba ganglios metastáticos; aunque no se mostró ninguna asociación significativa entre la inversión de la proporción y estos parámetros. Otra característica importante que se debe señalar, es que ninguno expresó IL-2 ni IFN- $\gamma$  en sus ganglios axilares y todos mostraron expresión de IL-10 en los tumores, por lo tanto mostraron un microambiente supresor en el tumor y no presentaron expresión de citocinas activadoras en sus ganglios, lo que pudiera sugerir una deficiencia en su respuesta inmune.

Las citocinas son mensajeros químicos producidos por una variedad de células activadas, los cuales actúan como reguladores y mediadores de la respuesta inmune (Marselli *et al.* 2001). En general han sido demostrados sus múltiples efectos en eventos celulares como son: la regulación de la proliferación celular, diferenciación y activación en la embriogénesis; en procesos inflamatorios y en la respuesta inmune (Huang *et al.* 1999).

La producción local de citocinas por los TIL en el microambiente del tumor es crucial en el desarrollo de una respuesta inmune frente a las células tumorales y

la presencia de las citocinas supresoras puede impedir esta respuesta efectora (Venetsanakos *et al.* 1997). Por lo tanto el hecho de que no se pueda estimular la producción de determinada citocina puede inhibir la función de los TIL dirigidos contra las células tumorales y esto puede conferir ventaja al tumor para crecer y suprimir la actividad citotóxica de los linfocitos infiltrantes.

El perfil de citocinas Th1 se asocia fundamentalmente con la inmunidad mediada por células, mientras que el perfil Th2 favorece una respuesta humoral. Teniendo en cuenta que los dos tipos de respuesta se regulan entre sí, de una forma cruzada, se ha propuesto que el mecanismo que utilizan los tumores para la evasión del sistema inmune es la supresión de la respuesta Th1 por inducción preferencial de citocinas Th2 en el sitio del tumor (Halak *et al.* 1999).

En este trabajo se estudió la expresión de los RNAm de varias citocinas que caracterizan las respuestas Th1 y Th2; en tumores y en ganglios linfáticos regionales no metastáticos de pacientes con cáncer de mama. El perfil de citocinas observado en los tumores resultó heterogéneo, no obstante se observó una predominancia de la respuesta Th2 en el microambiente tumoral, caracterizada por la presencia de IL-10 en más del 50% de las pacientes. Este resultado coincide con lo reportado por varios investigadores que han demostrado la presencia de un patrón Th2 en el sitio del tumor, en pacientes con diferentes neoplasias (Karkevitch *et al.* 1994, Venetsanacos *et al.* 1997, Asselin-Paturel *et al.* 1998).

Contrariamente a los resultados obtenidos en los tumores, en los ganglios axilares, se observó una predominancia de la respuesta Th1, dada por una mayor frecuencia de la presencia de IL-2 e IFN- $\gamma$  en este microambiente. Ito (1999) también, había observado un incremento en citocinas Th1 en los ganglios linfáticos regionales de pacientes con carcinoma de pulmón, sometidos a cirugía (Ito *et al.* 1999).

La elevada expresión de IL-10 había sido reportada en células TIL de pacientes con cáncer de mama. Venetsanakos (1997) reportó la expresión de esta citocina en más del 50% de las pacientes analizadas en su estudio, Camp (1996), Marrogui (1997) y Merendino (1999), también encontraron IL-10 en pacientes con esta neoplasia (Camp *et al.* 1996, Marrogui *et al.* 1997, Merendino *et al.* 1999).

De acuerdo a los resultados obtenidos observamos mayor expresión de un factor supresor en el microambiente tumoral al analizar globalmente la población de pacientes de nuestro estudio, en cambio, si lo comparamos con el comportamiento en los ganglios linfáticos, este factor disminuye considerablemente observandose un factor activador en este sitio anatómico. La predominancia de una respuesta Th1 en los ganglios linfáticos regionales resulta importante dado que como es el sitio donde los linfocitos son activados por los antígenos que provienen de los tejidos periféricos, a través de la linfa; la presencia de citocinas como IL-2 e IFN- $\gamma$  favorecen la activación linfocitaria y por lo tanto la recirculación de linfocitos que pudieran responder a los antígenos tumorales.

La IL-10 inhibe el desarrollo de una respuesta inmune celular por diferentes vías. Tiene un efecto inhibitorio en la función y en la proliferación de los linfocitos T, inhibe la presentación de antígenos por los macrófagos y las células de Langerhans, así como la presentación de antígenos tumor asociados por las células del tumor; inhibe la síntesis de citocinas inflamatorias por los macrófagos, también se ha demostrado que inhibe la maduración de las células dendríticas que son las principales APC en la iniciación de una respuesta inmune (Venetsanakos *et al.* 1997, Gastman *et al.* 1999). Por lo tanto su función es principalmente supresora de la respuesta inmune y el hecho de encontrar una mayor frecuencia de esta en el microambiente del tumor implicaría una posible supresión local.

Se ha reportado que IL-10 puede inhibir la proliferación de las células T humanas directamente bloqueando la producción de IL-2 a nivel transcripcional



(Halak *et al.* 1999). No obstante, nosotros obtuvimos expresión del RNAm de IL-2 en un 33% de los tumores. La asociación de ambas citocinas fue estadísticamente significativa en el sitio del tumor, aunque siempre resultó ser predominante la interacción en la que ambas fueron negativas, solamente en 9 pacientes coincidió la expresión de ambas, lo que representa el 30% del total de la población. Sugerimos que esto pudiera estar dado porque la producción de citocinas, es heterogénea en las diferentes zonas del tumor producto de una distribución heterogénea de los *linfocitos* asociados al tumor y los *linfocitos* infiltrantes. La expresión de IL-2 en el *microambiente* tumoral sugiere una activación local que puede ser suprimida por la presencia de IL-10. Los resultados en el *microambiente* del tumor difieren de los obtenidos en los ganglios linfáticos regionales, donde se *observó* una pérdida de expresión de IL-10 así como un incremento de la expresión de IL-2 en estos órganos en las pacientes con cáncer de mama.

