

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUB-DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**EFFECTO DEL IMMUNEPOTENT CRP EN LA RESPUESTA CLÍNICA E
INMUNOLÓGICA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA**

Por:

ELSA NANCY GARZA TREVIÑO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en Inmunobiología**

ABRIL, 2010

**EFFECTO DEL IMMUNEPOTENT CRP EN LA RESPUESTA CLÍNICA E
INMUNOLÓGICA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA**

Comité de Tesis

Director de la tesis: Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Secretario: Dr. Humberto H. Lara Villegas

Vocal: Dra. Liliana Ixtepan Turrent

Suplente:

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo pudo ser desarrollado gracias al apoyo, colaboración y paciencia de muchas personas.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, al Dr. Humberto Lara Villegas y a la Dra. Liliana Ixtapan Turrent por su valiosa asesoría para cumplir con éxito el presente proyecto de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Agradezco a mi familia, padres y hermanos por el apoyo moral que siempre me han brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT	X
2. INTRODUCCIÓN	1
3. HIPÓTESIS	3
4 OBJETIVOS	4
5. ANTECEDENTES	5
5.1 Generalidades del Cáncer	5
5.2 Cáncer de mama	6
5.2.1 Epidemiología	6
5.2.2 Factores de Riesgo	7
5.2.3 Tipos de cáncer de mama	11
5.2.4 Tratamientos	14
5.2.4.1 Respuesta inmune frente a los tumores	15
5.2.4.2 Efectos de la quimioterapia sobre el sistema inmune	18
5.3 Factor de Transferencia	20
5.3.1 Extracto dializable de leucocitos y cáncer	23
6. MÉTODOS	25
6.1 Área de Trabajo	25
6.2 Pacientes	25

6.3 Tratamiento	26
6.4 Diseño del estudio	26
6.5 Evaluación de la respuesta clínica	28
6.5.1 Respuesta clínica por imagen	28
6.5.2 Calidad de vida durante el tratamiento	28
6.6 Respuesta inmunológica	29
6.6.1 Población linfoide	29
6.6.2 Citocinas en suero	30
6.7 Análisis estadístico	32
7. RESULTADOS	33
7.1 Respuesta clínica por imagen	35
7.2 Calidad de vida (Karnofsky)	39
7.3 Respuesta inmune	40
7.3.1 Perfil de linfocitos	40
7.3.2 IL-3 en suero	46
7.3.3 IL-7 en suero	47
8. DISCUSIÓN	48
9. CONCLUSIONES	52
10. LITERATURA CITADA	54
11. RESUMEN CURRICULAR	64

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Factores de riesgo de cáncer de mama	7
II.	Supervivencia de acuerdo a la etapa clínica	14
III.	Principales efectos secundarios por la quimioterapia	18
IV.	Escala de Karnofsky	29
V.	Características clínicas de los pacientes	34
VI.	Respuesta clínica al tratamiento por estadio	37
VII.	Poblaciones linfoides durante el tratamiento de quimioterapia	45

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1. Incidencia y Mortalidad del cáncer de mama	6
2. Sitios de acción de los agentes citotóxicos	16
3. Esquema de tratamiento (<i>timeline</i>)	30
4. Efecto clínico del Immunepotent CRP por imagen	38
5. Escala de Karnofsky	39
6. Efecto del Immunepotent CRP en la respuesta inmune (Linfocitos T CD4+)	41
7. Efecto del Immunepotent en la respuesta inmune (Linfocitos T CD8+)	42
8. Efecto del Immunepotent CRP en la respuesta inmune (Linfocitos B CD19+)	43
9. Efecto del Immunepotent CRP en la respuesta inmune (Linfocitos NK CD56-16+)	44
10. Concentración de IL-3 en suero	46
11. Concentración de IL-7 en suero	47

NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
DC's	Células dendríticas
CaMa	Cáncer de mama
Cel's	Células
CPH	Complejo mayor de histocompatibilidad
KPS	Escala de Karnofsky
EDL	Extracto dializable de leucocitos
TNF	Factor de necrosis tumoral
G-CSF	Factor estimulante de crecimiento de granulocitos
WBC	Glóbulos blancos
INF- γ	Interferón gama
IL	Interleucina
LTC	Linfocitos T citotóxicos
μg	Microgramo
μL	Microlitro

mm ³	Milímetro cúbico
NK	Célula asesina natural (Natural killer)
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
PET	Tomografía de emisión de positrones
CT	Tomografía computarizada

RESUMEN

El extracto dializable de leucocitos (EDL) es un agente inmunológico que ha sido usado como un tratamiento adyuvante en cáncer; donde ha sido asociado con mejorar la calidad de vida durante los ciclos de quimioterapia. Basado en lo reportado anteriormente y en los beneficios clínicos que han sido observados en otros tipos de cáncer, decidimos investigar el efecto clínico e inmunológico del EDLb como adyuvante de la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama y compararlo con pacientes con cáncer de mama que únicamente recibieron quimioterapia (sin tratamiento adyuvante). En este estudio se incluyeron 43 pacientes con cáncer de mama que fueron divididos en dos grupos: 25 recibieron quimioterapia y EDLb como adyuvante y 18 recibieron solamente quimioterapia (grupo control). En el grupo que recibió el EDLb como adyuvante se observó que el 60% tuvo una respuesta completa, 32% respuesta parcial y 8% no respondió al tratamiento. En el grupo control (sin tratamiento adyuvante) el 39% tuvo una respuesta completa, 50% respuesta parcial y un 11% fue no respondedor. Además el tratamiento con EDLb en combinación con la quimioterapia resultó en una mejora en la escala de Karnofsky aún durante la quimioterapia. Nuestros resultados muestran una disminución en las poblaciones linfoides por debajo de los valores de referencia en el grupo sin EDLb. En cambio los pacientes que recibieron el tratamiento adyuvante mantuvieron las poblaciones de CD4⁺, CD8⁺ y linfocitos B cercanos a la media de los valores de referencia. Se incrementaron las células NK después de la quimioterapia en el grupo que recibió el EDLb. En conclusión, el tratamiento con EDLb contribuye significativamente a mantener el estado inmunológico durante los ciclos de quimioterapia, incrementando la respuesta clínica y la calidad de vida durante el tratamiento.

ABSTRACT

Dialyzable leukocyte extract (DLE) is one of the immunological agents used as an adjuvant in cancer therapy; it has been associated with improved quality of life during cancer chemotherapy. Based on these previous findings and on the observed clinical benefits attributed to DLE in other types of cancer, we investigated its clinical and immunological effects as a therapy adjuvant on breast cancer patients who received only chemotherapy, as compared to patients administered bovine DLE (bDLE) as an adjuvant. This study included 43 breast cancer patients who were about to begin chemotherapy. This group was divided as follows: 25 received chemotherapy and bDLE as an adjuvant therapy, and 18 received only chemotherapy without the adjuvant. All patient clinical and immunological responses were monitored. Among patients in the group that received bDLE as adjuvant, 60% showed a complete response, 32% showed a partial response and 8% did not respond. By contrast, in the group without the adjuvant, 39% showed a complete response, 50% displayed a partial response and 11% were non-responders. In addition, bDLE treatment in combination with chemotherapy resulted in the enhancement of the Karnofsky performance scale during chemotherapy. Even though patients underwent several cycles of chemotherapy without bDLE, the lymphocyte population dropped to below the reference value. On the other hand, in patients with bDLE as adjuvant, the CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes and the B lymphocytes were maintained within the median range of the reference value. The number of natural killer cells also increased after chemotherapy treatment with bDLE as an adjuvant. In conclusion, bDLE treatment contributes to significant immunological recovery in patients that have undergone heavy chemotherapy, increasing the clinical response and quality of life during chemotherapy.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama representa uno de los problemas de salud más importantes a nivel mundial, ya que es una de las principales causas de mortalidad en la población femenina a pesar de los avances en terapias médicas y quirúrgicas. Los tratamientos actuales como es la quimioterapia y radioterapia, incrementan el tiempo de vida al reducir la masa tumoral, sin embargo; a su vez destruyen las células en división o bloquean la división celular, produciendo graves efectos secundarios; entre los que destaca la linfopenia, trombocitopenia, anemia, neutropenia entre otros (Lissoni et al., 2009). Estos son los responsables de disminuir la respuesta inmunológica y la calidad de vida durante el curso del tratamiento.

La inmunoterapia es una alternativa para incrementar la inmunidad contra el tumor o mejorar la respuesta clínica al tratamiento de quimioterapia. Por ello si se protege la inmunidad podrían reducirse los efectos secundarios. Sin embargo, la administración de inmunomoduladores como interleucina (IL) -2, interferón (IFN)-gamma o factores estimulantes de crecimiento de granulocitos (G-CSF) ha sido asociada con toxicidad al ser administrado repetidamente (DeNardo y Coussens, 2007).

Un método inmunológico que ha sido considerado en el contexto de la terapia del cáncer y que no posee efectos tóxicos reportados hasta el momento es el extracto dializable de leucocitos (EDL) o factor de transferencia. El EDL es una mezcla heterogénea de bajo peso molecular obtenida de sangre o tejido linfoide que se cree que posee la habilidad de transferir la inmunidad mediada por células de un donador inmune a un receptor no inmune (Lawrence *et al.*, 1940).

El modo de acción del EDL no ha sido definido, pero se sabe que regula la producción de citocinas inflamatorias implicadas en la progresión tumoral, además posee una actividad moduladora incrementando la inmunidad celular.

Previamente se han reportado estudios clínicos sobre el uso del EDL bovino (EDLb) comercialmente conocido como Immunepotent CRP como un adyuvante de la radioterapia y quimioterapia dirigida (Franco-Molina *et al.*, 2008). Estos estudios clínicos demuestran una mejora en la calidad de vida y un incremento en la población linfoide después del tratamiento, sin embargo se desconoce cuales son las poblaciones celulares que son protegidas durante la quimioterapia sistémica en pacientes con cáncer de mama al ser administrado el EDLb y si su administración mejora la respuesta clínica al tratamiento.

Por ello en este trabajo se pretende valorar la respuesta clínica y el efecto protector ejercido por Immunepotent CRP sobre la respuesta inmunológica en pacientes con cáncer de mama que estaban bajo tratamiento de quimioterapia.

3. HIPÓTESIS

El Immunepotent CRP mejora la calidad de vida en pacientes con cáncer de mama al proteger contra los efectos secundarios inducidos por la quimioterapia antineoplásica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar si el Immunepotent CRP usado como adyuvante en pacientes con cáncer de mama es capaz de mejorar la respuesta clínica e inmunológica durante los ciclos de quimioterapia mediante estudios de imagen, perfil de linfocitos y citocinas (IL3 e IL-7).

4.2 Objetivos específicos

1. Analizar la respuesta clínica del paciente al tratamiento mediante estudios de imagen por estadio patológico comparando pacientes que reciben el Immunepotent CRP contra controles.
2. Evaluar la calidad de vida mediante la escala de Karnofsky y los efectos secundarios durante la quimioterapia en población que recibe el Immunepotent CRP.
3. Valorar el efecto protector ejercido por el Immunepotent CRP sobre la respuesta inmunológica mediante el estudio de citometría de flujo de las poblaciones linfoides CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ y CD56-16⁺ y por medición de citocinas (IL-3 e IL-7) en suero por ELISA.

5. ANTECEDENTES

5.1 Generalidades del cáncer

El cáncer es un problema sanitario de gran importancia, se define como un grupo de enfermedades que tiene como característica principal la proliferación incontrolada y la propagación de células transformadas con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Las células transformadas tienen la propiedad de diseminarse a través del torrente sanguíneo y de los vasos linfáticos, produciendo las llamadas metástasis, permitiendo la invasión a distancia, a otros órganos y tejidos (Hanahan and Weinberg *et al.*, 2000).

Actualmente representa un problema socio-económico que afecta a la población mundial causando millones de muertes. El *Journal of the National Cancer Institute* estima que el costo del tratamiento del cáncer depende del tipo de cáncer siendo el cáncer de pulmón uno de los más caros, estimándose entre \$7,139 a \$39,891 dólares por 12 meses de tratamiento (Jemal *et al.*, 2008 ; Leung *et al.*, 1999 ; Miller *et al.*, 1980). Sin embargo, el cáncer de mama es la malignidad más común en mujeres y la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Bray *et al.*, 2004) siendo actualmente un grave problema del sector salud.

5.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama (CaMa) es un tipo de cáncer que se origina en el seno de cualquier persona. Actualmente esta neoplasia representa un problema de salud y económico que posee una alta incidencia en la población femenina a nivel mundial.

5.2.1 Epidemiología

El cáncer de mama según la OMS representa el 22.7% del total de todos los cánceres diagnosticados en mujeres en el año 2002 (Ferlay *et al.*, 2008), sin embargo en la actualidad este tipo de neoplasia ha seguido incrementando su incidencia (Figura 1). Las estadísticas muestran que cada año hay más de 1,1 millones de mujeres con diagnóstico reciente de cáncer de mama en todo el mundo y 410,000 mujeres que mueren por esta enfermedad (Stewart y Coates *et al.*, 2005).

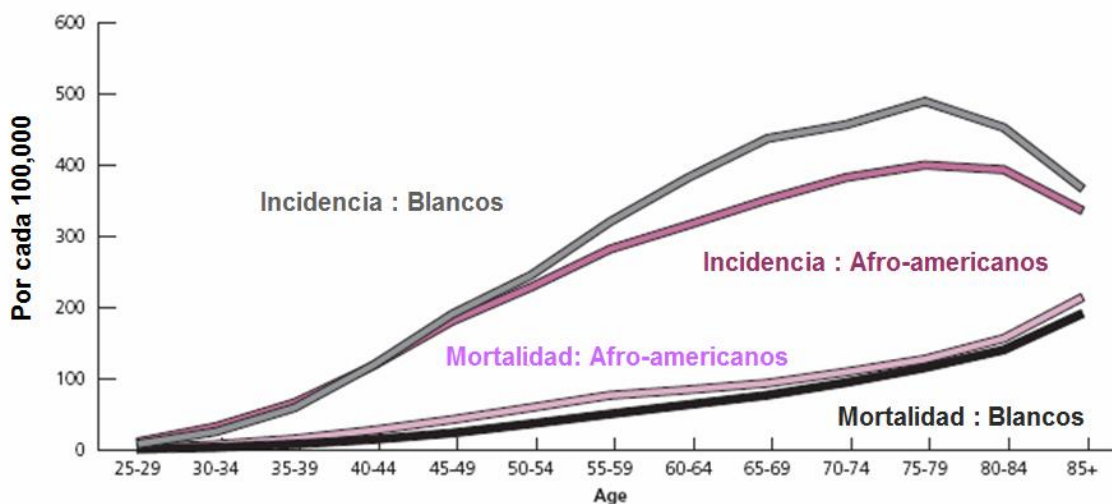


Figura 1. Incidencia y Mortalidad del cáncer de mama por edad y raza.
American Cancer Society, Surveillance Research, 2007.

El cáncer de mama en México ocupa el segundo lugar general en mortalidad, y en las mujeres a partir de los 35 años ocupa ya el primer lugar. El Registro Histopatológico de Neoplasias, registra que anualmente se diagnostican en México más de 11,000 pacientes con esta enfermedad; así mismo, fallecen cerca de 4,000 mujeres, al año. El grupo de edad más afectado se encuentra en la quinta y sexta década de la vida y lamentablemente sólo de un 5 a un 10% de los casos se diagnostican en etapas clínicas tempranas (Cárdenas Sánchez *et al.*, 2005).

5.2.2 Factores de Riesgo

Existen algunos factores involucrados en la patogénesis del cáncer de mama (Madigan MP *et al.*, 1995) (Tabla I).

Tabla I. Factores de riesgo de cáncer de mama (Rockhill B *et al.*, 1998)

Factor de riesgo	RR (Riesgo relativo)
≥ 50 años vs < 50 años	6.5
Antecedentes familiares primer grado	1.4-13.6
Antecedentes familiares segundo grado	1.5-1.8
Edad de la menarquia < 12 vs ≥ 14 años	1.2-1.5
Edad de la menopausia ≥ 50 años vs < 50 años	1.5-2.0
Edad del primer hijo > 30 vs < 20 años	1.3-2.2
Enfermedades benignas de la mama (cualquier hallazgo histológico)	1.5-1.8
Enfermedades benignas de la mama (Hiperplasia)	4.0-4.4
Hormonoterapia de sustitución	1.0-1.5

Otros factores de riesgo estudiados, que representan un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama, son la dieta, el uso de anticonceptivos orales, la lactancia, el aborto ó la exposición a radiaciones ionizantes.

Los principales factores descritos en la literatura revisada para este trabajo son:

a) Edad: El riesgo de cáncer de mama se incrementa con la edad, diagnosticándose con mayor frecuencia en mujeres mayores de 50 años. Sin embargo en los países occidentales, está aumentando el diagnóstico en mujeres más jóvenes. La incidencia de cáncer de mama aumenta con la edad, duplicándose prácticamente cada 10 años hasta llegar a la menopausia (45-55 años) donde disminuye de un modo importante. La edad de la menarquia se asocia con la frecuencia de presentación del cáncer de mama, así las pacientes que han reglado por primera vez antes de los 12 años tienen una probabilidad mayor de desarrollar la neoplasia que aquellas que iniciaron la menstruación por encima de los 14 años. (McPherson *et al.*, 2000).

b) Edad de la menarquia y menopausia:

La menarquia a edad temprana, la menopausia tardía, ciclos menstruales cortos y mayor número de ciclos a lo largo de la vida fértil, se relacionan con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama, relacionado con una mayor exposición a estrógenos y progesterona. (Vogel *et al.*, 2000)

Las mujeres con una menarquia relativamente precoz y con una menopausia tardía tienen un riesgo elevado de padecer cáncer de mama. También las mujeres que tienen una menopausia natural después de los 55 años tienen una probabilidad doble de desarrollar el cáncer de mama que aquellas pacientes que tienen la menopausia antes de los 45 años (Colditz *et al.*, 2005).

En mujeres posmenopáusicas la obesidad incrementa (al doble) el riesgo de cáncer de mama, con respecto a las premenopáusicas. Las mujeres que han sufrido una ooforectomía a los 35 años han reducido el riesgo en un 40% (Narod *et al.*, 2006).

c) **Factores genéticos:** La existencia de una historia familiar ha sido desde hace tiempo asociada como un factor de riesgo relevante para el desarrollo del cáncer de mama (Cannon *et al.*, 1996). Se estima que los factores genéticos contribuyen en la patogénesis del cáncer de mama en aproximadamente en un 5-10% de los casos y hasta en un 35% en los casos diagnosticados antes de los 30 años. Las principales mutaciones asociadas a este padecimiento son en los genes BRCA I (cromosoma 17) y BRCA II (cromosoma 13) (Wooster *et al.*, 1994). Otras alteraciones involucradas en la susceptibilidad genética al cáncer de mama son mutaciones del gen supresor p53 (Harris *et al.*, 1997).

d) **Paridad y edad del primer embarazo:** Las mujeres nulíparas presentan un riesgo mayor de desarrollar cáncer de mama, que aquellas que han estado embarazadas. El efecto protector del embarazo depende de la edad. Las mujeres cuyo primer embarazo ocurre después de los 30 años, tienen un riesgo de padecer cáncer de mama de 2 a 5 veces superior que aquellas que tuvieron su primer hijo antes de los 20 años (Daling *et al.*, 1994)

e) Factores hormonales:

El papel que juegan las hormonas en el desarrollo de cáncer de mama:

- La evidencia de que la prolactina es un factor de riesgo para el cáncer de mama y el hecho de que niveles bajos de prolactina durante la gestación temprana, tendrían un efecto protector (Zumoff *et al.*, 1994). Los niveles de prolactina son más altos en nulíparas que en mujeres que han tenido hijos, así mismo, la relación entre la historia menstrual, gestaciones y riesgo de cáncer de mama sugiere que los niveles altos de estrógenos y prolactina promueven el desarrollo del mismo (Vogel *et al.*, 2000).
- Las acciones que ejerce la progesterona en el cáncer de mama parecen no estar bien definidas. Así, la respuesta celular a los progestágenos es contradictoria; en el tratamiento con ciertos progestágenos se observa una inhibición de la proliferación celular, en el caso de otros se produce la estimulación, otros progestágenos no tienen efecto, y un último tipo de compuestos pueden dar lugar a una acción dual (Henderson *et al.*, 2008).

