

Correlación del inmunofenotipo linfocitario en sangre, ascitis y tejido tumoral en pacientes con cáncer de ovario

Correlation of the lymphocytary immunophenotype in blood, ascites and tumoral tissue in patients with ovarian cancer

Carlos Agustín Villegas Valverde^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-7478-0482>

Griselda Torres López¹ <https://orcid.org/0000-0002-6060-1727>

María del Carmen Arango Prado¹ <https://orcid.org/0000-0002-8307-4296>

Raiza Ruíz Lorente² <https://orcid.org/0000-0001-6672-312X>

Lester Lara Acosta¹ <https://orcid.org/0000-0003-1814-1242>

Conrado Ramos Mico¹ <https://orcid.org/0000-0003-4375-0517>

Alejandro Linchenat Lambert¹ <https://orcid.org/0000-0003-4375-0517>

Juan Mario Silveira Pablos¹ <https://orcid.org/0000-0002-8423-4052>

Daisy Hernández Durán² <https://orcid.org/0000-0003-4210-8995>

¹Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. La Habana, Cuba.

²Hospital Ginecobstétrico Docente Ramón González Coro. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: carlosvillega@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: El cáncer de ovario de origen epitelial es el más letal de todos los cánceres ginecológicos. El infiltrado linfocitario en el tumor, la ascitis y la sangre se asocian con la supervivencia y respuesta terapéutica.

Objetivo: Evaluar la correlación de la composición linfocitaria, entre sangre, ascitis y tejido del tumor en pacientes con cáncer de ovario de origen epitelial.

Métodos: Se realiza estudio analítico transversal en el Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR), en la Habana, Cuba, durante el año 2017. Se estudiaron 33 muestras de sangre, ascitis y tejido tumoral ovárico mediante un panel de citometría de flujo multiparamétrica y, además, fueron estudiadas muestras de sangre de 35 mujeres

supuestamente sanas. Se evaluó la composición y correlación entre inmunofenotipos linfocitarios.

Resultados: Se encontraron cambios en los inmunofenotipos linfocitarios en sangre de las pacientes en comparación con los controles. La concentración de células NK se presentó significativamente alta, con 12,5 % y 15,8 %, en controles y pacientes respectivamente. Los análisis de varianza mostraron que la variabilidad de concentraciones de linfocitos entre sangre, ascitis y tejido ovárico no se debió al azar. Las poblaciones de linfocitos citotóxicos, T reguladoras, NKT y células activadas describieron una tendencia al incremento en la sangre, ascitis y tejido, mientras que las NK, linfocitos B y células cooperadoras mostraron una tendencia opuesta. Los inmunofenotipos activados de T reguladores y linfocitos citotóxicos, tuvieron una correlación inversa en ascitis y tejido tumoral con R^2 : 0,70 y 0,45 respectivamente.

Conclusiones: Se evidenció el incremento de células con función citotóxica y T reguladoras en el tejido y la ascitis junto con linfocitos T reguladores. La correlación encontrada en algunos inmunofenotipos homólogos entre compartimentos, sugiere que se pueden estimar concentraciones celulares a partir de la sangre. La asociación entre fenotipos funcionales demostró un ambiente supresor, independiente de las concentraciones globales de CD8 y T reguladoras.

Palabras clave: cáncer de ovario; inmunofenotipo linfocitario; citometría de flujo multiparamétrica.

ABSTRACT

Introduction: Ovarian cancer with epithelial origin is the most lethal of all gynecological cancers. The lymphocytary infiltrate in the tumor, the ascites and the blood are associated with the survival and the therapeutic response.

Objective: Assess the correlation of the lymphocytary composition between blood, ascites and tissue of the tumor in patients with ovarian cancer of epithelial origin.

Methods: It was conducted an analytical cross-sectional study in the National Institute of Oncology and Radiobiology (INOR, by its acronym in Spanish), in Havana, Cuba during 2017. 33 samples of blood, ascites and ovaric tumoral tissue were studied through a panel of multiparameters flow cytometry, and in addition were studied blood samples of 35 supposedly healthy women. It was assessed the composition and correlation among lymphocytary immunophenotypes

Results: There were found changes in the lymphocytary immunophenotype in the blood of patients in comparison with the controls. The concentration of NK cells was found significantly high, with 12,5% and 15,8% in controls and patients, respectively. The variance analysis showed that the variability of the lymphocytes concentrations between blood, ascites and ovaric tissue was not by chance. The population of ciytotoxic lymphocytes, T regulators, NKT and activated cells described an increasing trend in the blood, the ascites and the tissue; while the NK, the B lymphocytes and the helper cells showed an opposite trend. The activated immunophenotypes of T regulators and the cytotoxic lymphocytes had an inverse correlation in ascites and tumoral tissue with R^2 : 0,70 and 0,45, respectively.