Las células T cooperadoras específicas para los antígenos del tumor pueden secretar IFN- $\gamma$ , la cual puede incrementar la expresión de moléculas MHC clase I y la susceptibilidad a la lisis por las células CTL. El IFN- $\gamma$  también puede activar a los macrófagos para destruir a las células tumorales (Abbas *et al.* 2000). La falta de secreción de IFN- $\gamma$  en el sitio del tumor observada en nuestras pacientes también pudiera explicar una deficiencia en la respuesta inmune local.

La producción de IL-10 en el sitio del tumor puede ser utilizado por el tumor para impedir su destrucción por el sistema inmune. Esto tiene importancia para diseñar estrategias dirigidas a generar inmunidad tumor-específica mediada por células y sugiere que la neutralización de IL-10 pudiera ser clave para la efectividad de tales terapias. La capacidad de la IL-10 para inhibir la generación de respuesta inmune en el sitio del tumor tiene importantes implicaciones con respecto a la inmunoterapia local del cáncer (Halak *et al.* 1999).

En nuestro trabajo comparamos el nivel de expresión de la proteína IL-10 en los tejidos tumorales con la expresión de diferentes marcadores tumorales

reportados en cáncer de mama con el objetivo de conocer si existe alguna relación del factor supresor IL-10 con diferentes factores pronósticos en esta neoplasia. IL-10 solo mostró asociación con los marcadores de apoptosis, positiva con los marcadores de la familia Bcl-2 y negativa con p53.

Una asociación entre IL-10 y p53 ha sido descrita en el envejecimiento y en carcinoma gástrico invasivo (Fox *et al.* 2002). La inducción de la expresión de p53 se ve afectada en los individuos mayores de edad. La disminución de la función inmune se ha asociado con una acumulación de células T de memoria, estas se han relacionado con una pobre respuesta proliferativa. Las alteraciones en la producción de citocinas relacionadas con la edad incluyen una alta expresión de IL-4 e IL-10 y una baja producción de IL-2. Este cambio a citocinas Th2 se ha observado en ratones negativos a p53. En estudio llevado a cabo en ratones p53<sup>-/-</sup>, estos mostraron acumulación de células T de memoria y una mayor expresión de IL-4, IL-6 e IL-10, después de estimulación antigénica (Fox *et al.* 2002). Existen reportes que indican que los promotores de algunas citocinas son reprimidos por p53, esto sugiere que la regulación negativa de estas citocinas se pierde cuando hay deficiencia de p53 (Ohkusu-Tsukada *et al.* 1999). Inmunización de ratones con secuencias genéticas de p53 estimuló el desarrollo de respuesta inmune tipo 1, p53-específica, resultando en una inmunidad protectora al reto con adenocarcinoma mamario metastático murino (Parajuli *et al.* 2001). Este comportamiento no se ha reportado en cáncer de mama humano. Teniendo en cuenta los resultados anteriores pudieramos explicar la relación inversa observada entre IL-10 y p53 en nuestro estudio, donde se observó que de los pacientes que resultaron negativos a p53, el 89% fueron positivos para IL-10.

Se ha documentado el papel de IL-10 como factor antiapoptótico, su efecto en la supervivencia de las células se ha asociado con una expresión incrementada de Bcl-2. IL-10 es capaz de prevenir la apoptosis inducida por activación de células T humanas. (Rojas *et al.* 1999, Hashimoto *et al.* 2001). La relación entre IL-10 y Bcl-2 también ha sido observada en células humanas de cáncer; una

disminución en la expresión de IL-10 en células de linfoma no-Hodgkin's es responsable de una disminución en la expresión de Bcl-2 (Alas y Bonavida 2001). Teniendo en cuenta que IL-10 puede ejercer un efecto sobre la expresión de Bcl-2 podemos explicar la asociación positiva que obtuvimos entre estas dos proteínas en las muestras de tumor de las pacientes con cáncer de mama; del total de los pacientes que expresan IL-10, el 78% expresaron Bcl-2.

La asociación positiva de IL-10 con Bax fue estadísticamente significativa, el total de sujetos positivos para IL-10 resultó positivo para Bax. A pesar de que Bax es una proteína apoptótica, el hecho de que esté igualmente elevada que su contraparte anti-apoptótica Bcl-2, puede ser indicativo de inhibición del fenómeno de apoptosis en las células tumorales, debido a que el heterodímero Bax-Bcl-2 es anti-apoptótico y sus dos componentes están igualmente favorecidos en concentración.

La expresión simultánea de IL-10 y la elevada expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en el microambiente tumoral, pueden representar una asociación de marcadores que relacionen el estado de la inmunidad del huésped con la apoptosis en el tumor. Este tipo de asociaciones pueden tipificar con mayor eficacia la agresividad de los tumores de mama.

La interacción entre IL-10 y los marcadores de apoptosis no se había documentado en el tumor de mama, pero extrapolando los resultados obtenidos en otros sistemas podemos dar explicación a las interacciones observadas en nuestro estudio, entre esta citocina y los marcadores: p53, Bax y Bcl-2, en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama.

Como es conocido existen diferentes factores que provocan una disminución de la respuesta inmune local en pacientes con cáncer, tal es el caso de las proteínas que intervienen en la activación de linfocitos T, por este motivo analizamos la expresión de dos cadenas de la proteína CD3 en los tejidos tumorales y lo comparamos con su expresión en los ganglios linfáticos regionales.

La ausencia o disminución en la expresión de las cadenas  $\zeta$  y  $\epsilon$  afecta la vía de señalización del TCR, por lo tanto, contribuye a una disfunción inmune celular. En los últimos años se han reportado defectos en la vía de señalización en las células T de pacientes con cáncer. Estos defectos están mayormente presentes en las células linfoides derivadas del microambiente del tumor y con menos frecuencia se han observado en sangre periférica (Kuss *et al.* 1999).