- f) Radiaciones:** Se ha detectado un factor medioambiental primario que se asocia con el cáncer de mama: las radiaciones ionizantes. Los estudios epidemiológicos han mostrado que las mujeres que se han expuesto a radiaciones ionizantes por cualquier mecanismo (guerra nuclear, diagnóstico médico o procesos terapéuticos) tienen un riesgo aumentado para desarrollar cáncer de mama (Connolly *et al.*, 1993).

Las radiaciones ionizantes aumentan el riesgo, especialmente si se reciben cuando la mama se está desarrollando; sin embargo, hay que pensar que la mamografía ha conseguido una disminución importante de la incidencia de cáncer de mama, especialmente en mujeres de 50 y más años. (Mattsson *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 1997).

Otros factores que pudieran asociarse con una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad son la alta ingesta de grasa (Howe *et al.*, 1990) así como la moderada o alta ingesta de alcohol (Smith-Warner *et al.*, 1998; Longnecker *et al.*, 1999).

5.2.3 Tipos de cáncer de mama

El cáncer de mama se divide principalmente en ductal y lobulillar. El carcinoma ductal que corresponde al 90% de los casos, es una neoplasia maligna que tiene su origen en la proliferación acelerada e incontrolada de células que tapizan, el sistema ductal. Este sistema durante la lactancia, lleva la leche desde los acinos glandulares, donde se produce, hasta los conductos galatóforos, situados detrás de la areola y el pezón, donde se acumula en espera de salir al exterior.

En el 10% de los casos restantes se presenta el carcinoma lobulillar, donde típicamente la neoplasia está presente en los ductos terminales de la unidad lobular; donde el crecimiento es hacia fuera del lóbulo y puede tener características sólidas o pagetoides.

Muchos cánceres de mama se encuentran confinados en la luz de los ductos o de los acinos, sin invadir los tejidos vecinos. En ese caso reciben el nombre de carcinomas *in situ*. Cuando proliferan en demasía pueden romper la llamada membrana basal y extenderse infiltrando los tejidos que rodean a ductos y acinos. En éste último caso es entonces que reciben nombres como carcinoma ductal infiltrante o carcinoma lobulillar infiltrante. Los carcinomas de mama *in situ* son potencialmente curables si se extirpan en su totalidad.

Estos tipos de cáncer cuando progresan a su vez son clasificados de acuerdo al estadio patológico como sigue a continuación:

a) **Etapa I** es una etapa o estadio inicial de cáncer de seno invasor. La etapa I significa que el tumor no tiene más de 2 cm de diámetro (menos de tres cuartos de pulgada) y las células cancerosas no se han diseminado más allá del seno.

b) **Etapa II** comprende una de las situaciones siguientes:

El tumor en el seno no tiene más de 2 centímetros de diámetro (menos de tres cuartos de pulgada) y el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos bajo el brazo; o el tumor tiene de 2 a 5 centímetros (tres cuartos de pulgada a 2 pulgadas), y el cáncer puede haberse diseminado a los ganglios linfáticos bajo el brazo; o el tumor tiene más de 5 centímetros (2 pulgadas) pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos bajo el brazo.

c) **Etapa III** puede ser un tumor grande, pero el cáncer no se ha diseminado más allá del seno y de los ganglios linfáticos cercanos. Es cáncer localmente avanzado y éste se divide en III A, III B y III C. Etapa III A significa que el tumor en el seno tiene menos de 5 centímetros, el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos de la axila y los ganglios linfáticos están conectados unos con otros o con otras estructuras. O, el tumor es grande (más de 5 centímetros de diámetro) y el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos de la axila.

Etapa III B significa que el tumor puede haber crecido dentro de la pared del tórax o de la piel del seno, o que el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos debajo del esternón. El cáncer inflamatorio de seno es un tipo raro, de cáncer de seno de etapa IIIB. El seno se ve rojo e hinchado (o inflamado) porque las células cancerosas bloquean los vasos linfáticos en la piel del seno. Etapa III C significa que el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos bajo el esternón y la axila, o a los ganglios linfáticos abajo o arriba de la clavícula. El tumor primario de seno puede ser de cualquier tamaño.

d) **Etapa IV es cáncer metastático distante.** El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo principalmente afectando pulmón, sistema nervioso central e hígado (National Cancer Institute, 2004). En la enfermedad metastásica se reporta una media de la supervivencia de 20 a 25 meses después de la aparición de la primera metástasis (Barni y Mandala *et al.*, 2005; Greenberg *et al.*, 1996), por ello en la actualidad se busca educar a la población para incrementar el diagnóstico temprano y por otro lado mejorar los tratamientos actuales (Morrow *et al.*, 1981).

5.2.4 Tratamientos

El estadio patológico permite definir el esquema de tratamiento para incrementar el tiempo de vida después del diagnóstico. El tratamiento del cáncer de mama se aborda desde un tratamiento loco-regional del tumor (cirugía y radioterapia) y un tratamiento sistémico, (hormonoterapia, quimioterapia e inmunoterapia) (Mamounas *et al.*, 2005).

Se observaban ventajas en la supervivencia cuando se sigue un buen esquema de tratamiento principalmente en estadios tempranos (Tabla II). Otros de los factores que juegan un papel importante en la respuesta clínica, son los factores predictivos como son los receptores hormonales (RE y RP), HER2-neu, mutaciones en genes supresores de tumor (p53 y WWOX) y la respuesta inmunológica del paciente. (Gammon *et al.*, 1999)

Tabla II. Supervivencia de acuerdo a la etapa clínica en México. (Asociación Mexicana de Mastectomía *et al.*, 2001)

Estadíos	Características	Denominación	Probabilidad de Curación
0	<i>In situ</i>	Incipiente	95%
I	Menos de 2 cm. sin ganglios palpables	Temprana	88%
II	Más de 2 cm. Y menos de 5 cm. Con o sin ganglios palpables	Temprana	66%
III	Más de 5 cm. con ganglios palpables y con invasión a la piel y/o pared del tórax	Loco-regional Avanzada	36%
IV	Enfermedad a distancia (huesos, pulmones, hígado, cerebro)	Avanzada	7%

5.2.4.1 Respuesta inmunológica frente a los tumores

La inmunidad humoral mediada por anticuerpos frente a diversos antígenos tumorales es pobre en la mayoría de los casos. El principal mecanismo de inmunidad antitumoral es la inmunidad celular mediante la eliminación de las células tumorales por los linfocitos T citotóxicos (LTC) CD8⁺. Los LTC secretan citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón gama (IFN- γ) que aumentan la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CPH) clase I en las células tumorales y su sensibilidad a la lisis por LTC. Así mismo el IFN- γ activa a los macrófagos, facilitando la eliminación de las células tumorales. Otro tipo de célula que cumple una función de vigilancia y ayuda en la destrucción de tumores, son las células NK, que pueden potenciar su función por interferones e interleucinas (IL-2 e IL-12).

Uno de los factores que influyen en el crecimiento de los tumores malignos es la capacidad de sus células para evitar o superar los mecanismos de defensa del huésped. Entre las propiedades de una célula tumoral se encuentra la inestabilidad de señales inhibitorias, autonomía en el crecimiento, división ilimitada, angiogénesis, invasión y metástasis (Robbins y Cotran *et al.*, 2001).

Los tratamientos actuales como la cirugía, radioterapia y quimioterapia han logrado incrementar el pronóstico de la enfermedad incrementando el tiempo de vida y reduciendo el crecimiento del tumor (Fung-Kee-Fung *et al.*, 2008). Gracias a estos tratamientos se han logrado salvar un gran número de vidas. El tratamiento de elección para el mayor porcentaje de las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama incluye el uso de quimioterapia.

La quimioterapia es un tratamiento sistémico asociado con una disminución del riesgo de recidivas y de muerte en pacientes que lo usaron después de la cirugía y radioterapia. Algunos tipos de agentes usados en la quimioterapia son compuestos extraídos de plantas, mientras que otros son sintéticos. Se pueden dividir en tres grandes grupos sobre la base de su modo y lugar de acción: antimetabolitos, agentes genotóxicos e inhibidores del huso mitótico (Zamble *et al.*, 1995; Luqmani *et al.*, 2005) (Figura 2).

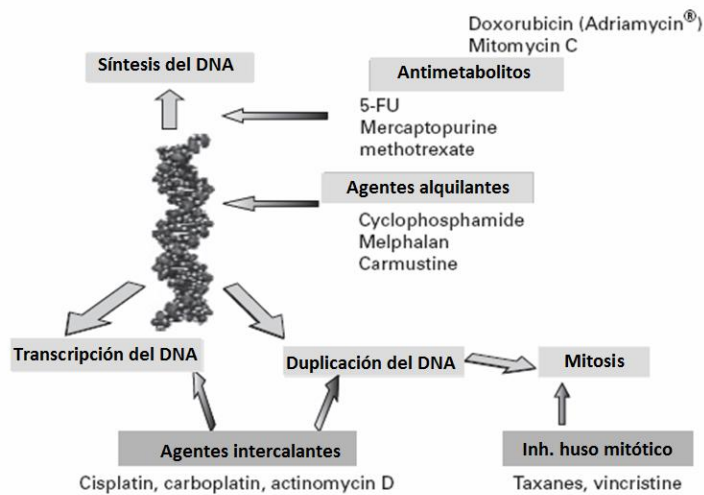


Figura 2. Sitios de acción de los agentes citotóxicos (quimioterapia)

Los principales agentes neoplásicos que se usan en el tratamiento del cáncer de mama incluye la doxorubicina (antraciclinas), ciclofosfamida (agente alquilante), fluoruracilo, metotrexate (inhibidores de enzimas claves en la síntesis de purinas y pirimidinas), docetaxel y paclitaxel (taxanos).

Las antraciclinas representan los agentes más activos y eficaces en términos de respuesta y supervivencia (Fossati *et al.*, 1998). Sin embargo, la limitación principal es su toxicidad dependiente de dosis cardíaca; los pacientes no deberían exceder la dosis acumulativa de 450-550 mg/m² para doxorubicina y 800-900 mg/m² para epirubicina respectivamente (Gennari *et al.*, 2004; Pawan *et al.*, 1998).

El primer régimen de tratamiento incluye la combinación de dos o tres drogas como doxorubicina y ciclofosfamida, ó ciclofosfamida y epirubicina (CE), ó paclitaxel, ciclofosfamida, doxorubicina y fluorouracilo (FAC) ó 5-fluorouracil, epirubicina, ciclofosfamida (FEC). Después del fracaso con antraciclinas, los taxanos ha mostrado buena actividad solo (docetaxel y paclitaxel) (Nabholtz *et al.*, 1999; Sjostrom *et al.*, 1999) o en combinación con antimetabolitos (O'Shaughnessy *et al.*, 2002; O'Shaughnessy *et al.*, 2003) puede disminuyendo la progresión e incrementando la supervivencia (Guarneri *et al.*, 2004)

La quimioterapia por ser un tratamiento sistémico es independiente de la afectación ganglionar, de la presencia o no de receptores estrogénicos y de si se administra o no tamoxifeno; sin embargo la ventaja de la quimioterapia varia bastante de acuerdo con la edad y el estado menopáusico (Lancet *et al.*, 2005). Para las mujeres menores de 50 años de edad, la quimioterapia adyuvante mejora en un 10% la supervivencia a los 15 años y en un 3% en las mujeres entre 50-69 años.

Pero la quimioterapia también posee desventajas una de ellas son los efectos secundarios a corto y largo plazo (Song *et al.*, 2009; Partridge *et al.*, 2001) (Tabla III). Estos efectos secundarios a su vez pueden llegar a suspender el tratamiento oncológico, principalmente cuando afectan de manera muy importante el sistema inmunológico. Por ello es de vital importancia revisar los efectos secundarios que son producidos por la quimioterapia en la respuesta inmune.

Tabla III. Principales efectos secundarios por la quimioterapia (Partridge *et al.*, 2001)

Efectos a corto plazo	Efectos a largo plazo
Emesis	Prematura menopausia/infertilidad
Náusea	Ganancia de peso
Estomatitis	Disfunción cardíaca
Alopecia	Leucemia/ Síndrome mielodisplásico
Trombocitopenia	Disfunción cognitiva
Mialgias	
Neuropatía *	
Fatiga *	
Linfopenia	

* Pueden ser efectos a corto y largo plazo.

5.2.4.2 Efectos de la quimioterapia sobre el sistema inmune

La quimioterapia citotóxica ataca a las células tumorales pero al mismo tiempo afecta aquellas células normales que se dividen rápidamente, afectando de manera muy importante la proliferación de células mieloides y linfoides provenientes de la médula ósea (Curtin *et al.*, 1991; Franz Solomayer *et al.*, 2003), y como resultado se producen graves efectos secundarios que incluyen la linfopenia, inhibición de la eritropoyesis y trombocitopenia (Haynes *et al.*, 2008 ; Lake y van der Most *et al.*, 2006).

La neutropenia y el decline de linfocitos T CD4⁺ son efectos secundarios frecuentes, que han sido asociados con infecciones oportunistas severas (Masur *et al.*, 1989). Las infecciones durante el tratamiento de quimioterapia representan un aumento en el número de hospitalizaciones y un costo extra sobre el tratamiento. Un ejemplo del costo del tratamiento en pacientes con cáncer de mama en promedio son \$56,070 dólares por año, representando \$7,200 dólares por hospitalizaciones, \$ 177 dólares por visitas de emergencia y \$2,640 dólares de prescripciones (Hassett *et al.*, 2006)

La depleción de linfocitos T por agentes quimio-terapéuticos principalmente afectan a los linfocitos T CD4⁺ más que a los linfocitos T CD8⁺. La disminución de los linfocitos T también produce una disminución en la función de células dendríticas (DC's), alteraciones en la producción de citocinas y factores de crecimiento, sin embargo parece no afectar a las células NK (Lissoni *et al.*, 2009; Lissoni *et al.*, 2004; Mackall *et al.*, 1994). Clínicamente la depleción inmunológica resulta en efectos clínicos evidentes como dolor, anorexia, adinamia y disminución en la calidad de vida (Berger *et al.*, 1998; Bruera *et al.*, 1997; Cleeland *et al.*, 1984 ; Kasper *et al.*, 2000 ; Kasper and Sarna *et al.*, 1995).

Los agentes de inmunoterapia son una alternativa que mejora la inmunidad anti-tumor y la respuesta clínica a la quimioterapia del cáncer como son la IL-3 e IL-7 que funcionan como estimulantes de la proliferación linfoide (T y B) (Fry y Mackall, 2007). La IL-3 que es una citocina producida por los linfocitos T, encargada de estimular la proliferación y diferenciación de progenitores linfoides y mieloides (Guillaume *et al.*, 1993), que al ser administrada con G-CSF durante el tratamiento de quimioterapia

citotóxica ayuda a reducir los efectos secundarios al proteger la inmunidad (Shapiro y Recht, 2001).

Sin embargo, la administración de estimulantes de la respuesta inmune (IL-12, IL-7, IL-2, IFN-gamma ó GM-CSF) están asociados con efectos secundarios graves y toxicidad cuando son administrados repetidamente (DeNardo y Coussens, 2007; Tahara y Lotze *et al.*, 1995; Fry *et al.*, 2001).

Uno de los métodos inmunológicos que ha sido considerado en el contexto de la terapia del cáncer y que no posee efectos tóxicos reportados hasta el momento es el Immunepotent CRP (extracto dializable de leucocito bovino (EDLb) o factor de transferencia).

5.3 Extracto dializable de leucocitos ó factor de transferencia

Fue descubierto a finales de 1940 por el Dr. H. Sherwood Lawrence, mientras estudiaba la tuberculosis Lawrence encontró que la inmunidad de un individuo podría ser transferida a otro usando pequeñas moléculas. Estos “factores de transferencia”, como él los llamó, podrían transferir inmunidad de un sistema inmune competente a un sistema menos capaz (Cleeland *et al.*, 1984; Fabre *et al.* 2004).

Actualmente se usa el término extracto dializable de leucocitos (EDL) para denominar al extracto de bajo peso molecular (menor a 10000Da) obtenido de leucocitos o linfocitos y factor de transferencia para denominar los componentes del EDL que median respuestas T específicas (Goust *et al.*, 1983).

El extracto dializable de leucocitos de origen bovino (EDLb) está compuesto por moléculas de peso molecular menor a 12,000 kDa, es producido por el Laboratorio de Inmunología y Virología en la Facultad de Ciencias Biológicas es conocido comercialmente como Immunepotent CRP^{MR}. Esta mezcla de moléculas (EDLb) transfiere inmunidad de un individuo a otro mediante extractos leucocitarios obtenidos de un donante inmunizado (Cleeland *et al.*, 1984; Lawrence y Borkowsky *et al.*, 1996) y puede ser obtenido de sangre o tejidos linfoides (Yuying *et al.*, 1999).

La transferencia de este dializado leucocitario modula la respuesta inmune de manera no específica (Ballow *et al.*, 1975) y se obtiene estimulación de las defensas inmunes cuando se requiere mientras que también se puede ejercer un efecto supresor cuando se desea la regulación negativa del sistema inmune (Fernández-Ortega *et al.*, 2001).

Por ello el uso del EDLb está indicado en una gran variedad de inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes (Franco-Molina *et al.* 2006; Yuying, Zhenxiang *et al.*, 1999) , enfermedades bacterianas (Franco-Molina *et al.*, 2006; Ayala-de la Cruz *et al.*, 1996) asma y alergias. (Luna-Baca *et al.*, 2007; Rodríguez-Balderrama *et al.*, 2000; Spitler *et al.*, 1973).

El EDLb puede tener un uso excepcional en mejorar la calidad de vida en pacientes con cáncer de pulmón (Franco-Molina *et al.*, 2008). Sin embargo, no se ha establecido un

mecanismo de acción del EDLb, pero se ha visto que regula la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-8 (Franco-Molina *et al.*, 2006; Franco-Molina *et al.*, 2004; See *et al.*, 2002) que están asociadas con efectos en la expresión TLR2 y TLR4 y con la activación del NF- κ B y cAMP (Ojeda *et al.*, 2005). Estos estudios demuestran el impacto generado por el EDLb en cáncer, ya que estas citocinas están involucradas en la progresión tumoral (Dinarello *et al.*, 2006).