Conclusions: It was evidenced the increase of cells with cytotoxic function and T regulators in the tissue and the ascites with T regulators lymphocytes. The correlation found in some homologous immunophenotypes among sections suggests that can be estimated cells concentrations from the blood. The relation among functional phenotypes showed a supressor environment, independently from the global concentrations of CD8 and T regulators.

Keywords: Ovarian cancer; lymphocytary immunophenotype; multiparameters flow cytometry.

Recibido: 23/03/2020

Aprobado: 11/04/2020

Introducción

El cáncer de ovario de origen epitelial (COE) ocupa el sexto lugar en incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial y es el más letal de todos los cánceres ginecológicos. En Cuba ocupa el quinto lugar en incidencia dentro de la población femenina entre 18 y 45 años de edad y el séptimo después de los 45 años. Se diagnostica de forma tardía (etapas III/IV) en más del 75 % de los casos y cursa de forma indolente más de la mitad de su historia natural.^(1,2,3,4,5)

La cirugía citorreductora seguida de quimioterapia basada en platinos y taxanos, es el tratamiento de elección en este tipo de cáncer. Sin embargo, en las etapas en que el

mayor porcentaje es diagnosticado, ya han ocurrido diseminaciones hematógicas, linfáticas y transperitoneal. En este escenario la cirugía es multiorgánica y altamente compleja, con reducción de la supervivencia. En estas condiciones el pronóstico de supervivencia a los 5 años es menor del 25 %. A este problema se sobreañaden los tumores quimiorresistentes, que representan alrededor de 50 % de los casos. Por esto resulta evidente lograr nuevas estrategias terapéuticas y avanzar hacia el diagnóstico temprano.^(2,6)

El COE es uno de los tumores más inmunogénicos descritos. Existen cohortes de pacientes de igual estirpe histológica, estadio, edad, color de la piel y riesgos genéticos similares, que muestran respuestas al tratamiento y supervivencias globales muy diferentes. Luego se ha comprobado que sus infiltrados inflamatorios en el microambiente del tumor, eran distintos y que sobre estas características radica el fundamento de los destinos diferentes de las pacientes. A partir de estos hallazgos se comenzó a profundizar en la caracterización del inmunofenotipo leucocitario, sobretodo linfocitario, para identificar biomarcadores predictores de respuesta terapéutica y de supervivencia en estas pacientes.^(7,8,9,10)

Actualmente se estudia a profundidad la influencia del balance entre los factores inmunogénicos e inmunosupresores, en el pronóstico y supervivencia del COE. El franco predominio de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL, por sus siglas en inglés) citotóxicos sobre los monocitos y neutrófilos, resulta beneficioso, pero el aumento de células derivadas mieloides supresoras y T reguladoras (Treg) se asocia con quimiorresistencia y menor supervivencia. En tal sentido estas células y sus nexos se han convertido en un blanco muy atractivo de la inmunoterapia, que con el nuevo enfoque de inhibición de los puntos de control está dando beneficios ostensibles.^(7,8,11,12)

El inmunofenotipo por citometría de flujo (CF) de linfocitos asociados al tumor en la ascitis y circulantes en sangre, se ha convertido en un elemento más del diagnóstico integral del COE, en la era del inmunograma del cáncer. La inmuno clasificación de estos tumores es esencial con relación al tratamiento y pronóstico. Se requiere del análisis de los nexos entre poblaciones linfocitarias y entre compartimentos, para evaluar no solo su cantidad y ubicación, sino su dinámica de recirculación y funcionabilidad. En estos dos últimos aspectos se ha abundado muy poco, lo que

ayudarían a dilucidar algunos resultados controversiales de los estudios sobre concentraciones linfocitarias en COE.^(8,13,14,15)

Por lo antes expuesto se puede apreciar que el COE como problema de salud de gran magnitud, tiene asociados nuevos descubrimientos en el área de la inmuno oncología, que podrán cambiar su curso natural.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la correlación de la composición linfocitaria, entre sangre, ascitis y tejido del tumor, en pacientes con cáncer de ovario de origen epitelial, durante el período analizado.