Varios grupos han reportado disminución de la cadena  $\zeta$  en linfocitos asociados a tumor y en TIL de pacientes con carcinoma renal (Finke *et al.* 1993), colorectal (Nakagomi *et al.* 1993, Matsuda *et al.* 1995), gástrico (Ishigami *et al.* 2002), cervical (De Gruijl *et al.* 1999) y en cáncer de cabeza y cuello (Muller *et al.* 2002). Estos resultados coinciden con los presentados en este trabajo en pacientes con cáncer de mama, en el cual obtuvimos una disminución en la expresión de las cadenas  $\zeta$  y  $\epsilon$ , en el 33 y 53% de las pacientes respectivamente. En cambio, cuando analizamos la expresión de CD3  $\zeta$  y  $\epsilon$  en los ganglios linfáticos regionales, un elevado por ciento de las pacientes expresaban ambas cadenas en este microambiente, 90 y 83% para  $\zeta$  y  $\epsilon$ , respectivamente. Estos resultados nos sugieren que los linfocitos del microambiente tumoral están sometidos a mecanismos supresores que provocan una disminución de la respuesta inmune en diferentes vías.

Nieland (1998) observó una disminución de IFN- $\gamma$  en células MNP de pacientes con carcinoma de mama, después de ser estimuladas con anti-CD3; estas células expresaban elevados niveles de CD3- $\zeta$  (Nieland *et al.* 1998). Nosotros encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de la cadena CD3- $\zeta$  y la presencia de IL-10 en el tejido tumoral, medida por inmunohistoquímica. Cuando IL-10 en el tejido es negativo, se tiene también CD3- $\zeta$  negativo y cuando IL-10 en el tejido es positivo el 63% de la población es positiva a CD3- $\zeta$ . Sin embargo, en los ganglios linfáticos tuvimos que para el total de pacientes negativas a IL-10, la mayoría de las pacientes resultaron positivas a ambas cadenas (87%). Estos resultados parecen contradictorios, pero coinciden con la relación encontrada entre la expresión de la cadena CD3-

ζ y la presencia de un patrón Th1 o Th2. Nieland (1998) había reportado una afectación del patrón Th1 con la expresión de la cadena ζ, en cáncer de mama (Nieland *et al.* 1998); nosotros observamos que, tanto en ganglios como en tumores, más del 60% de las pacientes que expresan CD3-ζ, no expresan un patrón Th1; mientras que el 60% de las pacientes que expresaron CD3-ζ expresaban un patrón Th2 en el microambiente tumoral; contrariamente en ganglios más del 70% de las pacientes que expresaron ζ, no expresaron Th2. Pensamos que este comportamiento diferente del patrón Th2 (IL-10), en ambos microambientes, en relación con la expresión de la cadena ζ, se deba a la influencia de diferentes factores regulatorios en cada microambiente; en el caso de los tumores la presencia del factor supresor IL-10 pudiera afectar la respuesta inmune local aún en el caso de pacientes que expresan la cadena ζ.

Gastman (1999) señaló que las caspasas están involucradas en la degradación de la cadena ζ (Gastman *et al.* 1999). Los mecanismos responsables de la deficiencia en esta cadena son desconocidos pero se ha propuesto que puedan estar relacionados con la apoptosis de las células T inducida por el tumor (Kuss *et al.* 1999). Nuestros resultados indicaron una cierta asociación directa de CD3-ζ con Bcl-2 en el microambiente tumoral, la cual no fue significativa, pero se observó que cuando el marcador Bcl-2 resultó positivo (20 sujetos), el 65% de las pacientes expresaron CD3-ζ.

La deficiencia de expresión de ambas cadenas implica una deficiencia de expresión del TCR/CD3 en la superficie celular (Abbas *et al.* 2000). En nuestro estudio, la mayoría de las pacientes que tuvieron baja expresión de su marcador linfocitario CD3 en sangre periférica, no expresaron las cadenas CD3-ζ y CD3-ε, lo que nos pudiera sugerir una deficiencia de alguna de las cadenas en los linfocitos periféricos de las pacientes que pudiera provocar una disminución en la expresión de CD3.

La importancia de las cadenas CD3-ζ y CD3-ε, en las células T es dual; la síntesis de estas dos cadenas es imprescindible para la formación del receptor

y su expresión en la superficie celular y por otra parte, después del reconocimiento antigénico son los primeros sustratos que se fosforilan y desencadenan la cascada de eventos intracelulares que conducen finalmente a la activación de las células T. Una deficiencia en alguna de ellas provocaría una deficiencia tanto en el reconocimiento del antígeno como en el mecanismo de activación de las células T y por lo tanto se afectaría el desarrollo de la respuesta efectora antitumoral. La disminución en la expresión de las cadenas  $\zeta$  y  $\epsilon$  es biológicamente importante, se ha observado que puede ser normalizada en pacientes sometidos a bioterapia con interleucinas, pudieran servir como un biomarcador no solo para definir la función inmune de los pacientes sino también como un factor pronóstico y de respuesta a inmunoterapia en pacientes con cáncer.

La disminución en la función inmune conduce a una pérdida de la inmunovigilancia y por tanto favorece el desarrollo del tumor, pero, por otra parte esta disfunción inmune puede deberse a un efecto secundario inducido por las propias células tumorales. El estudio de los diferentes factores que afectan la respuesta inmune en cáncer de mama resulta importante para entender la respuesta inmunológica que se produce en el microambiente tumoral la cual sería vital en el control de la progresión del tumor, además, conociendo con precisión las alteraciones que se producen en esta respuesta se pudieran desarrollar estrategias inmunoterapéuticas dirigidas contra la afectación específica.