Ensayos clínicos con EDL antígeno específico demuestran una inducción de la inmunidad celular y una respuesta al antígeno o a agentes extraños (Kirkpatrick *et al.*, 1993; Kirkpatrick *et al.*, 1979). Ensayos *in vitro* en modelo murino han demostrado que la administración de EDL dota a las células del bazo la propiedad de responder a los antígenos correspondientes mediante la secreción de interferón gamma (Alvarez-Tull y Kirkpatrick , 1996; Strobl B *et al.*, 2001), un producto de células T *helper* 1 (Th1).

Vacek y colaboradores (Vacek *et al.*, 2007), reportaron que el factor de origen porcino estimula la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas de granulocitos y macrófagos (GM-CFC) en la médula ósea de ratas después de la radioterapia además, aumenta los niveles del factor estimulante de colonias de granulocitos, (G-CSF), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-3 (IL-3) (Vacek *et al.*, 2002). Estos experimentos demuestran la inducción de la inmunidad mediada por células, y el poder de proliferación celular que posee el EDL sin embargo, la célula blanco y el mecanismo de acción no se conocen (Bloom *et al.*, 1980).

5.3.1 Extracto dializable de leucocitos y cáncer

En líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) el tratamiento con EDLb a una concentración de 0.06 y 0.13 U/mL inhibió la expresión del RNAm de p53, bag-1, c-myc, bax, bcl-2 que son genes involucrados en apoptosis aún así se observaron efectos citotóxicos (Franco-Molina *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios clínicos en pacientes con cáncer de mama avanzado que fueron tratados únicamente con EDL obtenido de donantes adultos sanos no tuvo efecto en la reducción tumoral resultando en una enfermedad progresiva (Atzpodien *et al.*, 2003).

Estudios con glioblastoma multiforme donde administran el EDL intratumoral como adyuvante de la quimioterapia reportan una reducción significativa del tamaño del tumor, así como un aumento en las poblaciones de CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺, NK y de citocinas Th1 (Pineda *et al.*, 2005).

En estudios clínicos donde es administrado el EDL en pacientes con diferentes tipos de cáncer (mama(Oettgen *et al.*, 1974), nasofaringe(Goldenberg and Brandes *et al.*, 1976) renal (Moss *et al.*, 2004) y próstata (Pizza *et al.*, 1996) entre otros (Whyte *et al.*, 1992; Fudenberg *et al.*, 1976; Lawrence and Borkowsky *et al.*, 1996; Meier *et al.*, 1977) se demuestra, que su uso genera una respuesta más favorablemente al tratamiento de quimioterapia y radioterapia, además de mejorar la tolerancia a los tratamientos con pocas complicaciones (Pizza *et al.*, 1996).

El EDLb ha sido utilizado en el tratamiento de pacientes con cáncer administrado junto con citocinas y agentes quimio-terapéuticos, donde se observó que el EDLb (Immunepotent) mejora la calidad de vida e incrementa la sobrevivencia de aquellos que

reciben el tratamiento (Rodríguez-Padilla *et al.*, 2008,2005; Zamora-Avila *et al.*, 2009). Por otra parte, en pacientes con cáncer de pulmón, los parámetros de la inmunidad celular (LT CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ y CD56⁺) se incrementaron posterior al tratamiento con Immunepotent CRP durante la radioterapia y quimioterapia sistémica sugiriendo que el Immunepotent CRP usado como adyuvante podría ayudar a reducir los efectos secundarios causados por el tratamiento oncológico (Franco-Molina *et al.*, 2008).

En pacientes con osteosarcoma que recibieron el EDL como un tratamiento adyuvante, se observó un aumento en el número de linfocitos T y como consecuencia una mayor inmunidad celular (Rodríguez-Flores *et al.*, 2009) . En este estudio se mostró que en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas el tratamiento con EDL aumentó significativamente las tasas de supervivencia en comparación con el grupo que no recibió tratamiento.

Existen muchos estudios previos sobre el uso del EDL en pacientes con cáncer donde se visualiza el efecto únicamente como adyuvante; sin embargo, en pacientes con cáncer de mama no existen reportes donde se valore a la par la respuesta clínica e inmunológica durante los ciclos de quimioterapia. Por ello el objetivo del ensayo es valorar la respuesta clínica y el efecto protector sobre la población linfoide mediante el uso del Immunepotent CRP (EDLb) como adyuvante en pacientes con cáncer de mama tratados con quimioterapia sistémica.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de trabajo

El trabajo experimental se realizó en la Departamento de Inmunología y Virología, Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 (BL-3) en la Facultad de Biología de la U.A.N.L. Los pacientes incluidos en el estudio fueron aquellos que incidieron de manera aleatoria al Laboratorio del Especialidades Inmunológicas en la Facultad de Biología de la U.A.N.L. bajo la vigilancia del médico a cargo del estudio.

6.2 Pacientes

En el estudio se incluyeron cuarenta y tres pacientes con diagnóstico de cáncer de mama en estadios I-IV confirmado por patología que firmaron la carta de consentimiento (Anexo I). Los criterios de inclusión incluyen un buen estatus de vida con expectativa mayor de 7 meses, con edades entre 39 y 75 años. Todos los pacientes como parte del esquema de tratamiento debían incluir la quimioterapia. Los pacientes fueron negativos para pruebas serológicas de virus de inmunodeficiencia humana, virus de leucemia células T humana, hepatitis B y hepatitis C. Ninguna inmunodeficiencia o enfermedad autoinmune fueron reportadas. Los pacientes no recibieron ningún estimulante de proliferación celular (Neupogen o Factor estimulante de granulocitos (G-CSF)), medicamentos que estimulan el apetito o glucocorticoides durante la quimioterapia.

La quimioterapia comúnmente empleada para la enfermedad localizada incluye doxorubicina y ciclofosfamida (AC), AC seguida por paclitaxel, ciclofosfamida, doxorubicina y fluorouracilo (FAC), ciclofosfamida, metotrexate y fluorouracilo (CMF), docetaxel, doxorubicina y ciclofosfamida (TAC). El régimen utilizado para enfermedad metastásica incluye Epirubicina, Mavelvine, Aromastin ó Xeloda.

6.3 Tratamiento Adyuvante

El EDLb usado en nuestro estudio fue producido por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México obtenido mediante la modificación de la técnica descrita por Lawrence *et al.*, 1996. El nombre comercial es Immunepotent CRP^{MR}.

El Immunepotent CRP es un dializado de bajo peso molecular adquirido por desintegración de bazo bovino liofilizado. Al Immunepotent CRP se le realizan prueba de pirógenos endógenos, utilizando el ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (MP Biomedicals Inc.), y se verifica que esté libre de contaminación bacteriana por cultivo en diferentes medios, así como estudios *in vivo* en ratones.

6.4 Diseño del estudio

El diseño del estudio incluye cuarenta y tres pacientes con cáncer de mama que fueron separados en dos grupos; el primer grupo corresponde a 25 pacientes con cáncer de mama que recibían el Immunepotent CRP como adyuvante de la quimioterapia. El segundo grupo incluyó 18 pacientes con cáncer de mama (grupo control) que estuvieron bajo

tratamiento de quimioterapia sin el tratamiento adyuvante (Immunepotent CRP). Se monitoreo la respuesta clínica e inmunológica en ambos grupos. El seguimiento de los pacientes se llevó a cabo al menos por 8 meses; en el grupo con Immunepotent CRP se inició la administración una semana antes de la quimioterapia, continuando con su administración durante los ciclos de quimioterapia (3-6 meses) hasta un mes después de la última quimioterapia.

Después de este periodo de administración del Immunepotent CRP, aquellos pacientes que lograban una remisión total eran vigilados anualmente mediante estudios de imagen y perfil de linfocitos; si solamente se lograba una remisión parcial se continuaba con el esquema de tratamiento del Immunepotent CRP como adyuvante de la quimioterapia. La dosis administrada a cada paciente fue definida de acuerdo con el estatus inmunológico, conociendo que una unidad (1 U) de Immunepotent CRP posee 15×10^8 leucocitos. La dosis administrada del Immunepotent CRP fue definida de acuerdo al estado inmunológico valorado mediante el perfil de linfocitos. Inicialmente durante los primeros 15 días se administró el Immunepotent CRP de acuerdo al siguiente esquema de tratamiento: (i) linfocitos B 1-3% 5 U orales; (ii) linfocitos B 4-6% 4 U (2 oral/2 i.m.); (iii) linfocitos B >6% 1 U alternando oral e i.m. Después del período inicial, la dosis del Immunepotent CRP fue gradualmente reducida dependiendo del perfil inmunológico hasta 1 U diaria.

Las vías de administración que fueron incluidas son la oral e intramuscular. Para la vía oral se diluyó el Immunepotent CRP en 5 mL de agua y fue administrado 20 minutos antes de comer. Para la presentación intramuscular se utilizó 2 mL de agua estéril.

6.5 Evaluación de la respuesta clínica

6.5.1 Respuesta clínica por imagen

La respuesta clínica de los cuarenta y tres pacientes tratados con quimioterapia fue valorada mediante estudios radiográficos o imágenes de PET-CT. La respuesta clínica del tumor fue evaluada de acuerdo a los Criterios Internacionales de la Unión contra el Cáncer (Hayward *et al.*, 1977), donde se define como respuesta completa (RC) la desaparición de todas las pruebas clínicas de la enfermedad. Respuesta parcial (RP) como un 50% o mayor disminución en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones; por lo menos un mes sin aumento de ninguna lesión y no aparición de nuevas lesiones. Los pacientes con reacciones menores o progresión de la enfermedad fueron considerados como no respondedores (NR)(Dudley *et al.*, 2005).

6.5.2 Calidad de vida durante el tratamiento

La calidad de vida fue medida usando la escala de Karnofsky (KPS) (Karnofsky, Abelmann *et al.*, 1948) (Tabla IV). Sin embargo en la población con Immunepotent CRP se adicionó un cuestionario, donde se midió la frecuencia de los síntomas relacionados con el cáncer y los efectos secundarios de la quimioterapia como es dolor, pérdida de apetito, peso, astenia y fatiga. Los cuestionarios fueron analizados en dos tiempos diferentes: antes de la administración del Immunepotent CRP y durante los ciclos de quimioterapia.

Tabla IV. Escala de Karnofsky (Karnofsky *et al.*, 1948)

100	Normal, no presenta signos o síntomas de la enfermedad.
90	Capaz de llevar a cabo actividad normal, signos y síntomas leves.
80	Actividad normal con esfuerzo, algunos signos y síntomas de la enfermedad.
70	Capaz de cuidarse, pero incapaz de llevar a cabo actividad normal, o trabajo activo.
60	Requiere atención ocasional, puede cuidarse de la mayoría de sus necesidades
50	Requiere asistencia y frecuentes cuidados médicos.
40	Encamado, necesita cuidado y atenciones especiales.
30	Invalidez severa, hospitalización indicada.
20	Inválido grave, necesita hospitalización y tratamiento general de sostén.
10	Muy grave, rápida progresión de la enfermedad.
0	Muerte.

6.6 Evaluación de la respuesta inmunológica

6.6.1 Población linfoide

La respuesta inmune se valoró mediante la biimetría hemática y el perfil de linfocitos en los pacientes con cáncer de mama. En el grupo control (sin Immunepotent CRP) se midió antes de la quimioterapia y durante la quimioterapia (después de 3 ciclos). En la grupo que recibió el Immunepotent CRP como adyuvante se monitoreo el perfil de linfocitos antes de la administración del Immunepotent CRP, durante la quimioterapia con Immunepotent CRP como adyuvante y un mes después de terminada la última quimioterapia (únicamente con Immunepotent CRP) (Figura 3).

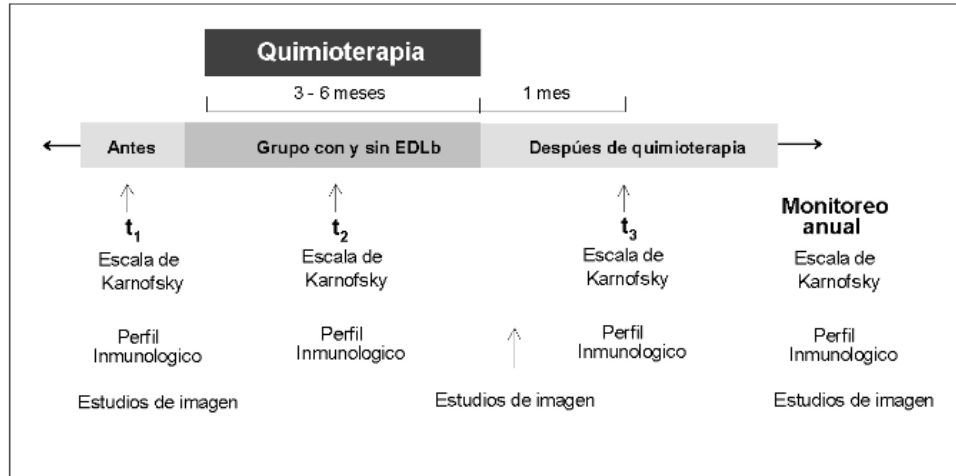


Figura 3. Esquema de tratamiento. Se muestra los estudios realizados y el periodo de tiempo que transcurrió entre estos.

La citometría de flujo se usó para contar las poblaciones de células NK (CD56⁺-16⁺), linfocitos B (CD19⁺) y linfocitos T (CD3⁺), con sus subpoblaciones (CD4⁺, CD8⁺). El equipo utilizado para la citometría de flujo Beckman Coulter Altra No. AE47042. Los datos fueron obtenidos y analizados mediante el software Expo 32 versión 1.2.

6.6.2 Citocinas en suero

Además se recolectaron muestras de suero. Los sueros fueron almacenados a una temperatura de -70°C hasta ser analizados mediante un inmunoensayo enzimático (ELISA). Los reactivos utilizados para determinar la concentración de citocinas (IL-3 e IL-7) fueron de la compañía peprotech y se realizaron de acuerdo al protocolo del proveedor, como se muestra a continuación.

6.6.2.1 Protocolo para llevar a cabo el ELISA indirecto

Preparación de la placa

Se agregan 100µL del anticuerpo de captura (1µg/mL) a la placa de 96 pozos y se deja incubar toda la noche a temperatura ambiente.

Aspirar los pozos para remover el anticuerpo de captura y lavar 3 veces con *wash buffer* (0.05% Tween 20 en PBS 1X).

Después de realizar los lavados eliminar el exceso de liquido usando un papel adsorbente.

Estándar

IL-3 humana: Realizar diluciones seriadas a partir de un estándar de 4 ng/mL hasta llegar a una concentración de cero en diluyente (0.05% Tween 20, 0.1% BSA en PBS).

IL-7 humana: Realizar diluciones seriadas a partir de un estándar de 2 ng/mL hasta llegar a una concentración de cero en diluyente (0.05% Tween 20, 0.1% BSA en PBS).

Protocolo de ELISA

Muestra o Estándar: Agregar 100µL de la muestra o el estándar a cada pozo según sea el caso por triplicado. Incubar a temperatura ambiente por 2 horas.

Detección: Aspirar los pozos para remover el liquido y lavar 3 veces con *wash buffer* (0.05% Tween 20 en PBS 1x). Agregar 100µL del anticuerpo de detección (1µg/mL).

Incubar por 2 horas a temperatura ambiente.

Conjugado (Avidin- HRP): Aspirar los pozos para remover el líquido y lavar 3 veces con buffer de lavado. Agregar 100µL del conjugado Avidin-HRP (dilución 1:2000 en diluyente) e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

Sustrato (ABTS): Aspirar los pozos para remover el líquido y lavar 3 veces con buffer de lavado. Agregar 100µL de la solución de sustrato a cada pozo e incubar a temperatura ambiente para el desarrollo del color. (Monitorear el desarrollo de color a 405nm cada 5 minutos durante 20 minutos).

6.7 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de las poblaciones linfoides y escala de Karnofsky mediante la prueba “t” *student* para datos no apareados. La significación estadística se estableció como $p < 0.05$. Los valores individuales de las cifras representan la media de los pacientes \pm SEM. Los análisis estadísticos y gráficos se hicieron con el software Sigma Plot 10.0.

7. RESULTADOS

Los cuarenta y tres pacientes con diagnóstico de cáncer de mama incluidos en el estudio fueron seleccionados al azar para evaluar el efecto del Immunepotent CRP en la respuesta clínica e inmunológica de pacientes tratados con quimioterapia, con y sin la terapia adyuvante con el Immunepotent CRP.

En ambos grupos, los pacientes que presentaban metástasis eran afectados en promedio en 3 órganos, principalmente hueso, hígado y pulmón. El 84% del grupo que recibió el Immunepotent CRP como adyuvante, fue positivo para marcadores tumorales y el 88% lo fue, en el grupo control (sin el tratamiento adyuvante). Todos los pacientes recibieron un esquema de tratamiento oncológico que dependía del estadio patológico (Tabla V).

Tabla V. Características clínicas de pacientes con cáncer de mama

Características	Grupo con Immunepotent CRP	Grupo sin Immunepotent CRP
No. pacientes = 43	25 (60%)	18 (40%)
Estadio patológico	2 (8%)	2 (11%)
I	13 (52%)	5 (28%)
II	4 (16%)	5 (28%)
III	6 (24%)	6(33%)
IV	25 (100%)	18 (100%)
Total=		
Marcadores tumorales	13 (52%)	10 (56%)
RE	8 (32%)	7 (39%)
RP	7 (28%)	6 (33%)
Her2	25 (100%)	18 (100%)
Total=		
Estatus del Karnofsky	1 (4%)	2 (12%)
0	24 (96%)	16 (88%)
1		
Tratamiento clínico	13 (52%)	18 (100%)
Cirugía	25 (100%)	18 (100%)
Quimioterapia	1 (4%)	7 (39%)
Radioterapia	8 (32%)	8(44%)
Hormonal		

7.1 Respuesta clínica por imagen

La respuesta clínica por imagen fue evaluada mediante estudios radiológicos estándar o PET-CT que permiten visualizar los cambios en el tamaño de la lesión comparando antes de iniciar el tratamiento con Immunepotent CRP y después de terminar los ciclos de quimioterapia. En el grupo que recibió Immunepotent CRP como adyuvante durante la quimioterapia se observó que en 15 pacientes (60%) se presentó una RC, 8 (32%) experimentaron una RP y 2 (8%) fueron NR (Tabla VI). En este grupo de acuerdo al estadio se observó que en el estadio I, 2 pacientes (100%) experimentaron una RC; de los pacientes en el estadio II, 9 (70%) experimentaron una RC y 4 (30%) experimentaron una RP; de los pacientes en el estadio III, 2 (50%) experimentaron una RC y 2 (50%) experimentaron una RP; de los pacientes en estadio IV, 2 (33%) experimentaron una RC, 2 (33%) una RP y 2 (33%) fueron NR.

En el grupo control (sin la terapia adyuvante con Immunepotent CRP durante la quimioterapia) se observó que 7 pacientes (39%) experimentaron una RC, 9 (50%) RP y 2 (11%) fueron no respondedores (Tabla VI). En este grupo de acuerdo al estadio se observó que en el estadio I, 2 pacientes (100%) experimentaron una RC; de los pacientes en el estadio II, 4 (80%) experimentaron una RC y solo 1(20%) paciente mostró una RP; en el estadio III, 1(20%) experimentaron una RC, 3(60%) una RP y 1(20%) fue NR; en el estadio IV, ninguno respondió completamente al tratamiento, en 5(83%) se observó una RP y 1(17%) fue NR.