Métodos

Se realizó un estudio analítico transversal en el Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR), La Habana, Cuba durante el año 2017.

En el laboratorio de inmunología se analizaron 33 muestras provenientes de pacientes con diagnóstico histopatológico de COE, atendidas en los servicios de Ginecología del INOR y del Hospital Ginecobstétrico “Ramón González Coro” ambos en La Habana, Cuba.

Las pacientes en etapas localmente avanzadas, tributaron a cirugía citorrreductora primaria. Además, se estudiaron muestras de sangre de 35 mujeres supuestamente sanas.

Obtención de las muestras

De cada paciente se analizaron 2 mL de sangre periférica y 2 mL de líquido ascítico dispensados en tubos *Vacutainer* con ácido etilendiamino tetracético (EDTA). Además, se obtuvo un fragmento de tejido tumoral (2-5 gramos) que se colocó en tubos cónicos estériles de 15 mL en solución salina al 0,9 %. Las muestras fueron colectadas durante el acto quirúrgico.

Las mujeres sanas y las enfermas accedieron voluntariamente a participar y firmaron el consentimiento informado.

Se cumplieron los requisitos emanados de la Declaración de *Helsinki*. Se garantizó la confidencialidad de los datos obtenidos y su uso con fines exclusivos de la investigación.

El estudio no implicó riesgos éticos para las pacientes ya que no fueron sometidas a experimentación y estuvo aprobado por los comités de ética de las instituciones involucradas.

Citometría de flujo

Se empleó un citómetro *Beckman Coulter Gallios* de 10 colores con *software Gallios v1.2* para la adquisición de los datos y *Kaluza Analysis v1.5^a* para el análisis y reporte de resultados.

Para sangre se adquirió un mínimo de 50 000 eventos totales. Mientras que para los otros dos tipos de muestras se determinó un mínimo de 5000 eventos en la ventana de selección de linfocitos (CD45⁺/SSC). Los valores de poblaciones linfocitarias se determinaron de forma porcentual. Se empleó un panel de cuatro tubos policromáticos previamente diseñado y optimizado en el laboratorio de inmunología del INOR. Todos los anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos empleados fueron *Beckman Coulter*, Francia.

1. anti-CD45 KRO (Clon J33), anti-CD19 PC7 (Clon 89B.B4), anti-CD3 FITC (Clon UCHT1), anti-CD4 PB (Clon 13B8.2), anti-CD8 AA700 (Clon B9.11) y anti-CD56 PE (Clon N901) (NKH-1).
2. anti-CD45 KRO (Clon J33), anti-CD19 PC7 (Clon 89B.B4), anti-CD20 FITC (Clon B9E9), CD25 PC5.5 (Clon B1.49.9) y anti-HLA-DR PE (Clon Immu-357).
3. anti-CD45 KRO (Clon J33), anti-CD3 PC5 (Clon A07749), anti-CD4 PB (Clon 13B8.2), anti-CD8 AA700 (Clon B9.11), anti-CD56 PE (Clon N901) (NKH-1) y anti-CD16 FITC (Clon 3G8).
4. anti-CD45 KRO (Clon J33), anti-CD3 FITC (Clon UCHT1), anti-CD4 PB (Clon 13B8.2), anti-CD8 AA700 (Clon B9.11), anti-HLA-DR PE (Clon Immu-357) (NKH-1) y CD25 PC5.5 (Clon B1.49.9).

Métodos de tinción

La sangre se procesó por el método de lisis sin lavado. Se adicionaron los volúmenes de los conjugados en tubos de citometría, se añadieron 50µL de sangre, se incubó a temperatura del laboratorio en cámara oscura por 15 minutos, se adicionaron 500µL del buffer de lisis *VersaLyse* (*Beckman Coulter*, Francia). Se

incubó en iguales condiciones por 30 minutos. Se procedió realizar lectura por el citómetro.