## **8. CONCLUSIONES**

- 1. Las pacientes incluídas en el estudio, no presentaron alteraciones fenotípicas en la población de células T periféricas en cuanto a los marcadores analizados, solamente 4 de ellas tuvo una inversión en su relación CD4:CD8.**
- 2. Predominio de un patrón de citocinas Th2 en el microambiente tumoral, dado por una mayor frecuencia de expresión de IL-10 en los tumores; en contraste con el predominio de un patrón Th1 en los ganglios linfáticos regionales no metastáticos debido a una mayor frecuencia de IL-2 en este microambiente.**
- 3. Baja frecuencia de expresión de las proteínas de activación CD3- $\zeta$  y CD3- $\epsilon$  en el microambiente tumoral a diferencia de la elevada expresión de ambas cadenas en los ganglios linfáticos regionales no metastáticos.**
- 4. Asociación de la proteína IL-10 con los marcadores tumorales relacionados con la apoptosis: directa entre IL-10 y Bcl-2 y Bax e inversa con p53.**

## 9. BIBLIOGRAFÍA CITADA

Abbas K.A., H.A. Lichtman y S.J. Pober. 2000. *Cellular and Molecular immunology* fourth edition. Ed. W.B. Sanders Company. 553pp.

Alas S. y B. Bonavida. 2001. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3(STAT3) activity in B-Non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Research*. 61:5137-5144.

Alas S., C. Emmanouilides y B. Bonavida. 2001. Inhibition of interleukin-10 by rituximab results in down regulation of Bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin. Can. Res.*7:709-723.

Arase H., T. Suenagos, N. Arase, Y. Kimura, K. Ito, R. Shina, H. Ohno y T. Saito. 2001. Negative regulation of expression and function of FcγRIII by CD3ζ in murine NK cells. *J. of Immunology* :21-25.

Asselin-Paturel C., H. Echchakir, G. Carayol, F. Gay, P. Opolon, D. Grunenwald, S. Chouaib y F. Mami-Chouaib. 1998. Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta 1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int. J. Cancer*. 77(1):7-12.

Baines C. 2000. Screening for breast Cancer: How useful are clinical breast examination?. *Journal of the National Cancer Institute*. 92(12):1002-1006.

Baruch A.B. 2003. Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Research*. 5:31-36.

Beitsch P., E. Lotzov, G. Hortobagyi y R. Pollock. 1994. Natural immunity in breast cancer patients during neoadjuvant chemotherapy and after surgery. *Surg Oncol*. 3(4):2119-2124.



Berrino F., M. Sant y A. Verdecchia. 1995. Survival of cancer patients in Europe: The EURO CARE study. IARC Scientific publications Lyon: IARC. 132.

Black M.M. y F.D. Speer. 1960. Lymph node reactivity in cancer patients. *Surg. Gynecol Obstet.* 110:477-487.

Boon T. y L.J. Old. 1997. Cancer tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 9(5):681-683.

Bost K.L., S.C. Bieligk y B.M. Jaffe. 1995. Lymphokine mRNA expression by transplantable murine B lymphocytic malignancies. Tumor-derived IL-10 as a possible mechanism for modulating the anti-tumor response. *J. Immunol.* 154:718-725.

Breitmeyer I. 1991. Immunologic Aspects of Breast Cancer Tumor Biology. *En: Harris, I.R., S. Ellan, I. C. Henderson, D.W. Kinne (Eds). Breast Diseases Second Edition J B. Lippicott Company Philadelphia. New York, London, Hayerstown. 399pp*

Camp B.J., S.T. Dyhrman, V.A. Memoli, L.A. Mott y R.J. Barth Jr. 1996. In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes. *Ann. Surg. Oncol.* 3:176-184.

Castro A.G., M. Neighbors, S.D. Hurts, F. Zonin, R.A. Silva, E. Murphy, Y.J. Liu y A.O. Garra. 2000. Anti-interleukin-10 receptor monoclonal antibody is an adjuvant for T helper cell type 1 responses to soluble antigen only in the presence of Lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 192(10):1529-1534.

Chen Q., V. Daniel, D.W. Maher y P. Hersey. 1994. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int. J. Cancer.* 56:755-761.

Chevinsky A.H., J. Ferrara y A.G. James. 1990. Prospective evaluation of clinical and pathologic detection of axillary metastases in patients with carcinoma of the breast. *Surgery.* 108:612-615.

Chomczynski P.A. 1993. Reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 51:532-540.

Clerici M., D.R. Lucey, J.A. Berzofsky, L.A. Pinto, T.A. Wynn y S.P. Blatt. 1993. Restoration of HIV-specific cell-mediated immune responses by interleukin-12 in vitro. *Science* 262:1721-1725.

Coppola D., E. Catalano y S.V. Nicosia. 1999. Pathology update significance of p53 and Bcl-2 protein expression in human breast ductal carcinoma. *Cancer Control* 6(2):181-187.

Dadmarz R., M.K. Sgagias, S.A. Rosenberg y D.J. Schwartzentruber. 1995. CD4+ T lymphocytes infiltrating human breast cancer recognise autologous tumor in an MHC-class-II restricted fashion. *Cancer Immunol. Immunother.* 40(1):1-9.

De Grujil T.D., H.J. Bontkes, F. Peccatori, M.P. Gallee, T.J. Helmerhorst, R.H. Verheijen, J. Aarbiou, W.M. Mulder, J.M. Walboomers, C.J. Meijer, N. Van de Vange y R.J. Scheper. 1999. Expression of CD3-zeta on T-cells in primary cervical carcinoma and in metastasis-positive and negative pelvic lymph nodes. *Br. J. Cancer* 79(7-8):1127-1132.

Disis M.L., E. Calenoff y G. Mc Laughlin. 1994. Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/ neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res.* 54:16-20.

Donegan W.L. 1992. Pronostic factors: Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer Supplement.* 70(6):1755-1764.

Elston C.W. y I.O. Ellis. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer the value of histological grade in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 19:403-408.

Favre N., G. Bordmann y W. Rudin. 1997. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *J. Immunol. Methods* 204:57-66.