7.1.1 Imágenes de PET-CT

En ambos grupos se evaluó mediante PET-CT la respuesta clínica, donde observamos que en el grupo con Immunepotent como adyuvante se observó regresión de las lesiones metastásicas en diversas localizaciones anatómicas. Sin embargo, como se observa en la figura 4a, una paciente con cáncer de mama metastásico sin terapia adyuvante presentó lesiones persistentes en tiroides y resistencia a la quimioterapia con una lesión nueva alrededor de la aorta (2 cm) después de 2 años de tratamiento oncológico (quimioterapia). En otro caso, la figura 4b, una paciente con metástasis retroperitoneal retrohepática tuvo una respuesta parcial con la misma actividad metabólica (6 SUV) sólo después de 4 meses de recibir el tratamiento con Immunepotent CRP y después de 5 ciclos de quimioterapia

Tabla VI. Respuesta clínica en pacientes con cáncer de mama

Estadio	Adyuvante (Immunepotent CRP)	Respuesta clínica	No. de pacientes
I	QT + Immunepotent CRP	CR	2 (100%)
	Solo QT	CR	2 (100%)
II	QT + Immunepotent CRP	CR	9 (70%)
		PR	4 (30%)
	Solo QT	CR	4 (80%)
		PR	1 (20%)
III	QT + Immunepotent CRP	CR	2 (50%)
		PR	2 (50%)
	Sólo QT	CR	1 (20%)
		PR	3 (60%)
		NR	1 (20%)
IV	QT + Immunepotent CRP	CR	2 (33%)
		PR	2 (33%)
		NR	2 (33%)
	Sólo QT	PR	5 (83%)
		NR	1(17%)

QT; quimioterapia, CR; respuesta completa, PR; repuesta parcial, NR; no respondedores

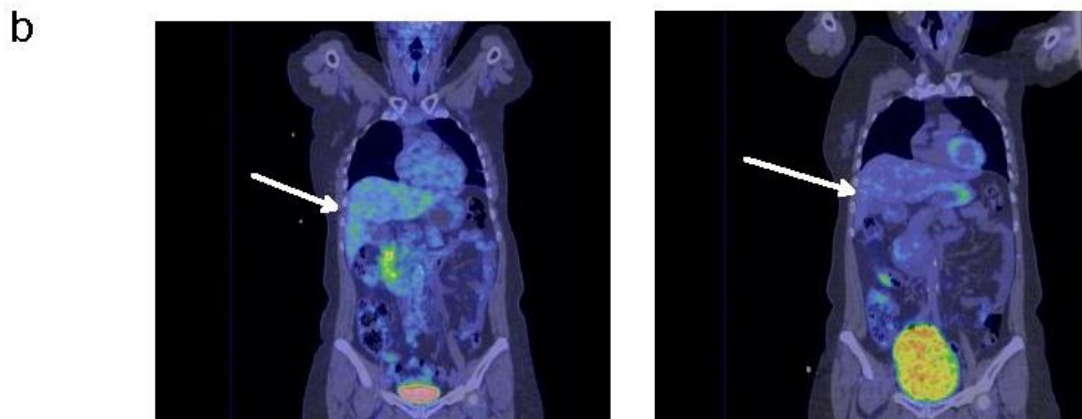
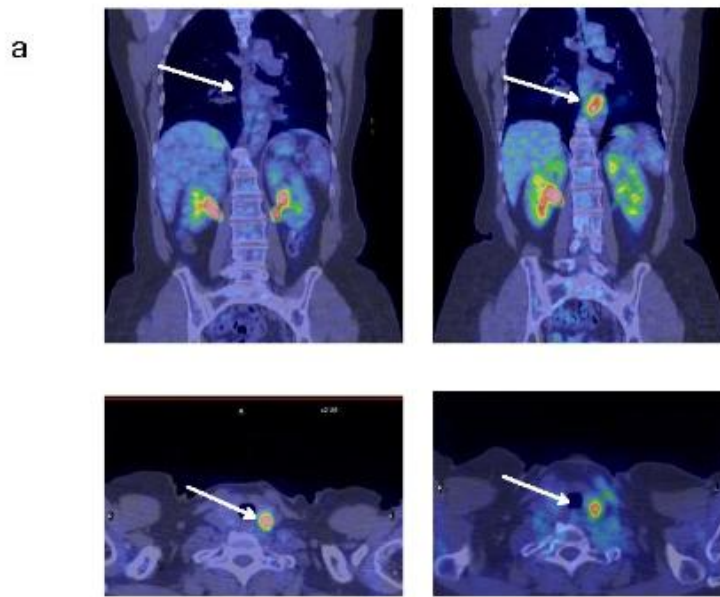


Figura 4. Efecto clínico del Immunepotent CRP en el estudio de imagen (PET-CT). a) En el grupo de control se observó una falta de respuesta de las lesiones en tiroides después de la quimioterapia sin Immunepotent CRP. b) Respuesta parcial en las lesiones retroperitoneales después del tratamiento de quimioterapia usando al Immunepotent CRP como adyuvante.

7.2 Calidad de vida (Karnofsky)

La calidad de vida se midió utilizando la escala de Karnofsky (KPS). En los pacientes que recibieron tratamiento adyuvante con Immunepotent CRP durante la quimioterapia, en promedio la KPS aumentó de 70 a 90, que refleja una mejora clínica general del estado de salud del paciente regresando a trabajar en la mayoría de los casos (Figura 5). En cambio la población control mantuvo la KPS en 80 antes y después del tratamiento con quimioterapia.

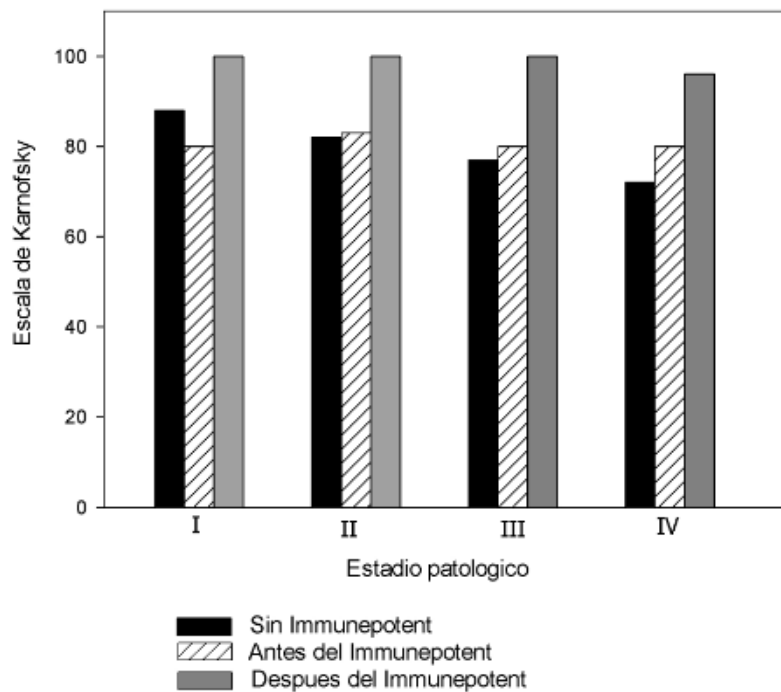


Figure 5. Escala de Karnofsky por estadio patológico en pacientes con cáncer de mama sin tratamiento adyuvante durante la quimioterapia y en el grupo que recibió el tratamiento adyuvante con Immunepotent CRP (antes y durante la quimioterapia).

7.3 Respuesta inmune

7.3.1 Perfil de linfocitos

Para evaluar los efectos del Immunepotent CRP como adyuvante de la quimioterapia en las poblaciones linfoides se analizaron las muestras obtenidas antes, durante, y finalizando los ciclos de quimioterapia en el grupo con Immunepotent CRP y en la población control únicamente fueron monitoreados durante los ciclos de quimioterapia.

El total de glóbulos blancos (WBC) antes de recibir el Immunepotent CRP y la quimioterapia fue $5,928 \pm 339 / \text{mm}^3$. Durante la quimioterapia con Immunepotent CRP, el número se redujo ligeramente a $5,554 \pm 374 / \text{mm}^3$ y en el grupo control fue de $4,779 \pm 435 / \text{mm}^3$. El porcentaje de monocitos, basófilos, eosinófilos y neutrófilos siempre fue reportado dentro del rango de valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio aún durante los ciclos de quimioterapia.

En los pacientes que recibieron el Immunepotent como adyuvante de la quimioterapia no mostraron mielosupresión de las poblaciones linfoides; mientras que los pacientes que recibieron la quimioterapia sin el adyuvante mostraron una disminución de los valores absolutos de las poblaciones de los linfocitos T (CD4^+ y CD8^+) y B (CD19^+) por debajo de la media de los valores de referencia (Razo *et al.*, 1996) (Figura 6,7 y 8).

Linfocitos T (CD4+)

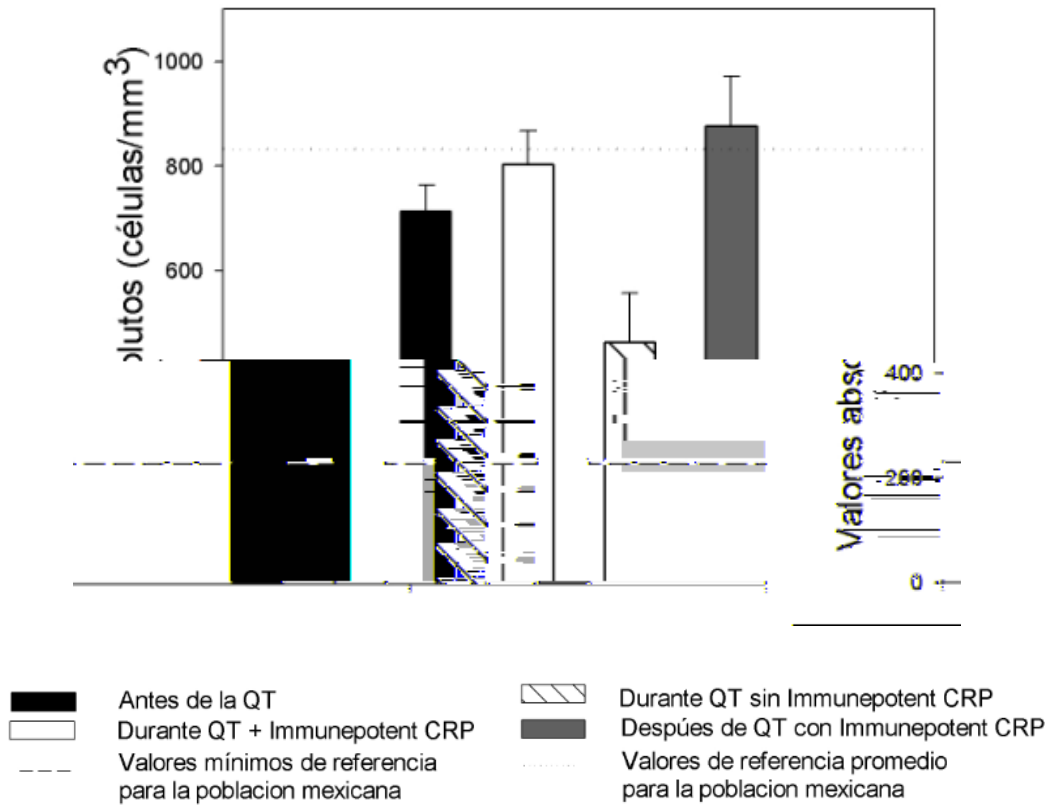


Figura 6. Efecto del Immunepotent CRP en la respuesta inmune en pacientes con cáncer de mama. Valores absolutos linfocitos T (CD4⁺), antes (t₁), durante quioterapia (t₂) y después (t₃) de quimioterapia con Immunepotent CRP. Cada barra representa la media de los pacientes ± error estándar.

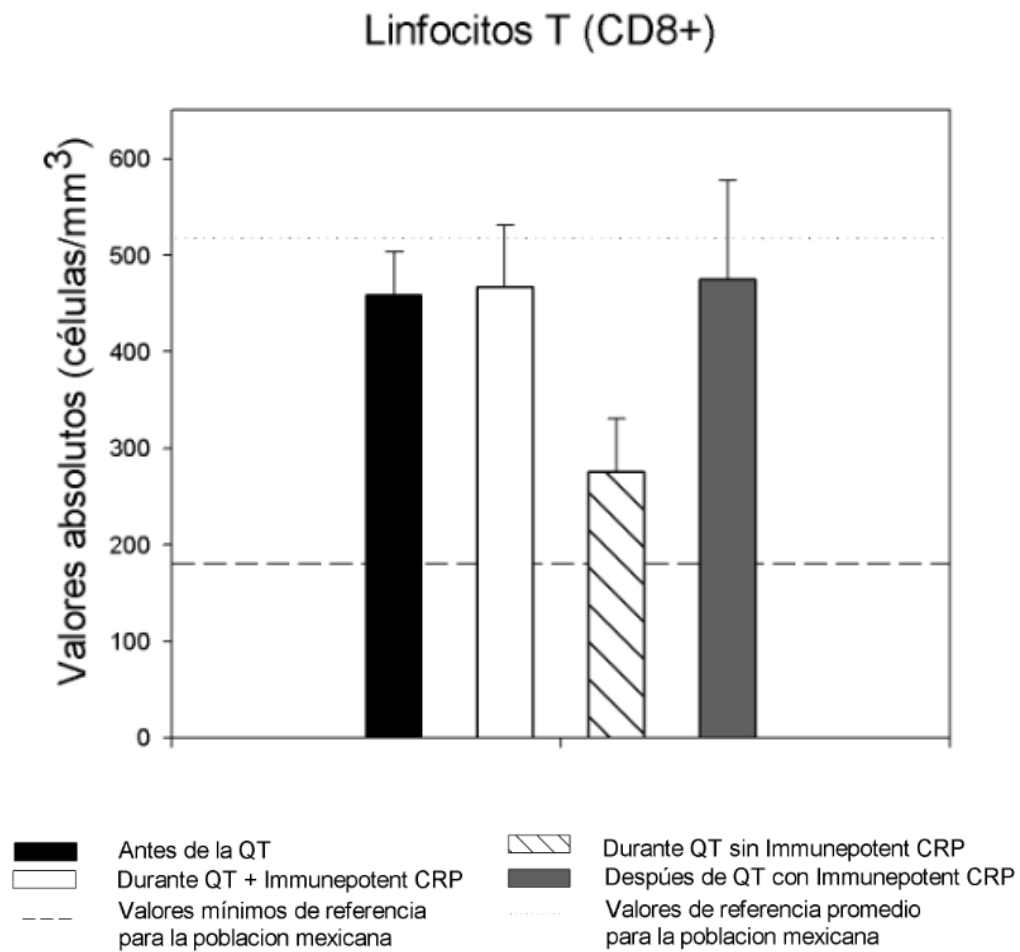


Figura 7. Efecto del Immunepotent CRP en la respuesta inmune en pacientes con cáncer de mama. Valores absolutos linfocitos T (CD8⁺), antes (t₁), durante quioterapia (t₂) y después (t₃) de quimioterapia con Immunepotent CRP. Cada barra representa la media de los pacientes ± error estándar.

Linfocitos B (CD19⁺)

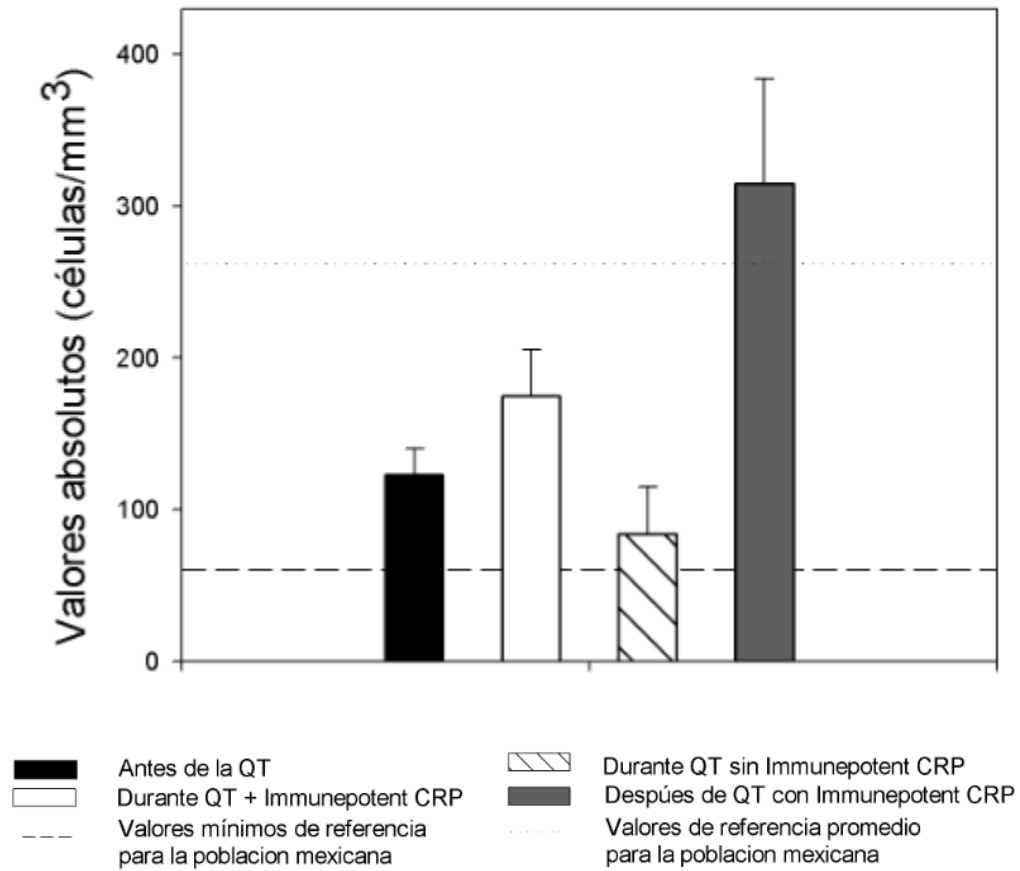


Figura 8. Efecto del Immunepotent CRP en la respuesta inmune en pacientes con cáncer de mama. Valores absolutos linfocitos B (CD19⁺), antes (t₁), durante quioterapia (t₂) y después (t₃) de quimioterapia con Immunepotent CRP. Cada barra representa la media de los pacientes ± error estándar.