Líquido ascítico: se realizó un lavado de los 2 mL del líquido ascítico con 2mL de búfer de lavado compuesto por: solución salina al 0,9 % (SF), suero fetal bovino inactivado (BSA, por sus siglas en inglés) al 1 % y EDTA al 1mM. Después se centrifugó a 400g y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se resuspendió en 1mL del búfer de lavado, con ayuda de agitación por *Vórtex* durante cuatro segundos. La tinción fue realizada con los conjugados previamente retitulados en una suspensión de 50µL de células, en tubos de citometría de 12 x 75mm (*Beckman Coulter*, Francia). Se incubó en cámara oscura a temperatura de laboratorio por 20 minutos. Después se adicionaron 2mL de búfer de lavado y se aplicó *Vórtex* por cuatro segundos seguido por centrifugación a 400g. Posteriormente se eliminó el sobrenadante por decantación y se realizó otro paso de lavado igual al anterior. Finalmente se reconstituyeron las células de cada tubo en 150µL de búfer de lavado. Previo tamizado de la muestra con filtros de 100 µm, se analizó inmediatamente en el citómetro.

Tejido tumoral ovárico: Se tomaron entre 2 - 5 gramos y se le realizó disgregación mecánica con bisturí no. 22 sobre placas de cultivo estériles. Una vez disgregado se le adicionaron 10mL del búfer de lavado antes descrito. Esta suspensión fue transferida a través de un filtro de 100 µm a un tubo cónico de 15mL. Se centrifugó a 400 g y se eliminó el sobrenadante por decantación. Después se resuspendió en 1mL de búfer de lavado. Se aplicó agitación por tres pasos de *Vórtex* de cuatro segundos cada uno. Se dispensaron los conjugados en los tubos de citometría (*Beckman Coulter*, Francia) con los volúmenes previamente retitulados. Después se les adicionaron 100µL de las células resuspendidas a cada uno. La incubación fue en cámara oscura a temperatura de laboratorio por 20 minutos. Posteriormente se realizaron dos pasos de lavado con búfer de lavado como se describió para el líquido ascítico. Finalmente, se resuspendieron las células de cada tubo de citometría en 150µL de búfer de lavado. Se filtró nuevamente con 70µm y se procedió a analizar inmediatamente en el citómetro.

Procesamiento estadístico

Los valores de poblaciones linfocitarias obtenidos pasaron el test de normalidad de *Kolmogorov-Smirnov*. Se utilizaron la media, como medida de tendencia central y la desviación estándar como medida de dispersión. Para comparar las medias de las poblaciones en cada muestra (sangre, ascitis y tejido ovárico) de forma pareada, se utilizó el análisis de varianza para datos repetidos (ANOVA) de una vía y el *post-hoc* de *Tukey* de comparaciones múltiples. El valor de significación se fijó en $p < 0,05$. Para analizar las asociaciones entre poblaciones linfocitarias, se aplicó una matriz de correlación y se seleccionaron las correlaciones con significación estadística, para aplicarles un modelo de regresión lineal como análisis bivalente.

Resultados

Se realizó en inmunofenotipo de linfocitos B, T, NK en los tres compartimentos, así como algunas de sus subpoblaciones, que poseen un rol descrito en la inmunopatogenia del cáncer de ovario, entre las que se encuentran: Linfocitos T cooperadores, T citotóxicos, T reguladores (Treg), T dobles negativos (TDN) y dobles positivos (TDP) para CD4 y CD8, NKT, NK secretoras y citotóxicas, así como linfocitos activados T y Treg.

Diferencias entre controles y pacientes en la composición de inmunofenotipos linfocitarios en sangre

Las medias de las subpoblaciones linfocitarias inmunofenotipadas en sangre periférica pacientes con COE, mostraron una concentración significativamente mayor de linfocitos B, T activados con expresión del marcador HLA-DR y los TDP. Resultaron con diferencias altamente significativas las subpoblaciones NK, TCD3⁺ activadas con expresión del marcador CD25 y las Treg con inmunofenotipo CD3⁺/CD4⁺/CD25^{alto}. Estos resultados sugieren que las portadoras de este tipo de neoplasia, poseen modificaciones del sistema inmune como consecuencia de su enfermedad (Tabla 1).