Faxas M. E. 1987. Alteraciones de la inmunidad celular en pacientes con enfermedad mamaria benigna y maligna. *Rev. Cub. Oncol* 3:81-92.

Ferlay J. 2001. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence worldwide. International Agency for Research on Cancer. WHO. IARC press, Lyon.

Fernández L. y Y. Galán. 1999. Cáncer en Cuba. Reporte del Registro Nacional de Cancer. Instituto Nacional de Oncología.

Fernández L., M. Graupera, Y. Galán, A. Martín, M. Cicili y R. Camacho. Cancer Survival in Cuba. 1998. *En*: R. Sankaranarayanan, R.J. Black y D.M. Parkin (Ed). *Cancer Survival in Developing Countries*. IARC Scientific Publications. 145.

Fernández N., C. Garcia y G. Expósito. 1986. Depresión de la capacidad proliferativa en pacientes con cáncer de mama. *Rev. Cub. Invest. Biom.* 5(3):313-318.

Fitzgibbons P.L., D.L. Page y D. Weaver. 2000. Prognostic Factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus statement. *Arch. Pathol. Lab.Med.* 124:966-201.

Fox J.G., Sheppard B.J., Dangler C.A., Whary M.T., Ihrig M. y Wang T.C. 2002. *Cancer Research.* 62:696-702.

Gaffey M.J., S.E. Mills y H.F. Frierson. Medullary carcinoma of the breast: Interobserver variability in histopathologic diagnosis. *Mod Pathol.* 8:31-36.

Gasco M., S. Shami y T. Crook. 2002. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research.* 4:70-76.

Gasparini G., F. Pozza y A. Harris. 1993. Evaluating de potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J. Natl Cancer Inst.* 85:1206-1210.

Gastman B.R., D.E. Johnson, T.L. Whiteside y H. Rabinowich. 1999. Caspase-mediated degradation of T-cell receptor  $\zeta$ -chain. *Cancer Research* 59:1422-1427.

Geddes M. y D.M. Parkin. 1993. Cancer in Italian migrants populations. IARC Scientific publication. Ed. Lyon, France, IARC. 123.

Ghadirian P. 1998. Sociodemographic Characteristics, smoking, medical and family history and Breast Cancer. *Cancer Detection and Prevention.* 22(6):485-494.

Giannios J. y L. Ioannidov-Mouzaka. 1997. Molecular aspect of breast and ovarian cancer. *Eur. J. Gynaec. Oncol.* 5:387-393.

Green, A.R., V.L. Green, M.C. White y V. Speirs. 1997. Expression of cytokine messenger RNA in normal and neoplastic human breast tissue: identification of interleukin-8 as a potential regulatory factor in breast tumours *Int. J. of Cancer.* 72:937-941.

Greenberg P.D. y J.L. Zieyler. 1991. Cancer and Clinical Immunology. *En: Stites D.P. y A. I. Terr, (Eds). Basical and Clinical Immunology Seventh edition, New Jersey. Lance Med. Publication: 599pp.*

Gross J.M. y Y. Douglas. 2002. How does the strogen receptor work. *Breast Cancer Research* 4:62-64.

Guckel B., M. Lindaue y W. Rudy. 1995. CD80-transfected human breast and ovarion tumor cell lines: Improved immunogenicity and induction of cytolytic CD8+ T lynfocytis. *Cytokines and Molecular Therap:* 211-221.

Hadden J.W. 1995. The immunology of breast cancer. *Clin. Immunother.* 4:279-300.

Hainaut P., P. Weynant y P. Conlie. 1990. Antitumor T-Lymphocyte Responses. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 10(4):145-152.

Halak, B.K., H.C. Maguirre Jr y E.C. Lattime. 1999. Tumor-induced interleukin-10 inhibits type 1 immune responses directed at a tumor antigen as well as a non-tumor antigen present at the tumor site. *Cancer Research* 59:911-917.

Hall P.A. 1998. p53: The challenge of linking basic science and patient management. *The Oncologist*. 3:218-224.

Harris J.R., M. Morrow y G. Bonadonna. 1993. Cancer of the breast. En: V.T. Toledo, S. Hellman, S.A. Rosenberg (Ed). *Cancer Principios y Prácticas de Oncología*. J.B. Lippincot Co, Philadelphia, pp.1264-1300.

Hashimoto S., I. Komuro, M. Yamada y K.S. Akagawa. 2001. IL-10 inhibits granulocyte macrophage colony-stimulating factor dependent human monocyte survival at the early stage of the culture and inhibits the generation of macrophages. *J. of Immunol.*:3619-3625.

Hayes D.F., R. Bast y C.E. Desch. 1996. A tumor marker utility grading. *J. Natl Cancer*. 88:1456-1462.

Hook L.M., Y. Agafonova y S. Ross. 2000. Genetics of mouse mammary tumor virus-induced mammary tumors: linkage of tumor induction to the gaga gene. 19:8876-8883.

Hortobagyi G.N. 1998. Treatment of breast cancer. *The New England J. of Medicine*. 39(14):974-984.

Huang M., J. Wang, P. Lee, S. Sharma, J.T. Mao, H. Meissner, K. Uyemura, R. Modlin, J. Wollman y S.M. Dubinett. 1995. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Research* 55:3847-3853.

Huang Y.T., T.S. Sheen, C.H. Chen, J. Lu, Y. Chang, J.Y. Chen y C.H. Tsai. 1999. Profile of cytokine expression in nasopharyngeal carcinomas: A distinct

expression of interleukin 1 in tumor and CD4<sup>+</sup> T cells. *Cancer Research*.59:1599-1605.

Huettner C., W. Paulus y W. Roggendorf. 1995. Messenger RNA expression of the immunosuppressive cytokine IL-10 in human gliomas. *Am. J. Pathol.* 146:317-323.