Células NK (CD56-16⁺)

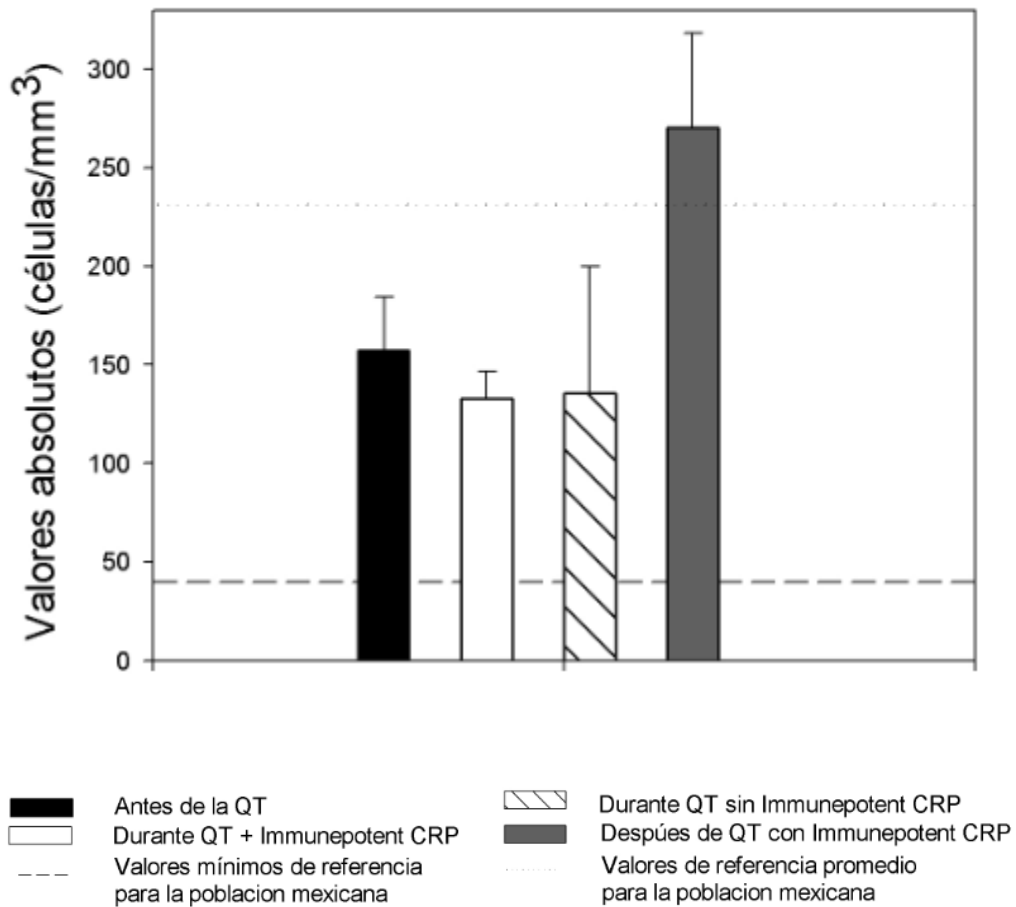


Figura 9. Efecto del Immunepotent CRP en la respuesta inmune en pacientes con cáncer de mama. Valores absolutos linfocitos NK (CD56-16⁺), antes (t₁), durante quimioterapia (t₂) y después (t₃) de quimioterapia con Immunepotent CRP. Cada barra representa la media de los pacientes ± error estándar.

Un dato importante fue el aumento significativo en el porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos B CD19⁺ (p <0,05) y células NK (p <0,05), que se observó un mes después de completar los ciclos de quimioterapia en los pacientes que recibieron el Immunepotent CRP como adyuvante (Tabla VII). Además se observó, que los pacientes con el adyuvante mantuvieron las poblaciones linfoides en rangos similares al estado inicial (T1) y siempre sobre el valor de referencia mínimo para la población mexicana (Razo *et al.*, 1996). De hecho, los valores de los pacientes tratados Immunepotent CRP se encontraron por encima de los encontrados en la población control (bajo quimioterapia) así como previamente fue reportado por Mackall *et al.*, 1994 para pacientes que estaban en tratamiento de quimioterapia.

Tabla VII. Poblaciones linfoides durante el tratamiento de quimioterapia

Tratamiento	Leucocitos	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺	CD56 ⁺ -16 ⁺
Antes del EDLb	5928 ± 339	713 ± 50	458 ± 46	123 ± 17	157 ± 27
Después del EDLb	5554 ± 374	877 ± 95	475 ± 102	314 ± 69	271 ± 48
Valor <i>p</i>	0.05	0.05	0.05	<0.05	<0.05

* Los valores individuales de las cifras representan la media de los pacientes ± error estándar. Los datos fueron analizados mediante la prueba *t student* para datos apareados donde la significancia estadística se muestra como p<0.05.

7.3.2 Immunepotent CRP y citocinas

7.3.2.1 Interleucina (IL) – 3 en suero

Se analizaron los sueros de pacientes con cáncer de mama sin tratamiento de quimioterapia y que recibían el tratamiento con quimioterapia. Los resultados muestran que la IL-3 es reducida un 80 % (0.7918 ± 0.07 vs. 0.1655 ± 0.04) durante los ciclos de quimioterapia, en la población bajo quimioterapia sin el tratamiento adyuvante. Sin embargo la IL-3 se reduce en menor medida (0.7918 ± 0.07 vs. 0.520 ± 0.039) (34%) en el grupo al cual se le administró el Immunepotent CRP durante los ciclos de quimioterapia (Figura 10).

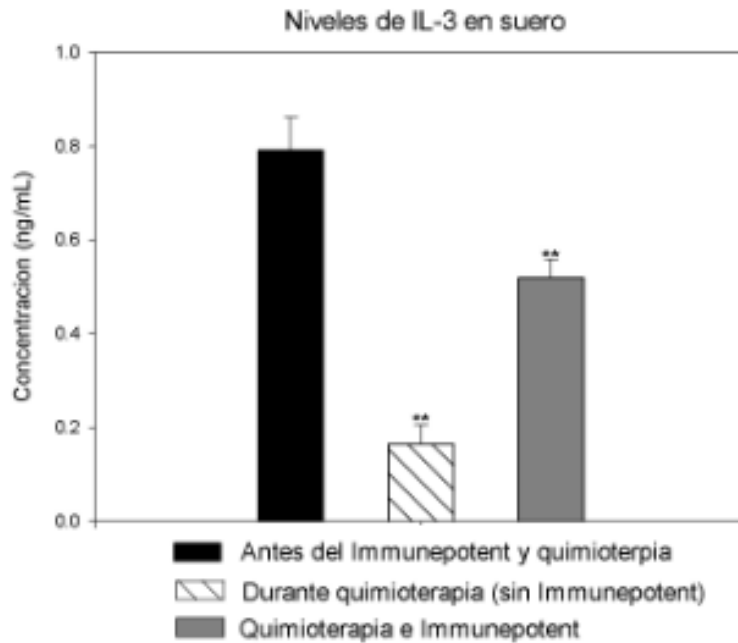


Figura 10. Concentración de IL-3 en el suero de pacientes con cáncer de mama con y sin el tratamiento adyuvante durante la quimioterapia. Cada barra representa la media del triplicado \pm error estándar. ** ($p < 0.01$)

7.3.2.2 Cuantificación de interleucina (IL) – 7 en suero

Se analizaron los sueros de pacientes con cáncer de mama sin tratamiento de quimioterapia y que recibían el tratamiento con quimioterapia. Los resultados muestran que la IL-7 se incrementó (0.7796 ± 0.0515 vs. 0.8773 ± 0.0386) (11%) en el grupo con Immunepotent como adyuvante de la quimioterapia. Además se observó una reducción del 30% (0.7796 ± 0.0515 vs. 0.5453 ± 0.0343) en el grupo control durante la quimioterapia contra antes de la quimioterapia (Figura 11).

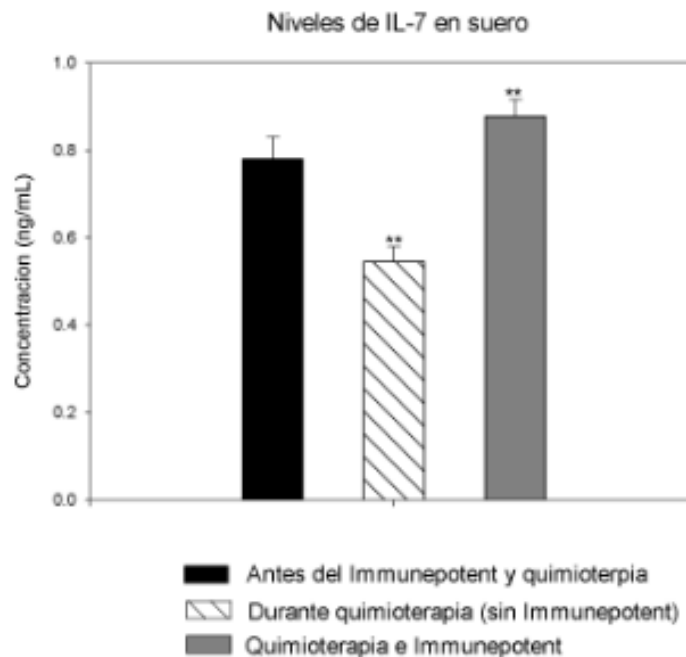


Figura 11. Concentración de IL-7 en el suero de pacientes con cáncer de mama con y sin el tratamiento adyuvante durante la quimioterapia. Cada barra representa la media del triplicado \pm error estándar. ** (p < 0.01)

8. DISCUSIÓN

Al Immunepotent CRP, que contiene EDLb, es un agente que mejora la respuesta inmunológica en pacientes con cáncer (Rodríguez-Padilla *et al.*, 2005; Franco-Molina *et al.*, 2008). En diferentes ensayos clínicos donde se utiliza el EDL como terapia adyuvante se informa una mejoría de la respuesta clínica al tratamiento, pero hay una falta de información sobre los parámetros clínicos que se han mejorado en los pacientes (Fujisawa *et al.*, 1985; Krown *et al.*, 1978 ;Vacek *et al.* 2005). En este estudio clínico se valoró la respuesta inmunológica y clínica al tratamiento con el Immunepotent CRP como adyuvante de la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama. En particular, el efecto protector del Immunepotent CRP en la respuesta inmune como terapia adyuvante durante la quimioterapia.

Los pacientes que recibieron el Immunepotent CRP como adyuvante de la quimioterapia tuvieron una respuesta clínica más favorable. La diferencia principalmente, se observó en la etapa III y IV en comparación con la respuesta clínica del grupo control (sin Immunepotent CRP). La mediana de supervivencia después de la aparición de metástasis es de aproximadamente 20-25 meses (Greenberg *et al.*, 1996), de ahí la importancia de obtener una respuesta clínica en el menor tiempo posible. Hemos observado que los pacientes con metástasis que recibieron el Immunepotent CRP fueron capaces de mejorar la respuesta clínica en meses (6-12 meses) en comparación con el grupo que no recibió terapia adyuvante con el Immunepotent CRP que era como se espera en

aproximadamente 2 a 3 años (datos no mostrados). Un factor que explicaría la reducción del tiempo de respuesta en los pacientes con Immunepotent CRP es la reducción de los efectos secundarios por la quimioterapia dando como resultado que reciban varios ciclos de quimioterapia sin suspender el tratamiento oncológico. Sin embargo, se requiere de estudios clínicos enfocados en la población que mejor reaccionó al tratamiento adyuvante (enfermedad metastásica) con un mayor número de pacientes para poder asegurar el efecto clínico del Immunepotent CRP.

Además se observó que el tratamiento con el Immunepotent CRP en combinación con quimioterapia resultó en el aumento de la escala de Karnofsky después de varios ciclos de quimioterapia, los pacientes alcanzaron en la KPS un 90, lo que implica síntomas menores y la capacidad de trabajar (Karnofsky *et al.*, 1948) en comparación con el grupo control (sin EDLb) que fue de 80 y que permanecieron sin trabajar en la mayoría de los casos.

Durante las entrevistas, se observó que los pacientes mejoraron en su estado de salud general y en el estado de ánimo, incluso un mes después de la quimioterapia. Por lo tanto, ayuda a reducir las pérdidas económicas, así como el sufrimiento físico que incapacita a los pacientes de cáncer.

La mielosupresión es un efecto secundario común de la quimioterapia que se acompaña de linfopenia, neutropenia y trombocitopenia. (Van der Most et al. 2008). En este trabajo, nuestros resultados muestran un efecto protector del Immunepotent CRP en linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, los linfocitos B CD19⁺ y células NK. Las cifras absolutas de estos linfocitos de los pacientes tratados con el Immunepotent CRP durante la quimioterapia (Fig. 6-9) fueron siempre sobre los números absolutos previstos en comparación con el grupo de control y según lo reportado por Mackall (1994) para los pacientes sometidos a quimioterapia; donde se reportó posterior a la quimioterapia sistémica una disminución mayor del 60% en las células T (CD4⁺), con más del 90% de pérdida en las células *naive* (CD4⁺CD45RA⁺), donde los niveles no regresaron a la normalidad hasta después de 18 meses sin tratamiento (Mackall *et al.*, 1994).

Estudios sobre el efecto de la quimioterapia en la respuesta inmune reportan principalmente una reducción selectiva de las células T CD4⁺, con un efecto pronunciado en las células *naive*, mientras que los linfocitos T de memoria no se ven tan afectados (Solomayer *et al.*, 2003). En este trabajo se encontró únicamente el efecto protector sobre este tipo de células (CD4⁺) sin embargo, en estudios posteriores se recomienda evaluar, si las poblaciones que se protegen durante el tratamiento con Immunepotent son células *naive* o de memoria.

Nosotros al observar que nuestras poblaciones linfoides eran protegidas de la linfo-depleción mediante el uso del Immunepotent CRP como adyuvante de la quimioterapia, decidimos probar si este efecto era debido a una estimulación indirecta por citocinas como la IL-3 que estimulan la proliferación de CFS-GM, basados en estudios previos realizados por Vacek usando EDL-porcino. Además se estudió la IL-7 que se reporta como una citocina involucrada en la diferenciación linfoide encontrando que los niveles de IL-3 e IL-7 fueron mayores en el grupo que recibió el Immunepotent CRP como adyuvante de la quimioterapia que los encontrados en el grupo control; como previamente había sido reportado al administrar el EDL-porcino en ratones radiados (Vacek *et al.*, 2005). Lo que demuestra el posible efecto de protección ejercido por el Immunepotent CRP en los pacientes que reciben quimioterapia citotóxica (Mackall *et al.*, 2007) (Lara *et al.*, 2010).

9. CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros resultados con la administración del Immunepotent CRP como terapia adyuvante de la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama demuestran que puede ser usado especialmente para restaurar la respuesta inmunológica en pacientes con inmunosupresión, además de mejorar la calidad de vida durante el tratamiento. Por ello proponemos el uso del Immunepotent CRP como adyuvante para complementar las quimioterapias convencionales en cáncer de mama ya que es útil en mejorar la respuesta inmunológica, la sintomatología y mejorar el pronóstico general del paciente.

ANEXO I

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo entiendo que la participación en este estudio es voluntaria. Yo se que soy libre de retirarme en cualquier momento. La decisión de no participar o de retirarme no afectará el tratamiento posterior, o su atención médica en esta institución. También entiendo que el investigador a cargo de este estudio puede decidir en cualquier momento que yo no participe en el estudio.

Por firmar esta forma de consentimiento informado, acepto la valoración durante el estudio de mi estatus clínico cediendo las imágenes a esta institución (realizadas previamente y durante el estudio). Además acepto la valoración inmunológica mediante el perfil de linfocitos y permito la medición de citocinas en el suero.

No tengo ningún interés económico al formar parte del estudio, comprendiendo que no recibiré dinero por parte de la institución al ingresar al estudio.

Firmo este consentimiento sin haber estado sujeto (a) a ningún tipo de presión para hacerlo:

Nombre y Firma del participante

Dra. Liliana Ixtepan
(Encargado de explicar el estudio)

Testigo 1
(Familiar del participante)

Fecha: _____

10. LITERATURA CITADA

- Alvarez-Tull and Kirkpatrick C.H. "Profiles of cytokines in recipients of transfer factors." Biotherapy (1996).
- Atzpodien, J."Rapid deterioration in quality of life during interleukin-2- and alpha-interferon-based home therapy of renal cell carcinoma is associated with a good outcome." Br.J.Cancer 89.1 (2003): 50-54.
- Ayala-de la Cruz MC, Rodriguez-Padilla C, Tamez-Guerra R. XIth International Congress on Transfer Factor. The Transfer Factor in the Management of a Case of Encephalitis Caused By *Coccidioides Immitis*. (1996).
- Ballow, M., Dupont, B., Hansen, J. A., and Good, R. A. Transfer factor therapy: evidence for nonspecificity. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1975; 11:457-461.
- Berger, A. M. "Patterns of fatigue and activity and rest during adjuvant breast cancer chemotherapy." Oncol.Nurs.Forum 25.1 (1998): 51-62.
- Bloom B.R. "Does transfer factor act specially or as immunologic adyuvant?". *N Engl J Med.* 288 (1980): 908-9
- Bray F, McCarron P, Parkin DM (2004) The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res* 6: 229–239
- Bruera, E. "ABC of palliative care. Anorexia, cachexia, and nutrition." BMJ 315.7117 (1997): 1219-22.
- Cáncer de Mama, National Cancer Institute. EE.UU. Publicación de los NIH 04–1556S Enero de 2004, Pag. 19-25
- Cannon- Albright LA, Skolnick MH. The genetics of familial breast cancer. *Sem in Oncol* 1996; 23 (Suppl): 1.
- Cardenas-Sanchez J., Sandoval Guerrero F., Segunda revisión del Consenso Nacional sobre el diagnóstico y tratamiento del Cáncer mamario. *National Consensus on Diagnosis and Breast Cancer Therapy: Second Revision (2005):* Gamo Vol. 5 Suplemento 2
- Cleeland, C. S. "The impact of pain on the patient with cancer." Cancer 54.11 Suppl (1984): 2635-41.

- Colditz G, Baer H, Tamimi R. *Epidemiology of Breast Cancer*. New York: Oxford University Press, 2005.
- Connolly JL, Schnitt SJ. Benign breast disease. Resolved and unresolved issues. *Cancer* 1993 Feb 15;71(4):1187-9.
- Curtin, N. J., Harris, A. L., and Aherne, G. W. Mechanism of cell death following thymidylate synthase inhibition: 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate accumulation, DNA damage, and growth inhibition following exposure to CB3717 and dipyridamole. *Cancer Res.* 1991; 51:2346-2352.
- Daling JR, Malone KE, Voigt LF. Risk of breast cancer among young women: Relationship to induced abortion. *J Natl Cancer Inst* 1994;86: 1584-1592.
- DeNardo, D. G. and L. M. Coussens. "Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression." *Breast Cancer Res.* 9.4 (2007): 212.
- Dinarello CA: The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25:307-313, 2006
- Dudley, M. E."Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma." *J.Clin.Oncol.* 23.10 (2005): 2346-57.
- Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;365:1687-717. 2008. Ref Type: Generic
- Fabre, R. A."Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis." *Clin.Exp.Immunol.* 136.2 (2004): 215-23.
- Ferlay J, Bray.F, Sankila.R, Parkin.DM. *EUCAN: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence in the European Union 1998, version 5.0.*IARC Cancer Base N0.4.Lyon,IARC Press,(1999). 2008. Ref Type: Generic
- Fernandez Ortega., "Extracto Dializable de Leucocitos obtenido de células inducidas". Identificación de blancos moleculares de acción y aplicaciones clínicas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. (2001)
- Fossati R, Confalonieri C, Torri V, Ghislandi E, Penna A, Pistotti V, Tinazzi A, Liberati A. Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer: a systematic review of published randomized trials involving 31,510 women. *Clin Oncol* 1998; 16:3439–3460.

- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. "Bovine dialyzable leukocyte extract modulates the nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated murine peritoneal macrophages in vitro." J.Med.Food 8.1 (2005): 20-26.
- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. "Bovine dialyzable leukocyte extract protects against LPS-induced, murine endotoxic shock." Int.Immunopharmacol. 4.13 (2004): 1577-86.
- Franco Molina, M.A, Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Villarreal-Treviño L, Tijerina-Menchaca R, Castillo-León L, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C. "In vitro antibacterial activity of bovine dialyzable leukocyte extract". Inmunotoxicology. 28 (2006): 471–83.
- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. "In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells." Cytotherapy. 8.4 (2006): 408-14.
- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernandez D, Zapata-Benavides P, Castillo-León L, Isaza-Brando C, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. "In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells." Cytotherapy. 8.4 (2006): 408-14.
- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Vera-García ME, García de la Fuente A, Garza RG, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. "IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients." Cytotherapy. 10.5 (2008): 490-96.
- Franz Solomayer, Erich. Influence of Adjuvant Hormone Therapy and Chemotherapy on the Immune System Analysed in the Bone Marrow of Patients with Breast Cancer. Clinical Cancer Research 9, 174–180, 2003
- Fry TJ, Mackall CL: Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? Trends Immunol 22:564-571, 2001
- Fudenberg, H. H. "Dialyzable transfer factor in the treatment of human osteosarcoma: an analytic review." Ann.N.Y.Acad.Sci. 277.00 (1976): 545-57.
- Fujisawa T: Transfer factor immunotherapy as an adjunct to surgery in lung cancer. Nihon Kyoju Shikkan Gakkai Zasshi 23: 68-73, 1985.
- Fung-Kee-Fung, M. "Development of communities of practice to facilitate quality improvement initiatives in surgical oncology." Qual.Manag.Health Care 17.2 (2008): 174-85.

- Gammon M, Hiboosh H, Terry MB, et al: Oral contraceptive use and other risk factors in relation to HER-2/neu overexpression in breast cancer among young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:413-419.
- Gennari A, Bruzzi P, Orlandini C, Salvadori B, Donati S, Landucci E, Guarneri V, Rondini M, Ricci S, Conte P. Activity of first line epirubicin and paclitaxel in metastatic breast cancer is independent of type of adjuvant therapy. *Br J Cancer* 2004; 90:962–967.
- Goldenberg, G. J. and L. J. Brandes. "In vivo and in vitro studies of immunotherapy of nasopharyngeal carcinoma with transfer factor." *Cancer Res.* 36.2 pt 2 (1976): 720-23.
- Goust, J.M. and Fudenberg, H.H. "T cell binding to B lymphoid cell lines in humans: a marker for T-B cell interaction". *Journal Methods* 59 (1983):129-38.
- Greenberg P, Hortoba'gyi G, Smith T. Long-term follow-up of patients with complete remission following combination iv26 chemotherapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2197–2205.
- Guarneri V and Franco-Conte P. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2004); 31 (Suppl. 1): S149–S161
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg. "The hallmarks of cancer." *Cell* 100.1 (2000): 57-70.
- Harris J, Morrow M, Norton L. Malignant tumors of the breast cancer, In DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds): Principles and practice of oncology. Philadelphia, PA, Lippincott, 1997 pp 1557-1616.
- Hassett MJ, O'Malley AJ, Pakes JP, Newhouse JP, Earle CC. Frequency and Cost of Chemotherapy-Related Serious Adverse Effects in a Population Sample of Women with Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 98, No. 16, August 16, 2006
- Haynes, N. M. "Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept." *Curr.Opin.Immunol.* 20.5 (2008): 545-57.
- Hayward JL, Carbone PP, Heuson JC. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer: a project of the Programme on Clinical Oncology of the International Union Against Cancer, Geneva, Switzerland. *Cancer* 39:1289-1294, 1977
- Henderson B.E. PMCRRK. Epidemiology and risk factors. In Bonadonna G. (ed): Breast Cancer: Diagnosis and Management, pp 15-33. Chichester, John Wiley & Sons. 2008
- Henderson R, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hilda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* (1988) 48;246.

- Howe GR, Hirohata T, Hislop TG. Dietary factors and risk of breast cancer: Combined analysis of 12 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* (1990) 82: 561
- Inmunología celular y molecular, Abbas ,Lichyman 5ª. Edición, Saunders pag.402-403
Manual de Patología Estructural y Funcional, Robbins, Cotran, Kumar, Collins, 6ª. Edición, McGraw-Hill pag.182
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., and Thun, M. J. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008; 58:71-96.
- Karnofsky, D. A., W. H. Abelmann, and L. F. Craver. "The use of the nitrogen mustards in paliative treatment of carcinoma." *Cancer* 1 (1948): 634-56.
- Kasper, C. E. "Sarcolemmal disruption in reloaded atrophic skeletal muscle." *J.Appl.Physiol* 79.2 (1995): 607-14.
- Kasper, C. E. and L. P. Sarna. "Influence of adjuvant chemotherapy on skeletal muscle and fatigue in women with breast cancer." *Biol.Res.Nurs.* 2.2 (2000): 133-39.
- Kirkpatrick, C.H. "Structural nature and functions of transfer factors". *Ann NY Acad Sci* 685 (1993); 362-8.
- Kirkpatrick, C. H. "Transfer of cellular immunity with transfer factor." *J.Allergy Clin Immunol.* 63.2 (1979): 71-73.
- Krown SE, Pinsky CM, Hirshaut Y, Hansen JAand Oettgen HF: Effects of transfer factor in patients with advanced cancer. *Isr JMed Sci* 14: 1026-1038, 1978.
- Lake, R. A. and R. G. van der Most. "A better way for a cancer cell to die." *N.Engl.J.Med.* 354.23 (2006): 2503-04.
- Lang I, Nekan K, Gergely P y G Petranyi. Effect of in vivo and in vitro treatment with dializable leokocyte extracts on human natural killer activity. *Clinical Immunology and Inmunopathology* . 25(1982): 139-144.
- Lawrence, H. S. and W. Borkowsky. "Transfer factor--current status and future prospects." *Biotherapy* 9.1-3 (1996): 1-5.
- Leung J. S. "Chemotherapy for non-small-cell cancer: cost and toxicity?" *Hong.Kong.Med.J.* 5.3 (1999): 305.
- Lissoni P., Brivio F., Fumagalli L., Messina G., Ghezzi V., Frontini L., Giani L., Vaghi M., Ardizzoia A., Gardani G.S. "Efficacy of cancer chemotherapy in relation to the pretreatment number of lymphocytes in patients with metastatic solid tumors." *Int.J.Biol.Markers* 19.2 (2004): 135-40.

- Lissoni P., Brivio F., Fumagalli L., Messina G., Porro G., Rovelli F., Vigoré L., Tisi E. and Dámico G. "Effects of the Conventional Antitumor Therapies surgery, Chemotherapy, Radiotherapy and Immunotherapy on Regulatory T Lymphocytes in Cancer Patients." Anticancer Research 29 (2009): 1847-52.
- Longnecker MP: The Framingham results on alcohol and breast cancer. Am J Epidemiol 1999; 149:102-105.
- Luna-Baca, G. A., Linares M., Santacruz-Valdes C., Aguilar-Velazquez G., Chavez R., Perez-Tapia M., Estrada-Garcia I., Estrada-Parra S. and Jimenez-Martinez M.C. "Immunological Study of Patients With Herpetic Stromal Keratitis Treated With Dialyzable Leukocyte Extracts". 13th International Congress of Immunology 2007.
- Luqmani, Y.A. Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy . Med Princ Pract 2005; 14 (suppl 1):35–48
- Mackall, C. L., Fleisher TA, Brown MR, Magrath IT, Shad AT, Horowitz ME, Wexler LH, Adde MA, McClure LL, Gress RE. "Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer." Blood 84.7 (1994): 2221-28.
- Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. J Natl Cancer Inst 1995 Nov 15;87(22):1681-5.
- Mamounas EP. Continuing evolution in breast cancer surgical management. J Clin Oncol 2005 Mar10;23(8):1603-6.
- Masur H, Ognibene FP, Yarchoan R. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. Ann Intern Med 111:223-231, 1989
- Mattsson A, Leitz W, Rutqvist LE. Radiation risk and mammographic screening of women from 40 to 49 years of age: effect on breast cancer rates and years of life. Br J Cancer 2000 Jan;82(1):220-6.
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ 2000 Sep 9;321(7261):624-8.
- Mendoza-Gamboa, E., Franco-Molina MA, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Vera-García ME, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. "Bovine dialyzable leukocyte extract modulates AP-1 DNA-binding activity and nuclear transcription factor expression in MCF-7 breast cancer cells." Cytotherapy. 10.2 (2008): 212-19.
- Meier CR, LoBuglio AF: Transfer factor: a potential agent for immunotherapy of cancer. World J Surg 1:617-623, 1977
- Miller, J. M. "Breast cancer statistics." Mayo Clin.Proc. 55.9 (1980): 585.

- Morrow M, Foster RS. *Staging of breast cancer a new nationale for internal mammary node biopsy.* *Arch Surg* 116: 748, 1981
- Moss, R. W. "Cancer and complementary and alternative medicine in Italy: personal observations and historical considerations." *Integr.Cancer Ther.* 3.2 (2004): 173-88.
- Nabholtz JM, Senn HJ, Bezwoda WR, Melnychuk D, Deschenes L, Douma J, Vandenberg TA, Rapoport B, Rosso R,Trillet-Lenoir V, Drbal J, Molino A, Nortier JW, Richel DJ, Nagykalnai T, Siedlecki P, Wilking N, Genot JY, Hupperets PS, Pannuti F, Skarlos D, Tomiak EM, Murawsky M, Alakl M, Aapro M. Prospective randomized trial of docetaxel versus mitomycin plus vinblastine in patients with metastatic breast cancer progressing despite previous anthracycline-containing chemotherapy. 304 Study Group. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1413–1424.
- Narod SA. Modifiers of risk of hereditary breast cancer. *Oncogene* 2006 Sep 25;25(43):5832-6.
- Oettgen, H. F., Old L.J., Farrow J. H., Valentine F. T., Lawrence H. S., and Thomas L. "Effects of dialyzable transfer factor in patients with breast cancer." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 71.6 (1974): 2319-23.
- Ojeda, M. O., van't Veer C, Fernández Ortega CB, Araña Rosainz M de J, Buurman WA. "Dialyzable leukocyte extract differentially regulates the production of TNFalpha, IL-6, and IL-8 in bacterial component-activated leukocytes and endothelial cells." *Inflamm.Res.* 54.2 (2005): 74-81.
- O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S, Moiseyenko V, Ayoub JP, Cervantes G, Fumoleau P, Jones S, Lui WY, Mauriac L, Twelves C, Van Hazel G, Verma S, Leonard R. Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase III trial results. *J Clin Oncol* 2002; 20:2812–2823.
- O'Shaughnessy J, Nag S, Calderillo-Ruiz G, Jordaan J, Llombart A, Pluzanska A, Pawlicki M, Reyes JM, Sekhon J, Albain KS. Gemcitabine plus paclitaxel (GT) versus paclitaxel (T) as first-line treatment for anthracycline pre-treated metastatic breast cancer (MBC): interim results of a global phase III study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22:7.
- Partridge Ann H., Burstein Harold J., Winer Eric P., Side Effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Therapy in Women With Early-Stage Breast Cancer. *Journal of Natl Cancer Inst Monogr* (2001): 30:135–42.
- Pawan KS, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998; 339:900–905.
- Pineda, B., Estrada-Parra S., Pedraza-Medina B., Rodriguez-Ropon A., Perez R., Arrieta O. "Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma." *J.Exp.Clin Cancer Res.* 24.4 (2005): 575-83.

- Pizza, G., De Vinci C, Cuzzocrea D, Menniti D, Aiello E, Maver P, Corrado G, Romagnoli P, Dragoni E, LoConte G, Riolo U, Palareti A, Zucchelli P, Fornarola V, Viza D. "A preliminary report on the use of transfer factor for treating stage D3 hormone-unresponsive metastatic prostate cancer." Biotherapy 9.1-3 (1996): 123-32.
- Pronzato P, Rondini M: First line chemotherapy of metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 17 Suppl 5:v165-v168, 2006.
- Razo D, García J, Llorente L: Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo. *Rev Mex Patol Clin* 43:21-26, 1996.
- Robbins, Cotran, Kumar, Collins. *Manual de Patología Estructural y Funcional*. 6ª. Edición, McGraw-Hill pag.155, 2001
- Rockhill B, Weinberg CR, Newman B. Population attributable fraction estimation for established breast cancer risk factors: considering the issues of high prevalence and unmodifiability. *Am J Epidemiol* 1998 May 1;147(9):826-33.
- Rodriguez-Balderrama I, Perez-Martinez PY, Jimenez-Gonzalez GA et al. "Uso del factor de transferencia en recién nacidos con choque séptico". *Med Univ*. 7 (2000):125-30.
- Rodriguez Flores, J. M. "Non surgical treatment of a Class II malocclusion with skeletal hyperdivergency and anterior open bite." *Int.J.Orthod.Milwaukee*. 20.1 (2009): 15-22.
- Rodriguez-Flores, A., Castillo-Juarez P., Vazquez D., Gonzalez-Guzman R, Rico-Martinez G. and Estrada-Parra S. "Immunological evaluation of patients with osteosarcoma received adjuvant treatment with specific Transfer Factor." *The Journal of Immunology* 182.41 (2009): 63.
- Rodriguez-Padilla C, García de la Fuente A, Díaz R, et al.: Intra-arterial Chemo Inmuno Target Teraphy Plus Conformal XRT in Brain Tumors. Presented at the 16th International Congress on Anti-Cancer Treatment, 2005
- Rodriguez-Padilla, C., García de la Fuente A., Diaz R., Ixtepan-Turrent L., Treviño J.H., Tamez-Guerra R."Trans-Arterial Chemoembolization (TACE) With Bevacizumab (Avastin), Cetuximab (Erbix) and Immunomodulators and Image-Guided Radiation Therapy (IGRT) in Patients With Lung Cancer". 19th International Congress on Anti-Cancer Treatment Paris, France: 2008.
- See, D., S. Mason, and R. Roshan. "Increased tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and natural killer cell (NK) function using an integrative approach in late stage cancers." *Immunol.Invest* 31.2 (2002): 137-53.
- Séptima Conferencia Internacional sobre terapia adyuvante del cáncer de mama, Asociación Mexicana de Mastectomía febrero 21– 24 2001 St Gallen, Suiza

- Shapiro, C. L. and A. Recht. "Side effects of adjuvant treatment of breast cancer." N.Engl.J.Med. 344.26 (2001): 1997-2008.
- Sillero-Arenas M, Delgado-Rodriguez M, Rodriguez-Canteras R, et al. Menopausal hormone replacement therapy and breast cancer: meta-analysis . *Obstet Gynecol* (1992) 79:286.
- Sjostrom J, Blomqvist C, Mouridsen H, Pluzanska A, Ottosson-Lonn S, Bengtsson NO, Ostenstad B, Mjaaland I, Palm-Sjovall M, Wist E, Valvere V, Anderson H, Bergh J. Docetaxel compared with sequential methotrexate and 5-fluorouracil in patients with advanced breast cancer after anthracycline failure: a randomised phase III study with crossover on progression by the Scandinavian Breast Group. *Eur J Cancer* 1999; 35:1194–1201.
- Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, et al: Alcohol and breast cancer in women: A pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 1998;279:535-540.
- Song, X., Fowler, R., Ruiz, K., Hurley, D., and Barron, R. L. Impact of neutropenic complications on short-term disability in patients with cancer receiving chemotherapy. *J Med Econ.* 2009;
- Spitler, L. E. Clinical Uses of Transfer Factor. *Calif Med.* (1973) 118:47.
- Steinbergk , Thacker S, Smith S et al. A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. *JAMA* (1991) 256:1985.
- Stewart, B. W. and A. S. Coates. "Cancer prevention: a global perspective." J.Clin.Oncol. 23.2 (2005): 392-403.
- Strobl B, Arulampalam V, Is'harc H, *et al.*: A completely foreign receptor can mediate an interferon-gamma-like response. *EMBO J* 20:5431-5442, 2001
- Tahara, H. and M. T. Lotze. "Antitumor effects of interleukin-12 (IL-12): applications for the immunotherapy and gene therapy of cancer." Gene Ther. 2.2 (1995): 96-106.
- Vacek, A., Hofer M., Holá J., Weiterová L., Streitová D., Svoboda J. "The role of G-CSF and IL-6 in the granulopoiesis-stimulating activity of murine blood serum induced by perorally administered ultrafiltered pig leukocyte extract, IMUNOR." Int.Immunopharmacol. 7.5 (2007): 656-61.
- Vacek, A., Hromas H., Hofer M. , Lukšíková E. , Svoboda J. and Schneiderová H. "Hemopoiesis-stimulating effects and enhanced survival of irradiated mice after peroral or intraperitoneal administration of ultrafiltered pig leukocyte extract (UPL, IMUNOR)." Immunopharmacol.Immunotoxicol. 24.4 (2002): 651-64.

- Vacek, A., Hofer M., Schneiderová H. and Svoboda J. "Ultrafiltered pig leukocyte extract (UPLE, IMUNOR) potentiates hematopoiesis-stimulating effects of G-CSF in vitro and improves the outcome of treatment of hematopoietic radiation damage in mice with G-CSF." Immunopharmacol.Immunotoxicol. 27.4 (2005): 647-59.
- van der Most, R. G., Currie A.J., Robinson B.W., Lake R.A. "Decoding dangerous death: how cytotoxic chemotherapy invokes inflammation, immunity or nothing at all." Cell Death.Differ. 15.1 (2008): 13-20.
- Whyte R.I., Schork M.A., Sloan H."Adjuvant treatment using transfer factor for bronchogenic carcinoma: long-term follow-up". *Ann Thorac Surg.* 53 (1992): 809-17.
- Wilson, G. B., Paddock G.V., Floyd E., Newell R.T., Dopson M.H."Dialyzable leukocyte extracts contain thymosin." Thymus 6.3 (1984): 167-80.
- Wooster R, Nauhausen SL and Mangion J. Localization of breast cancer susceptibility gene BRCA 2 to chromosome 13q 12-13. *Science* 1994; 265:2088.
- Yuying, W., L. Zhenxiang, and P. Lissoni. "TF, Psoriasis and Cytokines". International Congress on Transfer Factor 1999.
- Zamble DB, Lippard SJ: Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends BiochemSci* 1995; 20: 435–439.
- Zamora-Avila, D. E., Zapata-Benavides P., Franco-Molina M.A., Saavedra-Alonso S., Trejo-Avila L.M., Reséndez-Pérez D, Méndez-Vázquez J.L., Isaias-Badillo J. and Rodríguez-Padilla C. "WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth." Cancer Gene Ther. (2009).
- Zumoff B. Hormonal profiles in women with breast cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1994 Dec;21(4):751-72.