Tabla 1 - Distribución de frecuencias relativas del inmunofenotipo de poblaciones linfocitarias en sangre venosa entre controles sanos y pacientes con COE

Inmunofenotipo	(%) Media ±DE		Valor de p
	Controles (n=35)	Pacientes (n=11)	
CD3 ⁺	71,8 ±11,6	70,2 ±5,3	0,6474
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	44,7±9,9	43,75±6,9	0,7785
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	22,8±6,2	25,3±5,5	0,2899
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /HLA-DR ⁺ †	9,4±3,8	8,8±2,0	0,6190
CD3 ⁺ /CD8 ⁻ /CD4 ⁻	2,8±1,5	3,3±1,8	0,4929
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /CD4 ⁺	1,3±1,1	2,5±1,7	*0,0266
CD19 ⁺ /CD20 ⁺	9,4±4,9	13,2±2,6	*0,0407
CD3 ⁻ /CD16 ⁺ /CD56 ^{bajo}	12,5±5,9	15,8±4,4	****< 0,0001
CD3 ⁻ /CD16 ^{bajo} /CD56 ^{alto}	4,8±3,4	2,5±1,3	****< 0,0001
CD3 ⁺ /CD56 ⁺	4,6±2,4	5,1±2,3	0,5935
CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺	11,9±3,4	16,5±5,4	**0,0072
CD3 ⁺ /CD25 ⁺	3,3±1,8	8,6±2,2	****< 0,0001
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ^{alto}	1,5±1,1	4,1±1,4	****< 0,0001
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ^{alto} /HLA-DR ⁺ †	21,8±6,6	26,9±9,7	0,0924
Índice CD4 ⁺ :CD8 ⁺	2,1±0,9	1,8±0,4	0,2349

DE: Desviación estándar. †: % de células activas sobre total de sus homólogas. p: Nivel de significación. Prueba t. Significativo < 0,05, p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p<,0,0001 (****).

La variabilidad de los inmunofenotipos entre el microambiente del tumor, la ascitis y la sangre no se debió al azar.

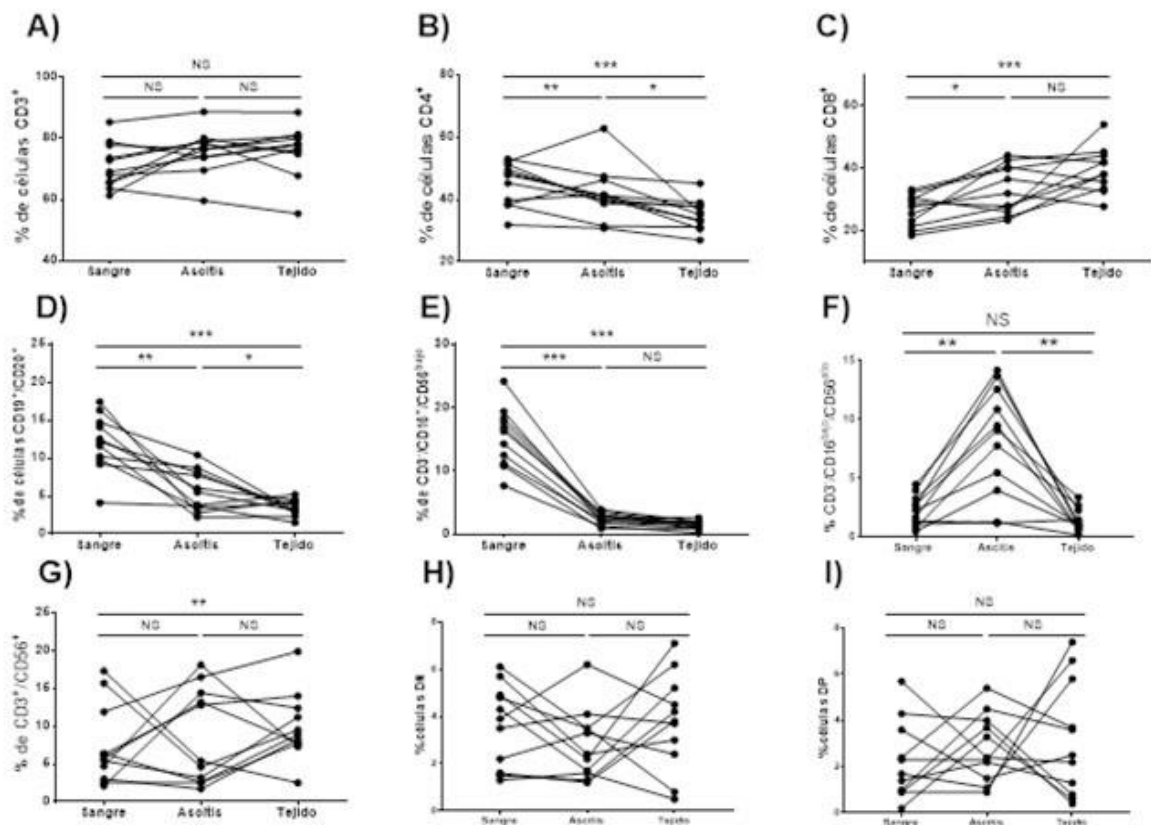
El 100 % de las pacientes tuvo un infiltrado linfocitario mixto en el tejido tumoral y la ascitis. Se encontraron diferencias significativas entre las medias pareadas para los tres compartimentos, de acuerdo al *test de ANOVA* para medidas repetidas (Tabla 2).