Ishigami S., S. Natsugoe, K. Tokuda, A. Nakajo, H. Higashi, H. Inashige, K. Aridone, S. Hokita y T Aikov. 2002. CD3-zeta chain expression of intratumoral lymphocytes is closely related to survival in gastric carcinoma patients. *Cancer* 94(5):1437-1442.

Israelis L.G. y E.D. Israelis. 1999. Apoptosis. *The oncologist* 4:332-339.

Ito N., H. Nakamura, Y. Tanaka y S. Ohgi. 1999. Lung Carcinoma: analysis of T helper type 1 and 2 cells and T cytotoxic type 1 and 2 cells by intracellular cytokine detection with flow cytometry. *Cancer* 85(11):2359-2367.

Jacobs H. 1997. Pre-TCR/CD3 and TCR/CD3 complex: decamers with differential signaling properties?. *Immunol. Today* 18:565-569.

Janeway C.A. y P. Travers. 1996. Control and Manipulation of the Immune Response. *En: Ltd/Garland Publishing Inc (Ed). Immunobiology. The immune system in health and disease* 2nd. Edition. 450pp.

Jiong W., Z.M. Shao, Z.Z. Shen, J.S. Ju, Q.X. Han, J.A. Fontana y S.H. Barsky. 2000. Significance of apoptosis and apoptotic related proteins, Bcl-2 and Bax in primary. breast cancer. *The Breast Journal.* 6(1):44-52.

Kandouz M., M. Siromachkova, D. Jacob, M. Chretien, A. Therwath y A. Gompel. 1996. Antagonism between estradiol and progestin on Bcl-2 expression in breast cancer cells. *Int. J. of Cancer.* 68:120-125.

Karkevitch D.D., D. Seito, G.C. Balch, T. Maeda, C.M. Balch y K. Itoh. 1994. Characterization of autologous-specific T-helper 2 cells in tumor infiltrating

lymphocytes from a patient with metastatic melanoma. *Int. J. Cancer.* 58:317-323.

Kay D. 1999. Breast screening in women aged 40-49 years: what next?. *The Lancet.* 35:9168-9172.

Kim J., R.L. Modlin, R. Moy, S.M. Dubinett, T. McHugh, B.J. Nickoloff y K. Yemura. 1995. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J. Immunol.* 155:2240-2249.

Kono K., M.E. Rensing, R.M. Brand, C.J. Melief, R.K. Potkul, B.Andersson, M. Petersson, W.H. Kast y Kiessling. 1996. Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* 2(11):1825-1828.

Kumar R., R.K. Vadlamudi y L Adam. 2000. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocrine-Related Cancer.* 7:257-269.

Kurtzman, S.H., K.H. Anderson, Y. Wang, L.J. Miller, M. Renna, M. Stankus, R.R. Lindquist, G. Barrows y D.L. Kreutzer. 1999. Cytokines in human breast cancer: IL-1alfa and IL-1beta expression *Oncol. Rep.* 6:65-70.

Kuss I., T. Saito, J.T. Johnson y T.L. Whiteside. 1999. Clinical significance of decreased  $\zeta$  chain expression in peripheral blod lymphocyte of patients with head neck cancer. *Clinical Cancer Research.* 5:329-334.

Kuter I. 2001. Breast Cancer, ASCO 2001: Critical Commentaries. *The Oncologist* 6: 338-346.

Lipponen P., T. Pietilainen, V.M. Kosma, S. Aaltomaa, M. Eskelinen y K. Syrjanen. 1995. Apoptosis suppressin protein Bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *J. Pathol.* 177:49-55.



Lipworth L., L. Muralla y D. Trichopoulos. 2000. History of Breast-Feeding in Relation to Breast Cancer Risk: a Review of the Epidemiologic Literature. *Journal of the National Cancer Insdtitute*. 92(4):302-312.

Livingston R.B. y F.J. Esteva. 2001. Chemotherapy and Herceptin for Her-2+ Metastatic breast cancer: the best drug?. *The oncologist*. 6:315/316.

Lucey D.R., M. Clerici y G.M. Shearer. 1996. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic and inflamatory diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:532-561.

Lukas J., N. Niu y M.F. Press. 2000. P53 mutations and expression in breast carcinoma in situ. *American J. of Pathol.* 156(1):183-191.

Macleod K. 2000. Tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetic and Development*. 10:81-93.

Manetti R., P. Parronchi, M.G. Guidizi, M.P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri y S Romagnani. 1993. Natural Killer Cell Stimulatory Factor (IL-12) Induces T Helper Type 1 (TH1)-specific Immune Response and Inhibits the Development of IL producing Th Cell. *J.Exp.Med.* 117:1199-1204.

Mantovani G., F.G. Serri y A. Maccio. 1989. Functional and surface phenotype study of lymphocyte subsets in peripheral blood and lymph nodes of breast cancer patients. *Cancer Detection and Prevention*. 13:323-332.

Marrogi AJ., A. Munshi, A.J. Merogi, Y. Ohadike, A. El-Habashi, O.L. Marrogi y S.M. Freeman. 1997. Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factor in breast carcinoma *Int. J. of Cancer*. 74:492-501.

Marselli L., F. Dotta, S. Piro, S. Carmela, M. Masini, R. Lupi, M Realacci, S del Gerra, F. Mosca, U. Boggi, F. Purello, R. Navalesi y P. Marchetti. 2001. The cytokines have a partial, direct protective effect on the function and survival of

isolated human islets exposed to combined proinflammatory and Th1 cytokines. *The J. of Clin. End. and Met.* 86(10):4974-4978.

Martin A.M., L. Bárbara y Weber. 2000. Genetic and Hormonal Risk Factors in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 92(14):1126-1135.

Matsuda M., M. Petersson, R. Lenkei, J.L. Taupin, I. Magmesson, H. Mellstedt, P. Anderson y R. Kiessling. 1995. Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. *Int. J. Cancer.* 61(6):765-772.