RESUMEN CURRICULAR

Elsa Nancy Garza Treviño

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología

Tesis: EFECTO DEL IMMUNEPOTENT CRP EN LA RESPUESTA CLÍNICA E
INMUNOLOGICA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 11 de agosto de 1984,
hija de Gerardo Javier Garza Garza y Elsa Nora Treviño de Garza.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido
Químico Clínico Biólogo en 2006

Experiencia Profesional: Asistente de Investigación del Laboratorio de Medicina Molecular
y Terapia Celular en el Hospital y Clínica OCA Agosto 2006 - Diciembre 2007

Clinical and immunological assessment in breast cancer patients receiving anticancer therapy and bovine dialyzable leukocyte extract as an adjuvant

HUMBERTO H. LARA*, LILIANA IXTEPAN TURRENT*, ELSA N. GARZA-TREVIÑO, REYES TAMEZ-GUERRA and CRISTINA RODRIGUEZ-PADILLA

Laboratorio de Inmunología y Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Nuevo Leon, Mexico

DOI: 10.3892/etm_XXXXXXX

Abstract. Dialyzable leukocyte extract (DLE) is one of the immunological agents used as an adjuvant in cancer therapy; it has been associated with improved quality of life during cancer chemotherapy. Based on these previous findings and on the observed clinical benefits attributed to DLE in other types of cancer, we investigated its clinical and immunological effects as a therapy adjuvant on breast cancer patients who received only chemotherapy, as compared to patients administered bovine DLE (bDLE) as an adjuvant. This study included 43 breast cancer patients who were about to begin chemotherapy. This group was divided as follows: 25 received chemotherapy and bDLE as an adjuvant therapy, and 18 received only chemotherapy without the adjuvant. All patient clinical and immunological responses were monitored. Among patients in the group that received bDLE as adjuvant, 60% showed a complete response, 32% showed a partial response and 8% did not respond. By contrast, in the group without the adjuvant, 39% showed a complete response, 50% displayed a partial response and 11% were non-responders. In addition, bDLE treatment in combination with chemotherapy resulted in the enhancement of the Karnofsky performance scale during chemotherapy. Even though patients underwent several cycles of chemotherapy without bDLE, the lymphocyte population dropped to below the reference value. On the other hand, in patients with bDLE as adjuvant, the CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes and the B lymphocytes were maintained

within the median range of the reference value. The number of natural killer cells also increased after chemotherapy treatment with bDLE as an adjuvant. In conclusion, bDLE treatment contributes to significant immunological recovery in patients that have undergone heavy chemotherapy, increasing the clinical response and quality of life during chemotherapy.

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy and the principal cause of cancer-related death among women globally (1). Statistics show that each year there are over 1.1 million women newly diagnosed with breast cancer worldwide. Each year 410,000 women die from the disease (2). The total cost of illness for breast cancer has been estimated at \$3.8 billion, of which \$1.8 billion represents medical care due to side effects during treatment. Among women who received chemotherapy this equated to more than \$1,200 in additional health care expenditures related to chemotherapy and more than \$17,000 in additional costs for ambulatory care as compared to women who did not receive chemotherapy (3).

Today, it is well known that anticancer treatment by surgery, radiotherapy or chemotherapy has improved the prognosis of the disease and has increased survival. In breast cancer, antineoplastic chemotherapy has improved the overall clinical response. The administration of taxane has increased the response rate from 50 to 68%; with the combination of epirubicin and paclitaxel the overall response rate is 66% (4).

However, various side effects have been associated with chemotherapy and radiotherapy. These side effects, not only affect the tumor, but also target bone marrow activity and divide lymphocytes causing lymphocytopenia (5) which may induce subsequent clinical immunodeficiency (6). Chemotherapeutic drugs produce T-cell depletion, which is more severe in CD4⁺ than in CD8⁺ T lymphocytes, a decrease in the dendritic cell function and an alteration in the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines.

Antineoplastic chemotherapy also induces side effects such as fatigue (7,8), skeletal muscle wasting and atrophy (9), as well as elevated levels of tumor necrosis factor, inactivity and weight loss. In 1948, Karnofsky developed a performance

Correspondence to: Dr Humberto H. Lara, Laboratorio de Inmunología y Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Edificio C, 3er piso, Facultad de Ciencias Biologicas S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 66451, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon, Mexico
E-mail: dr.lara.v@gmail.com

*Contributed equally

Key words: dialyzable leukocyte extract, immunotherapy agent, clinical response, Karnofsky performance scale

1 status scale as a multi-measure assessment of the quality of
2 life for cancer patients during medical treatment (10,11). Such
3 investigations revealed that chemotherapy, not only generates
4 medical benefits during the disease, but unfortunately also
5 worsens the quality of life during treatment (12-15).

6 An improved immune response helps to prevent chemo-
7 therapy-induced side effects. An immunotherapy agent
8 increases the populations of T-cells, dendritic and natural
9 killer (NK) cells that are the most potent effectors in the host
10 antitumor response. Immunotherapy agents are an alternative
11 therapy used to boost antitumor immunity and to improve the
12 clinical response to cancer chemotherapeutic treatment.

13 An immunological agent that has been considered in the
14 context of cancer immunotherapy is the dialyzable leuko-
15 cyte extract (DLE) or transfer factor, which has no reported
16 side effects or toxicity. DLE was first described in 1955 by
17 Lawrence and Borkowsky (16). In 1970, Kirkpatrick found
18 that antigen-specific DLE therapy results in the induction
19 of cell-mediated immunity and successful response to the
20 corresponding antigen (17). Currently, DLE is defined as a
21 dialyzed heterogeneous mixture of low molecular weight
22 (<10 kDa) substances released from disintegrated blood
23 or tissue leukocytes. DLE is believed to transfer the ability
24 to express delayed-type hypersensitivity and cell-mediated
25 immunity from an immune donor to a non-immune recipient
26 (18). DLE has been used as a therapeutic agent in the treatment
27 of autoimmune diseases (19), bacterial diseases (20), asthma
28 and allergies (19) (Luna-Baca GA, Linares M, Santacruz-
29 Valdes C, *et al*: Immunological study of patients with herpetic
30 stromal keratitis treated with dialyzable leukocyte extracts.
31 13th International Congress of Immunology, 2007). Such
32 treatment has consistently led to improved prognosis.

33 Therefore, DLE represents an attractive alternative to
34 complement chemotherapy, which can be used to enhance
35 the immune system after disturbances resulting from the side
36 effects of chemotherapy. DLE *in vitro* is effective in improving
37 cellular immunity (18) and in regulating the production of
38 different cytokines involved in tumor progression (21-25).

39 In breast cancer cell line assays, bovine DLE (bDLE)
40 induced cytotoxic effects despite suppressing the expression of
41 p53 mRNA, bab-1, c-myc, bax, bcl-2 and bad mRNA (26,27).
42 In clinical trials, patients with advanced breast cancer were
43 treated with pooled dialyzable transfer factor from healthy
44 adult donors (non-specific) without chemotherapy or radio-
45 therapy, after which the disease progressed (21,28). In other
46 reports, the administration of DLE directly to the tumor was
47 found to reduce tumor size and increase CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺
48 and NK cell counts in rats with glioblastoma multiforme (29).
49 DLE as an adjuvant of chemotherapy has been associated with
50 tumor regression and temporary stabilization in several types
51 of cancer (30), such as breast cancer, nasopharyngeal carci-
52 noma (31), metastatic renal carcinoma (32), prostate cancer
53 (33) and others (34).

54 Previously, we reported the use of bDLE as an adjuvant
55 therapy to complement bevacizumab (Avastin), cetuximab
56 (Erbix), cytokines and cisplatin in transarterial chemoem-
57 bolization (TACE). bDLE was shown to reduce tumor size in
58 a lung cancer (stage III) patient and led to complete remis-
59 sion in 3 patients with primary pancreatic cancer (moderately
60 differentiated). Furthermore, cellular immunity parameters

61 were maintained within reference ranges after chemotherapy 61
(Rodriguez-Padilla C, García de la Fuente A, Díaz R, *et al*: 62
Intra-arterial chemo-immuno target therapy plus conformal 63
XRT in brain tumors. 16th International Congress on Anti- 64
Cancer Treatment Paris, France, 2005) (Rodriguez-Padilla 65
C, Ixtepan L, García de la Fuente A, *et al*: Transarterial 66
chemoembolization (TACE) with bevacizumab (avastin), 67
cetuximab (erbitux) and immunomodulators and image- 68
guided radiation therapy (IGRT) in patients with lung cancer. 69
19th International Congress on Anti-Cancer Treatment 70
Paris, France, 2008). The quality of life, as measured by the 71
Karnofsky performance scale, increased. 72

73 Based on our previous experience with bDLE, the main 73
objective of the present study was to assess the clinical and 74
immune responses with regard to quality of life in breast 75
cancer patients who were undergoing standard chemotherapy 76
and who also received adjuvant therapy (bDLE). 77

78 Patients and methods 79

80 *Patients.* A total of 43 women with confirmed histological 81
diagnoses of breast cancer were included in the study. 82
Female patients over 18 years of age were seronegative for 83
human immunodeficiency virus, human T-cell leukemia 84
virus type 1, hepatitis B and hepatitis C. Patients who were 85
randomly selected for the treatment group had a Karnofsky 86
performance status of ≥60%. None of the patients received 87
cell proliferation stimulants during chemotherapy [Neupogen 88
or granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)], drugs to 89
stimulate appetite or corticosteroids. The Institutional Review 90
Board and Ethics Committee of the Universidad Autonoma de 91
Nuevo Leon, Mexico approved the trial, and all patients gave 92
their written informed consent. 93

94 The chemotherapy commonly employed for local disease 94
includes doxorubicin and cyclophosphamide (AC), AC 95
followed by paclitaxel, cyclophosphamide, doxorubicin and 96
fluorouracil (FAC), cyclophosphamide, methotrexate, fluorou- 97
racil (CMF), docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide 98
(TAC). For metastatic disease the regimens may also include 99
epirubicin, Navelvne, Aromasin or Xeloda. 100

101 *Adjuvant therapy.* The bDLE used in our study as an adjuvant 102
therapy in patients who received chemotherapy was produced 103
by the Laboratory of Immunology and Virology at the 104
Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Mexico, following a 105
modified protocol described by Lawrence and Borkowsky (16). 106
bDLE is a mixture of low molecular weight molecules acquired 107
from the dialyzation of disintegrated bovine spleens. The bDLE 108
was lyophilized, tested for endogenous pyrogens using the 109
Limulus amoebocyte lysate assay (MP Biomedicals Inc.) and 110
determined to be free of bacterial contamination by culturing 111
in different media as well as by *in vivo* mouse inoculations. 112

113 *Study assessment.* The design of the study included 43 breast 114
cancer patients divided as follows: 25 breast cancer patients 115
monitored for clinical and immunological responses during 116
chemotherapy treatment with bDLE as adjuvant therapy 117
and a control group that included 18 breast cancer patients 118
receiving chemotherapy without bDLE as adjuvant. The 119
administration of bDLE lasted 9 months, starting with 1-week 120

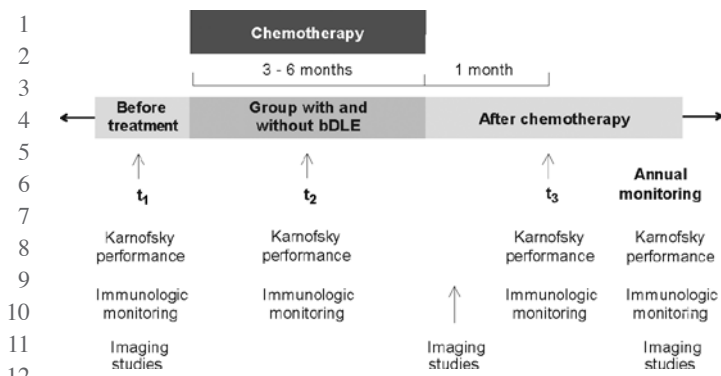


Figure 1. Timeline of the study design.

administration of bDLE alone prior to chemotherapy, with continued administration during the chemotherapy cycle (3-6 months) up to 1 month after the completion of chemotherapy. The dose administered to each patient was defined according to the patient's immunologic status. For the first 15 days, the daily administration of bDLE was as follows: i) 1-3% of B lymphocytes, 5 oral units; ii) 4-6% of B lymphocytes, 4 units (2 oral/2 i.m.); iii) >6% of B lymphocytes, 1 unit alternating oral and i.m. daily. All patients began the bDLE treatment before chemotherapy and continued with the daily treatment during all chemotherapy cycles and several months after the completion of the chemotherapy. If patients achieved a complete remission before 3 months with bDLE and chemotherapy, treatment was limited to bDLE until the follow-up appointment, at which point patients were evaluated immunologically based on their lymphocyte profiles.

Evaluation of the immunologic response. The immunologic parameters of the patients were monitored during chemotherapy in both groups. In addition, in the group that received bDLE as adjuvant the cellular immune response before receiving bDLE was evaluated also 1 month after finishing chemotherapy (description of the protocol design in Fig. 1). Monitoring involved obtaining complete and differential blood counts, as well as flow cytometric analysis of peripheral mononuclear cells. Flow cytometry was used to count NK cells, B lymphocytes and T lymphocytes. Flow cytometry was performed on a Beckman Coulter Altra No. AE47042. Data were obtained and analyzed using Software Expo 32 version 1.2.

bDLE stimulates an immune response mediated by cytokines that indirectly stimulate the proliferation of hematopoietic progenitor cells in bone marrow, as reported used pig-DLE in rats after radiotherapy (18). We evaluated several concentrations of IL-3 and IL-7 in serum with and without bDLE as an adjuvant during chemotherapy using an ELISA assay according to the protocol by Peprotech Company.

Evaluation of the clinical response. A total of 43 patients were evaluated for the clinical response to cancer chemotherapy treatment with or without bDLE as adjuvant, as determined by standard radiographic studies or PET-CT scan imaging. Clinical tumor response was compared to the control group (without bDLE) according to the International Union Against Cancer Criteria. A complete response (CR) was defined as the

Table I. Patient characteristics.

Characteristics	With bDLE (%)	Without bDLE (%)
Total patients, 43	25 (60)	18 (40)
Pathological stage		
I	2 (8)	2 (11)
II	13 (52)	5 (28)
III	4 (16)	5 (28)
IV	6 (24)	6 (33)
Total	25 (100)	18 (100)
Tumor markers		
RE	13 (52)	10 (56)
RP	8 (32)	7 (39)
Her2	7 (28)	6 (33)
Total	25 (100)	18 (100)
Performance status		
0	1 (4)	2 (12)
1	24 (96)	16 (88)
Clinical treatment		
Surgery	13 (52)	18 (100)
Chemotherapy	25 (100)	18 (100)
Radiotherapy	1 (4)	7 (39)
Hormonal	8 (32)	8 (44)

disappearance of all clinical evidence of disease. A partial response (PR) was defined as a $\geq 50\%$ decrease in the sum of the products of perpendicular diameters of all measurable lesions for at least 1 month with no increase in any lesion and no appearance of new lesions. Patients with mixed or minor responses or progressive disease were considered non-responders (NR) (38).

Quality of life. Quality of life was measured in the group with and without bDLE using the Karnofsky performance scores before treatment with bDLE and after 1 month following the end of the chemotherapy regimen.

Statistical analysis. A t-test was used to compare lymphocyte cell populations, Karnofsky performance scores and weight obtained before and after bDLE treatment. Statistical significance was established as $P < 0.05$. Individual values given in the figures represent the mean of 25 patients \pm SEM (for those who received adjuvant therapy) or 18 patients \pm SEM (for those who did not receive adjuvant therapy).

Results

Patient characteristics. To establish a general screening assessment of the effect of bDLE as an adjuvant during chemotherapy, 25 patients with a diagnosis of breast cancer were selected randomly. The study also included 18 breast cancer patients who did not receive adjuvant treatment with bDLE during chemotherapy. In both groups, the patients who had disseminated metastasis were affected in a median of

Table II. Effect of bDLE treatment on the cellular immune response.

Treatment	Leukocytes	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺	CD56-16 ⁺
Before bDLE	5,928±339	713±50	458±46	123±17	157±27
After bDLE	5,554±374	877±95	475±102	314±69	271±48
P-value	0.05	0.05	0.05	<0.05	<0.05

Table III. Clinical responses to treatment.

Stage	Treatment	Complete response (%)	Partial response (%)	No response (%)	Overall response for stage (%)
I	With bDLE	2 (100)	0	0	100
	Without bDLE	2 (100)	0	0	
II	With bDLE	9 (70)	4 (30)	0	72
	Without bDLE	4 (80)	1 (20)	0	
III	With bDLE	2 (50)	2 (50)	0	33
	Without bDLE	1 (20)	3 (60)	1 (20)	
IV	With bDLE	2 (33)	2 (33)	2 (33)	17
	Without bDLE	0	5 (83)	1 (17)	

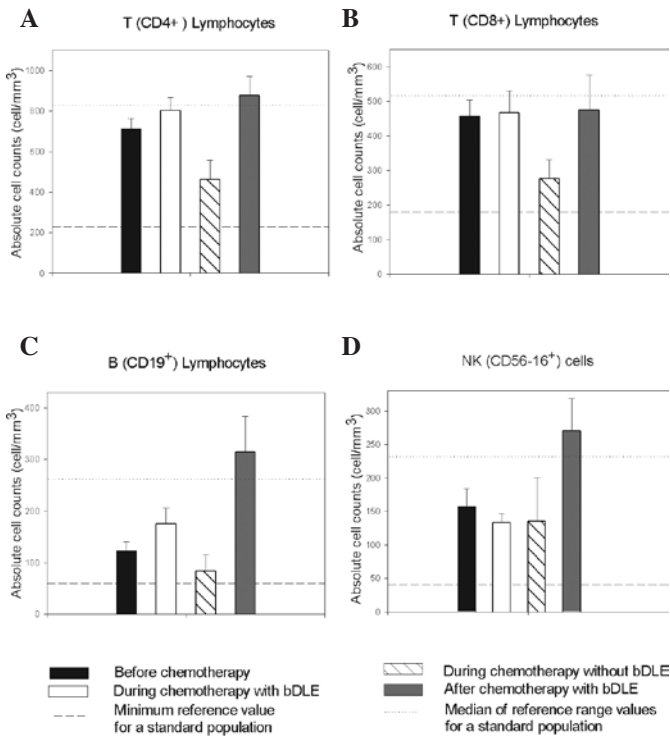


Figure 2. Effect of bDLE treatment on the cellular immune response. Percentage of T (CD4⁺) lymphocytes, T (CD8⁺) lymphocytes, B (CD19⁺) lymphocytes and NK (CD56-16⁺) cells: reference values (without chemotherapy) during bDLE and chemotherapy and after chemotherapy.

three organs/tissues, principal bones, liver and lung. Among patients who received bDLE during chemotherapy, 84% were positive for tumor markers. In the control group, 88% were

positive for tumor markers. According to Karnofsky performance scale classification, 0 patients were able to work and 1 patient was not. All patients received a tailored oncology treatment scheme depending on disease stage (Table I).

Immunologic response. The median total white blood cell count before chemotherapy was 5,928±339/mm³. During chemotherapy, this measure was slightly reduced in the group that received bDLE as adjuvant to 5,554±374/mm³ and in the control group to 4,779±435/mm³. The percentages of monocytes, basophils, eosinophils and neutrophils were always reported to be in the reference range values for our laboratory, even during chemotherapy treatment.

No myelosuppression in lymphoid populations was observed in patients receiving the bDLE treatment, while in patients undergoing chemotherapy without bDLE the absolute numbers of CD4⁺, CD8⁺ and B lymphocytes were reduced compared to the reference range values as shown in Fig. 2. Interestingly, a significant increase in the numbers of NK cells (P<0.05) and B lymphocytes (P<0.05) was observed 1 month after the completion of chemotherapy in patients receiving bDLE as an adjuvant (Table II). The proportion of lymphocytes was maintained at reference values during treatment with bDLE as adjuvant. Levels in the control group were below reference values as reported by Mackall *et al* for patients undergoing chemotherapy (5).