Tabla 2 - Variabilidad entre las frecuencias relativas de las subpoblaciones linfocitarias en los tres tipos de compartimentos estudiados del organismo

Muestra/Inmunofenotipo	Sangre	Ascitis	Tejido tumoral	ANOVA
	Media ±DE	Media ±DE	Media ±DE	
CD3 ⁺	70,2 ±5,3	77,0±3,5	76,8±4,1	**0,0040
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	43,75±6,9	39,6±5,2	34,8±4,9	****< 0,0001
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	25,3±5,5	34,5±7,6	38,3±5,4	****< 0,0001
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /HLA-DR ⁺ †	8,8±2,0	18,9±4,1	62,8±7,9	****< 0,0001
CD3 ⁺ /CD8 ⁻ /CD4 ⁻	3,3±1,8	2,8±1,5	3,8±2,0	=0,306
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /CD4 ⁺	2,5±1,7	2,8±1,4	3,2±3,5	=0,542
CD19 ⁺ /CD20 ⁺	13,2±2,6	5,6±2,9	3,6±1,0	****< 0,0001
CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ^{bajo}	15,8±4,4	1,2±0,7	0,3±0,4	****< 0,0001
CD3 ⁺ /CD16 ^{bajo} /CD56 ^{alto}	2,5±1,3	9,7±3,5	1,6±1,0	****< 0,0001
CD3 ⁺ /CD56 ⁺	5,1±2,3	8,1±6,0	10,3±3,9	** 0,0062
CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺	17,8±5,0	29,2±10,3	34,1±14,6	*0,0214
CD3 ⁺ /CD25 ⁺	8,6±2,2	11,8±3,7	35,2±12,5	****< 0,0001
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ^{alto}	4,1±1,4	9,5±3,6	12,7±3,9	**0,0081
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ^{alto} /HLA-DR ⁺ †	26,9±9,7	41,9±12,2	60,3±13,6	****< 0,0001
Índice CD4 ⁺ :CD8 ⁺	1,8±0,4	1,2±0,3	0,9±0,2	****< 0,0001

DE: Desviación estándar. †: % de células activas sobre total de sus homólogas. p: Nivel de significación.
ANOVA: análisis de varianza. p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***).

Al aplicar el *post-hoc de Tukey*, se halló que las diferencias significativas predominaron en las comparaciones entre sangre y ascitis y entre sangre y tejido. Cabe resaltar que no fueron significativas para las concentraciones de CD3⁺, CD8⁺, DN, DP, NKT ni NK citotóxicas entre la ascitis y el tejido tumoral. Lo cual propone que, para las células con funciones antitumoral, la ascitis y el tejido constituyen un microambiente similar (Fig. 1).



p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), NS: no significativo.