Merendino, R.A., S. Gangemi, A. Misefari, A. Arena, A.B. Capozza, S. Chillemi y F.P. D'Ambrosio. 1999. Interleukin-12 and interleukin-10 production by mononuclear phagocytic cells from breast cancer patients *Immunol. Lett.* 68:355-358.

Miller. 2000. Canadian National Breast Screening Study-2: 13-Year results of a Randomized Trial in Women Aged 50-59 years. *Journal of the National Cancer Institute.* 92(18).

Modlin R.L. y T.B. Nutman. 1993. Type 2 cytokines and *negative* immune regulation in human infections. *Curr. Opin. Immunol.* 5:511-517.

Moore Jr. O.S. y F.W. Foote Jr. The relative favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer* 2:635-42.

Mosmann T.R. y Coffman R.L. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cell. *Adv. Immunol.* 46:111-117.

Mosmann T.R. y S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today.* 17:138-142

Muir D., R. Kanthan y S.C. Kanthan. 2003. Male versus female breast cancers. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127:36-41.

Muller D., S. Lang, M. Roskrow y B. Wollenberg. 2002. The expression of zeta-chain of the T cell receptor as prognostic marker for patients with head and neck cancer. *Laryngorhinootologie*. 81(7):516-520.

Nakagomi H., M. Petersson, I. Magnusson, C. Juhlin, M. Matsuda, H. Mellstedt, J.L. Taupin, E. Vivier, P. Anderson y R. Kiessling. 1993. Decreased expression of the signal transducing  $\zeta$  chains in tumor-infiltrating T cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Research* 53:5610-5612.

Nakagomi H., P. Pisa, E.K. Pisa, Y. Yamamoto, E. Halapi y K. Backlin. 1995. Lack of interleukin-2 (IL-2) expression and selective expression of IL-10 mRNA in human renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. 63:366-370.

Navarro-Gómez J., W. Arafat y J. Xiang. 1999. Gene therapy for carcinoma of the breast pro-apoptotic gene therapy. *Breast Cancer Research*. 2:32-44.

Nieland J.D., K. Loviscek, K. Kono, K.S. Albain, A.R. McCall, R.K. Potkul, S.G. Fisher, M.P. Velders, M. Petersson, R. Kiessling y W.M. Kast. 1998. PBLs of early breast carcinoma patients with a high nuclear grade tumor unlike PBLs of cervical carcinoma patients do not show a decreased TCR $\zeta$  expression but are functionally impaired. *J. of Immunotherapy*. 21(4):317-322.

Nilsson E. y J.A. Gustafsson. 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res*. 2(5):360-366.

Nomura M., S. Shimizu, T. Ito, M. Narita, H. Matsuda y Y. Tsujimoto. Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosol factor regulated by Bcl-2. *Cancer Research*. 59:5542-5548.

Ohkuso-Tsukada K., Tsukada T. y Isobe K.I. 1999. Accelerated development and aging of the immune system in p53-deficient mice. *J. of Immunology*. 163:1966-1972.

Osorio L.M. 1998. Regulation of T-cell proliferation and B-cell apoptosis by CD6 and Fas/FasL. Tesis de D., Stockolm, Sweden. 56 pp.

Osorio L.M., A. De Santiago, M. Aguilar-Santelises, H. Mellsted y M. Jondal. 1997. CD6 ligation modulates the Bcl-2/Bax ratio and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis induced by anti-IgM. *Blood*. 89(8):2833-2841.

Osorio L.M., C. Ordoñez, C.A. Garcia y M. Jondal. 1995. Evidence for protein tyrosine kinase involvement in CD6-induced T cell proliferation. *Cellular Immunol*. 165:1-7.

Parajuli P., V. Pisarev, J. Sublet, A. Steffel, M. Varney y R. Singh. 2001. Immunization with wild-type p53 gene sequences coadministered with Flt3 ligand induces an antigen-specific type 1 T-cell response. *Cancer Research* 61:8227-8234.

Pardoll D.M. y S.L. Topalian. 1998. The role of CD4<sup>+</sup> T cells responses in antitumor immunity. *Current Opinion in Immunology* 10:588-594.

Parkin D. M., F.I. Bray y S.S. Devesa. 2001. Cancer Burden in the year 2000. The global picture. *European Journal of Cancer* 37:S4-S66

Peyrat J.D., J. Bonneterre y R. Lubin. 1995. Prognostic significance of circulating p53 antibodies in patients undergoing surgery for locoregional breast cancer. *Lancet*. 345:621-622.

Pisani, P., F.I. Bray y D.M. Parkin. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for the 25 sites in the adult population.

Raymond W. Y J.R. Ruddle. 1996. Molecular and genetic events in neoplastic transformation. *En: Schottenfeld D. Y J.H. Fraumeni Jr. (Ed). Cancer epidemiology and prevention second edition. Oxford University Press. 450pp.*

Reed J.C., T. Miyashita, S. Takayama, H.G. Wang, T. Sato, S. Krajewski, C. Aime-Sempe, S. Brodug, S. Kitada y M. Hanada. 1996. Bcl-2 family proteins:

regulators of cell death involved in pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J. Chem. Biochem.* 60:23-32.

Reichert T.E., H. Rabinowich, J.T. Johnson y T.L. Whiteside. 1998. Mechanisms responsible for signaling and functional defects. *J. of Immunotherapy* 21(4):295-306.

Ries L.A., C.L. Kosary y B.F. Hankey. 1997. SEER cancer statistics review, 1973-1994. M.D. Bethesda (Ed). National Cancer Institute. NIH Pub. 97-2789.

Rojas M., M. Olivier, P, Gros, L.F. Barrera y L.F. García. 1999. TNF- $\alpha$  and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. *J. of Immunol.* 162:6122-6131.

Rosen, H.R., C. Ausch, M. Reinerova, E. Zaspin, K. Renner, A.C. Rosen y R. Schiessel. 1998. Activated lymphocytes from breast cancer patients express the characteristics of type 2 helper cells -a possible role for breast cancer-associated p43. *Cancer Lett* 127:129-134.