In addition, IL-3 levels were reduced by 80% in the group that received chemotherapy without bDLE. In the group with bDLE as adjuvant during chemotherapy we observed that levels were reduced by only 34%. However, IL-7 levels were increased in the group that received bDLE as adjuvant (11%) prior to chemotherapy in combination with bDLE. This measure was reduced by 30% in the control group during chemotherapy as compared to before chemotherapy (Fig. 3).

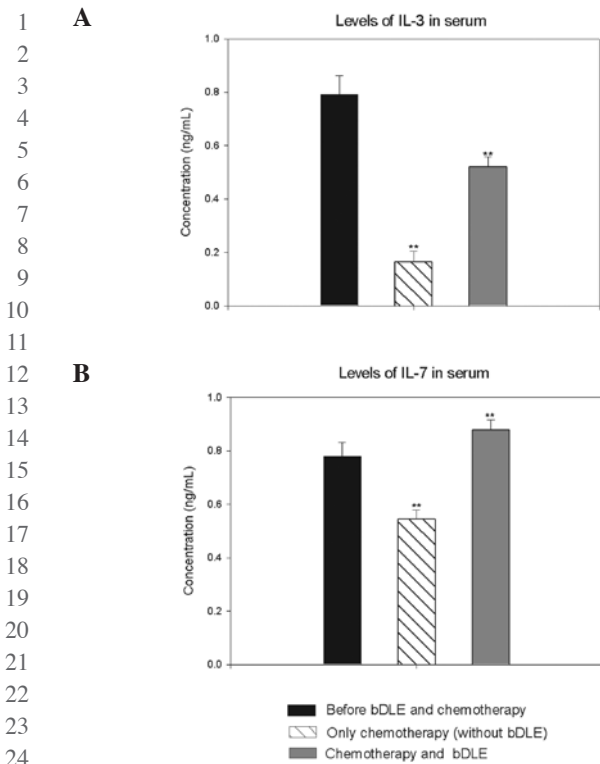


Figure 3. Concentration of cytokines in the serum of breast cancer patients with and without bDLE as an adjuvant to chemotherapy. (A) Levels of IL-3 with and without bDLE during chemotherapy. (B) Levels of IL-7 in patients with and without bDLE during chemotherapy.

Clinical response. Clinical response was evaluated using standard radiographic studies or PET-CT scan imaging.

In the group with bDLE as adjuvant therapy, 15 (60%) patients experienced a CR to treatment, 8 (32%) experienced a PR and 2 (8%) were NRs (Table III). Among stage I patients in this group, 2 (100%) patients experienced a complete response (CR); among stage II patients, 9 (70%) experienced a CR and 4 (30%) patients experienced a PR; for stage III patients, 2 (50%) experienced a CR and 2 (50%) patients experienced a PR; among stage IV patients, 2 (33%) experienced a CR, 2 (33%) experienced a PR and 2 (33%) patients experienced NR.

In the control group (without adjuvant treatment with bDLE during chemotherapy), 7 (39%) patients experienced a CR to treatment (chemotherapy or radiotherapy), 9 (50%) experienced a PR and 2 (11%) were NRs (Table III). Among stage I patients in the control group, 2 (100%) patients experienced a CR; for stage II, 4 (80%) patients experienced a CR and 1 (20%) patient experienced a PR; among stage III patients, 1 (20%) experienced a CR, 3 (60%) experienced a PR and 1 (20%) patient exhibited NR; among stage IV patients, none experienced a CR, 5 (83%) patients experienced a PR (17%) and 1 patient experienced NR.

PET-CT imaging. We used PET-CT to evaluate both groups and observed that in the group with bDLE as adjuvant the regression of metastatic lesions in diverse anatomic locations was obtained in less time than in the control group (without bDLE). As shown in Fig. 4A, patients with metastatic breast cancer without adjuvant therapy had persistent thyroid lesions

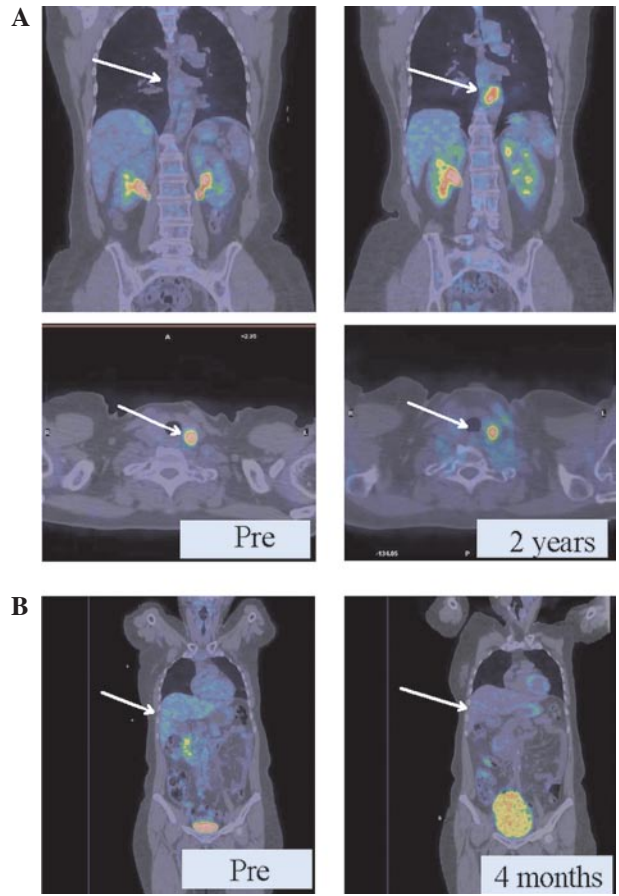


Figure 4. Clinical effect of bDLE as visible in PET images. In the control group, we observed no response (A) of thyroid lesions after chemotherapy without bDLE. (B) Partial regression of retroperitoneal retrohepatic metastases after chemotherapy and bDLE treatment. Pre-, pre-treatment.

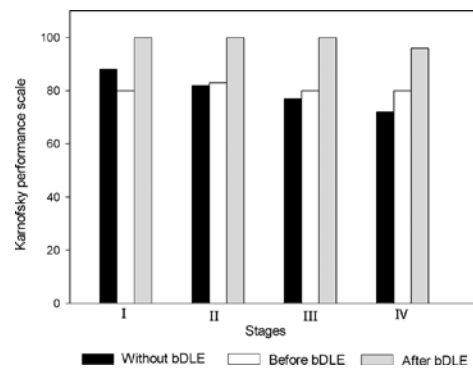


Figure 5. Karnofsky performance scale by stage without bDLE during chemotherapy and with bDLE treatment before and during chemotherapy.

and a new lesion around the aorta (2 cm) after 2 years of chemotherapy. In another case (Fig. 4B), retroperitoneal retrohepatic metastases exhibited a PR, with the same metabolic activity (6 SUV) after only 4 months of receiving bDLE treatment and 5 cycles of chemotherapy.

Quality of life. Quality of life was measured using the Karnofsky performance scores. In the patients who received bDLE adjuvant therapy during chemotherapy, average Karnofsky scores increased from 70 to 90, which reflected

1 an overall clinical improvement in the health status of the
2 patients (Fig. 5). Of the patients who received chemotherapy
3 treatment without bDLE adjuvant therapy, the average final
4 score was 80.

5
6 **Toxicity.** The administration of bDLE therapy was safe and well
7 tolerated. None of the patients died during the reported period.

8 **Discussion**

9
10 DLE, commonly known as transfer factor, is an immu-
11 notherapy agent that has been reported to improve the
12 immunological response in cancer patients (Rodriguez-Padilla
13 C, García de la Fuente A, Díaz R, *et al*: Intra-arterial chemo-
14 immuno target therapy plus conformal XRT in brain tumors.
15 16th International Congress on Anti-Cancer Treatment Paris,
16 France, 2005) (36). Various reports have used different clinical
17 assays to investigate DLE as an adjuvant therapy. These
18 studies have consistently reported improvement in the clinical
19 response to treatment, but there is a lack of information about
20 the clinical parameters that are improved in those patients
21 (37-39). In this clinical study, we randomly sampled breast
22 cancer patients to explore the immunological and clinical
23 response to bDLE treatment as an adjuvant to chemotherapy.
24 In particular, we focused on the clinical effects of bDLE as an
25 adjuvant therapy during chemotherapy.

26 Myelosuppression is a common side effect of chemo-
27 therapy that is accompanied by lymphopenia, neutropenia
28 and thrombocytopenia. (6). In this study, our results showed
29 a protective effect of bDLE on CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺
30 T lymphocytes, CD19⁺ B lymphocytes and NK cells (Fig. 2).
31 The absolute numbers of these lymphocytes in the bDLE-
32 treated patients during chemotherapy (Fig. 2) were always
33 higher than expected as compared to our control group and
34 as reported by Mackall *et al* for patients undergoing chemo-
35 therapy (5). In addition, we observed that the levels of IL-3
36 and IL-7 were higher in the group that received bDLE as an
37 adjuvant during chemotherapy as compared to the control
38 group.

39 These factors likely underline the immunological protec-
40 tion afforded by bDLE during chemotherapy as reported by
41 Vacek *et al* (18) using pig-DLE.

42 The administration of bDLE in this study resulted in an
43 increased clinical response. The difference was principally
44 observed in stage III and IV patients. The median survival
45 reported after the appearance of metastases is approximately
46 20-25 months, hence the importance of obtaining a clinical
47 response as rapidly as possible. We observed that those meta-
48 static patients receiving bDLE exhibited improved clinical
49 responses in 6-12 months, as compared to the group that did
50 not receive adjuvant therapy with bDLE. In the latter group,
51 the clinical response was as expected at approximately 2-3
52 years (data not shown).

53 Therefore, in future studies with bDLE as adjuvant chemo-
54 therapy, it will be necessary to focus specifically on the group
55 that improved (patients with metastatic disease). To further
56 verify enhancement due to bDLE treatment, we recommend a
57 study with a larger population.

58 bDLE treatment in combination with chemotherapy
59 resulted in an increase in the Karnofsky performance scores

60 after several chemotherapy cycles; patients reached a 90 on
61 the Karnofsky performance scores, which implies minor
62 symptoms and the ability to work (10). By contrast, the
63 average score for the control group (without bDLE) was 80.
64 During the interviews, we observed that patients improved
65 in their general health and state of mind even 1 month after
66 chemotherapy. Therefore, adjuvant therapy with bDLE
67 reduces economic losses as well as the physical incapacitation
68 suffered by cancer patients.

69 In conclusion, our results pertaining to the administra-
70 tion of bDLE as an adjuvant therapy during breast cancer
71 chemotherapy can be used for clinical decision-making and
72 for improving the quality of life during treatment. We propose
73 the use of bDLE as an adjuvant to complement conventional
74 chemotherapies in cancer. bDLE would be particularly useful
75 to improve immunological response, symptomatology and
76 general patient prognosis.

77 **Acknowledgements**

78 This is the first publication to report a clinical approach
79 to define the anticancer effects of bDLE in breast cancer
80 patients. The following funding source supported the data
81 collection process: the Programa de Apoyo a la Investigacion
82 en Ciencia y Tecnologia (PAICYT) from the Universidad
83 Autonoma de Nuevo Leon, Mexico and the Consejo Nacional
84 de Ciencia y Tecnologia (CONACYT), Mexico.

85 **References**

- 86 1. Bray F, McCarron P and Parkin DM: The changing global
87 patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast
Cancer Res* 6: 229-239, 2004.
2. Stewart BW and Coates AS: Cancer prevention: a global perspec-
tive. *J Clin Oncol* 23: 392-403, 2005.
3. Smith MD and McGhan WF: Financial facts about treating
breast cancer. *Bus Health* 14: 67-68; 70, 1996.
4. Spitzer LE: Clinical uses of transfer factor. *Calif Med* 118: 47,
1973.
5. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Magrath IT, Shad AT,
Horowitz ME, Wexler LH, Adde MA, McClure LL and
Gress RE: Lymphocyte depletion during treatment with intensive
chemotherapy for cancer. *Blood* 84: 2221-2228, 1994.
6. Van der Most RG, Currie AJ, Robinson BW and Lake RA:
Decoding dangerous death: how cytotoxic chemotherapy invokes
inflammation, immunity or nothing at all. *Cell Death Differ* 15:
13-20, 2008.
7. Piper BF, Borneman T, Sun VC, Koczywas M, Uman G,
Ferrell B and James RL: Cancer-related fatigue: role of oncology
nurses in translating National Comprehensive Cancer Network
Assessment Guidelines into practice. *Clin J Oncol Nurs* 12:
37-47, 2008.
8. Berger AM: Patterns of fatigue and activity and rest during
adjuvant breast cancer chemotherapy. *Oncol Nurs Forum* 25:
51-62, 1998.
9. Goodman MN: Tumor necrosis factor induces skeletal muscle
protein breakdown in rats. *Am J Physiol* 260: E727-E730, 1991.
10. Karnofsky DA, Abelmann WH and Craver LF: The use of the
nitrogen mustards in palliative treatment of carcinoma. *Cancer*
1: 634-656, 1948.
11. Priestman TJ and Baum M: Evaluation of quality of life in
patients receiving treatment for advanced breast cancer. *Lancet*
1: 899-900, 1976.
12. Kasper CE: Sarcolemmal disruption in reloaded atrophic skeletal
muscle. *J Appl Physiol* 79: 607-614, 1995.
13. Kasper CE: Recovery of plantaris muscle from impaired physical
mobility. *Biol Res Nurs* 1: 4-11, 1999.
14. Kasper CE and Sarna LP: Influence of adjuvant chemotherapy
on skeletal muscle and fatigue in women with breast cancer. *Biol
Res Nurs* 2: 133-139, 2000.

15. St Pierre BA, Kasper CE and Lindsey AM: Fatigue mechanisms in patients with cancer: effects of tumor necrosis factor and exercise on skeletal muscle. *Oncol Nurs Forum* 19: 419-425, 1992.
16. Lawrence HS and Borkowsky W: Transfer factor – current status and future prospects. *Biotherapy* 9: 1-5, 1996.
17. Kirkpatrick CH: Transfer of cellular immunity with transfer factor. *J Allergy Clin Immunol* 63: 71-73, 1979.
18. Vacek A, Hofer M, Schneiderova H and Svoboda J: Ultrafiltered pig leukocyte extract (UPL, IMUNOR) potentiates hematopoiesis-stimulating effects of G-CSF in vitro and improves the outcome of treatment of hematopoietic radiation damage in mice with G-CSF. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 27: 647-659, 2005.
19. Pizzo PA, Henderson ES and Leventhal BG: Acute myelogenous leukemia in children: a preliminary report of combination chemotherapy. *J Pediatr* 88: 125-130, 1976.
20. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-Leon L, Tamez-Guerra RS and Rodriguez-Padilla C: Bovine dialyzable leukocyte extract protects against LPS-induced, murine endotoxic shock. *Int Immunopharmacol* 4: 1577-1586, 2004.
21. Atzpodien J, Kuchler T, Wandert T and Reitz M: Rapid deterioration in quality of life during interleukin-2- and alpha-interferon-based home therapy of renal cell carcinoma is associated with a good outcome. *Br J Cancer* 89: 50-54, 2003.
22. Ojeda MO, van't Veer C, Fernandez Ortega CB, Arana Rosainz MJ and Buurman WA: Dialyzable leukocyte extract differentially regulates the production of TNFalpha, IL-6 and IL-8 in bacterial component-activated leukocytes and endothelial cells. *Inflamm Res* 54: 74-81, 2005.
23. Kirkpatrick CH, Rozzo SJ, Mascali JJ and Merryman CF: Murine transfer factor. II. Transfer of delayed hypersensitivity to synthetic antigens. *J Immunol* 134: 1723-1727, 1985.
24. Kirkpatrick CH: Therapeutic potential of transfer factor. *N Engl J Med* 303: 390-391, 1980.
25. Kirkpatrick CH: Transfer of delayed cutaneous hypersensitivity with transfer factor. *Cell Immunol* 41: 62-71, 1978.
26. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernandez D, Zapata-Benavides P, Castillo-Leon L, Isaza-Brando C, Tamez-Guerra RS and Rodriguez-Padilla C: In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (BDLE) in cancer cells. *Cytotherapy* 8: 408-414, 2006.
27. Mendoza-Gamboa E, Franco-Molina MA, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Vera-Garcia ME, Tamez-Guerra RS and Rodriguez-Padilla C: Bovine dialyzable leukocyte extract modulates AP-1 DNA-binding activity and nuclear transcription factor expression in MCF-7 breast cancer cells. *Cytotherapy* 10: 212-219, 2008.
28. Oettgen HF, Old LJ, Farrow JH, Valentine FT, Lawrence HS and Thomas L: Effects of dialyzable transfer factor in patients with breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 2319-2323, 1974.
29. Pineda B, Estrada-Parra S, Pedraza-Medina B, Rodriguez-Ropon A, Perez R and Arrieta O: Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma. *J Exp Clin Cancer Res* 24: 575-583, 2005.
30. Meier CR and LoBuglio AF: Transfer factor: a potential agent for immunotherapy of cancer. *World J Surg* 1: 617-623, 1977.
31. Goldenberg GJ and Brandes LJ: In vivo and in vitro studies of immunotherapy of nasopharyngeal carcinoma with transfer factor. *Cancer Res* 36: 720-723, 1976.
32. Moss RW: Cancer and complementary and alternative medicine in Italy: personal observations and historical considerations. *Integr Cancer Ther* 3: 173-188, 2004.
33. Pizza G, De VC, Cuzzocrea D, Menniti D, Aiello E, Maver P, Corrado G, Romagnoli P, Dragoni E and LoConte G: A preliminary report on the use of transfer factor for treating stage D3 hormone-unresponsive metastatic prostate cancer. *Biotherapy* 9: 123-132, 1996.
34. Rodriguez-Flores A, Castillo-Juarez P, Vazquez D, Gonzalez-Guzman R, Rico-Martinez G and Estrada-Parra S: Immunological evaluation of patients with osteosarcoma received adjuvant treatment with specific transfer factor. *J Immunol* 182: 63, 2009.
35. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE and Mavroukakis SA: Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23: 2346-2357, 2005.
36. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Vera-Garcia ME, Castillo-Tello P, Garcia dIF, Mendoza RD, Garza RG, Tamez-Guerra RS and Rodriguez-Padilla C: IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients. *Cytotherapy* 10: 490-496, 2008.
37. Fujisawa T: Transfer factor immunotherapy as an adjunct to surgery in lung cancer. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 23: 68-73, 1985.
38. Krown SE, Pinsky CM, Hirshaut Y, Hansen JA and Oettgen HF: Effects of transfer factor in patients with advanced cancer. *Isr J Med Sci* 14: 1026-1038, 1978.
39. Vacek A, Hofer M, Hola J, Weiterova L, Streitova D and Svoboda J: The role of G-CSF and IL-6 in the granulopoiesis-stimulating activity of murine blood serum induced by perorally administered ultrafiltered pig leukocyte extract, IMUNOR. *Int Immunopharmacol* 7: 656-661, 2007.