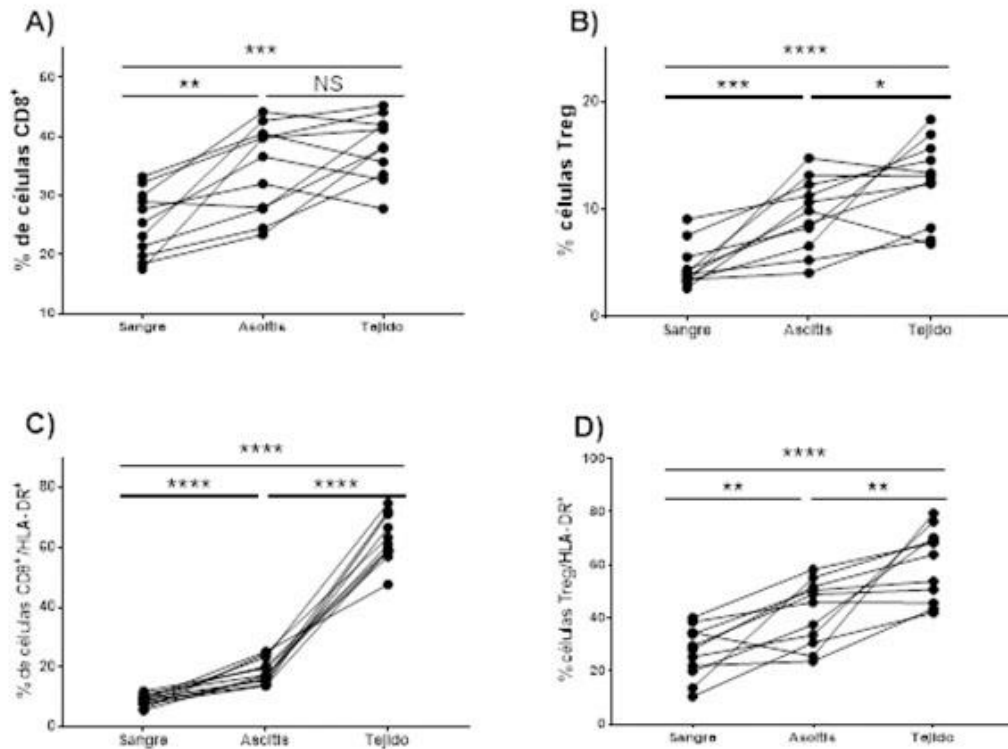
Fig. 1 - Distribución de poblaciones linfocitarias entre sangre, ascitis y tejido tumoral. A-C. inmunofenotipo de linfocitos T. D. inmunofenotipo de linfocitos B. E-F. inmunofenotipos NK citotóxicos y secretores, respectivamente. G. inmunofenotipo NKT y H-I. inmunofenotipos T dobles negativos y dobles positivos para los marcadores CD4 y CD8, respectivamente. Se muestra la significación estadística del *post-hoc de Tukey*, p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), NS: no significativo.

Las poblaciones de linfocitos B y NK citotóxicas mostraron una tendencia a la disminución de su concentración en el sentido de la sangre, ascitis al tejido tumoral y de forma más suave los linfocitos CD4⁺ (Fig. 1B, 1D y 1E). Los linfocitos CD8⁺ marcaron una tendencia contraria en ascenso (Fig. 1C), mientras que las poblaciones con menor concentración en los tres compartimentos: NKT, DN y DP, evidenciaron una dispersión de sus valores que no definió un patrón de tendencia entre compartimentos y si una variabilidad interindividual mayor.

Las concentraciones de los inmunofenotipos CD8⁺ y Treg se acumularon mayormente en el tejido tumoral seguido por la ascitis y en menor medida en la sangre.

Se evidenció una tendencia al aumento de la frecuencia de ambas células en sentido de la sangre, ascitis al tejido. Es válido destacar que en el 45 % de las pacientes con células

Treg dentro de los valores normales, se encontró un mayor porcentaje de activación, por encima del 70 %, mientras que sus contrapartes CD8⁺ activadas estuvieron por debajo del 15 %. Lo cual sugiere que el grado de activación puede compensar la relativa normalidad de las Treg, evidenciar concordancia con la menor activación de las CD8⁺ y dar como resultado un predominio supresor en el microambiente del tumor (Fig. 2).



p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****), NS: no significativo.

Fig. 2 - Subpoblaciones CD8⁺ y Treg. Concentraciones de inmunofenotipos con funciones opuestas en relación a la respuesta antitumoral, en los tres compartimentos estudiados. A) Frecuencias de CD8⁺. B) frecuencias de Treg con inmunofenotipo CD3⁺/CD4⁺/CD25^{alto}. C y D) Los mismos inmunofenotipos con expresión del marcador de activación HLA-DR. Se muestra la significación estadística del *post-test de Tukey*.