Ross J.S. y J.A. Fletcher. 1998. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *The Oncologist.* 3:237- 252

Rouslahti E. 1996. How cancer spread. *Scientific American (Special Issue)*:72-77.

Schwartzentrubart D.J., D. Solomon y S.A. Rosenberg. 1992. Characterization of lymphocytes Infiltrating Human Breast Cancer: Specific Immune Reactivity Deleted by Measuring Cytokine Secretion. *J. Immunotherapy* 12(1):198-202.

Sher A., R.T. Gazzinelli, I.P. Oswald, M. Clerici y M. Kullberg. 1992. Role of cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol.Rev.* 127:183-204.

Shin M.H., Michelle D. 2002. Intake of Dairy Products, Calcium, and Vitamin D and Risk of Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 94(17):1301-1310.

Smith D.R, S.L. Kunkel, M.D. Burdick, C.A. Wilke, M.B. Orringer y R.I. Whyte. 1994. Production of interleukin-10 by human bronchogenic carcinoma. *Am. J. Pathol.* 145:18-24.

Strong V.S. 1999. Gene therapy for carcinoma of the breast genetic immunotherapy. *Breast Cancer Research*. 2:15-21.

Susan E., W. Hankinsonl. 1999. Plasma Prolactin Levels and Subsequent Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *Journal of the National Cancer Institute*. 91(7):629-634.

Thize J. Cytokine receptors: a combinative family of molecules. *Eur. Cytokine Network*. 1994; 4:353-369.

Towbin H, T. Staehelin y T. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76:4350-4357.

Trimble L.A. y J. Lieberman. 1998. Circulating CD8 T lymphocyte in human immunodeficiency virus-infected individuals have impaired function and downmodulate CD3- $\zeta$  the signaling chain of the T cell receptor complex. *Blood* 91(2):585-594.

Tyczynski J., W. Tarkowski y D.M. Parkin. 1994. Cancer mortality among Polish migrants to Asustralia. *Eur. J. Cancer* 30:478-484.

Van Dijk M.A.J., A.A.M. Hart y L.J. van't Veer. 2000, Differences in estrogen receptor  $\alpha$  variant messenger RNAs between normal human breast tissue and primary breast carcinoma. *Cancer Res*. 60:530-533.

Venetsanakos E., I. Beckman, J. Bradley y J.M. Skinner. 1997. High incidence of interleukin 10 mRNA but not interleukin 2 mRNA detected in human breast tumours. *British Journal of Cancer* 75:1826-1830.

Vogelstein B., D. Lane y A.J. Levine. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*. 408:307-310.

Volpi A., F. De Paola, A.M. Granato, P. Bajorko, A. Becciolini, E. Scarpi, A. Riccobon, M. Balzi y D. Amadori. 2000. Prognostic significance of biologic markers in node-negative breast cancer patients: a prospective study. *Breast Cancer Research and Treatment* 63:181-190.

Wang Y., J.F. Holland y I.J. Bleiweiss. 1995. Detection of mammary tumors virus ENV gene-like sequences in human breast cancer. *Cancer Research*. 15:5173-5179.

Wenberg R.A. 1996. How cancer arises. *Scientific American (Special Issue)*:62-70.

Whiteside T.L. y G. Parmiani. 1994. Tumor-infiltrating lymphocytes: Their phenotype, functions and clinical use. *Cancer Immunol. Immunother.* 39:15-21.

Yang Q.F., T. Sakurai, G. Yoshimura, L. Shan, T. Suzuma, T. Tmaki, T. Umemura, Y. Kokawa, Y. Nakamura, M. Nakamura, W. Tang, H. Utsunomiya, I. Mori y K. Kakudo. 2000. Expression of Bcl-2 but not Bax or p53 correlates with in vitro resistance to a series of anticancer drugs in breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment* 61:211-216.

Zhang G.J., I. Kimijima, M. Onda, M. Kanno, H. Sato, T. Watanabe, A Tsuchiya, R. Abe y S. Takenoshita. 1999. *Tamoxifen-induced* apoptosis in breast cancer cells relates to down regulation of bcl-2, but not Bax and Bcl-X (L), without alteration of p53 protein levels. *Clinical Cancer Research* 5:2971-2977.



Zier K., B. Gansbacher y S. Salvadori. 1996. Preventing abnormalities in signal transduction of T cells in cancer. The promise of cytokine gene therapy. *Science*. 17:39-45.

## 10. APÉNDICE

### Modelo de Recolección de Datos.

Nombre: \_\_\_\_\_ No. Inclusión: \_\_\_\_\_ HC: \_\_\_\_\_

Etapas Clínicas: \_\_\_\_\_ Clasificación TNM: \_\_\_\_\_ Histología: \_\_\_\_\_

Fecha inscripción: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Fecha de diagnóstico: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

#### • Características Fenotípicas:

	% de positividad
CD3	
CD4	
CD8	

#### • Citocinas Microambiente Tumoral:

	Negativo	Positivo
IL2		
IL10		
IL4		
IFN		

#### • Citocinas Microambiente Sano:

	Negativo	Positivo
IL2		
IL10		
IL4		
IFN		

#### • Proteínas de Activación Microambiente Tumoral

	Negativo	Positivo
CD3- $\zeta$		
CD3- $\epsilon$		

#### • Proteínas de Activación Microambiente Sano

	Negativo	Positivo
CD3- $\zeta$		
CD3- $\epsilon$		

#### • Marcadores Tumorales:

	Negativo	Positivo
IL10		
P53		
BCL-2		
Her-2		
RE		
Bax		

Recaída: \_\_\_\_ 1. SI 2. NO

Si la respuesta anterior es sí, entonces: Fecha recaída: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Fecha de última Noticia: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Estado a la última noticia: \_\_\_\_ 1. Vivo 2. Fallecido



DONATIVO