Los inmunofenotipos de linaje CD4⁺, CD8⁺, NK y Treg se correlacionaron positivamente entre compartimentos.

En los modelos de regresión se tomaron como variables independientes las concentraciones relativas de los linfocitos a nivel del tejido tumoral (Fig. 3A, y D-E), mientras que en otros casos a nivel de la ascitis (Fig. 3B y C). Todas las asociaciones fueron en sentido positivo y las que tuvieron mayor intensidad fueron las relaciones entre las concentraciones de células CD4⁺, donde el 56 % de su concentración en sangre se

asoció con el incremento de las del tejido tumoral ($R^2= 0,56$). Las concentraciones relativas en sangre de NK citotóxicas se correlacionaron en un 62 % con las concentraciones de sus homólogas de la ascitis ($R^2= 0,62$). Entre las NK secretoras de la sangre y la ascitis los incrementos de sus valores en sangre se asociaron con los incrementos en la ascitis en un 54 % ($R^2= 0,54$). Las células CD8+ y Treg se incrementaron en la ascitis en un 40 % y 39 % respectivamente en la medida que se incrementaron las Treg del tejido tumoral.

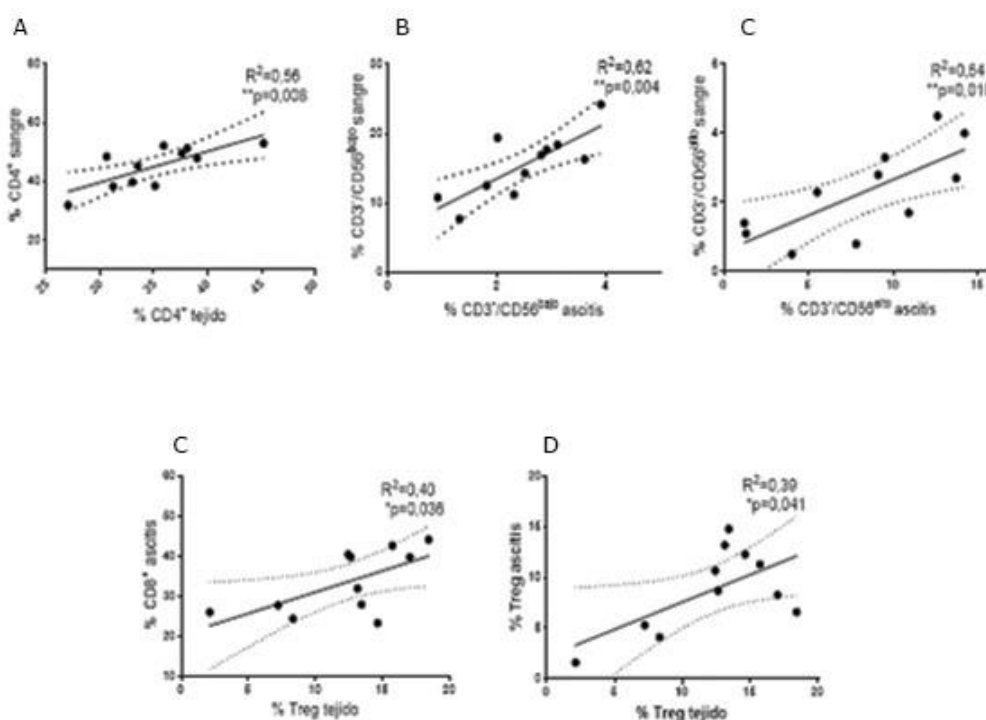


Fig. 3 - Correlación entre fenotipos de linaje. A) correlación entre las concentraciones de linfocitos CD4+ del tejido tumoral y la sangre, B) entre células NK citotóxicas de la ascitis y la sangre, C) entre NK secretoras de la ascitis y la sangre, D) entre Treg del tejido tumoral y los linfocitos CD8+ de la ascitis y E) entre Treg del tejido y las Treg de la ascitis. Líneas de puntos: intervalos de confianza al 95 %. Estadístico F, Significativo $p < 0,05$. R^2 : coeficiente de determinación.

Existió una correlación inversa entre inmunofenotipos activados con funciones opuestas en la RI antitumoral.

Las correlaciones encontradas entre Treg y CD8+ con inmunofenotipos activados fueron inversas y con buena intensidad. Es importante destacar que la disminución de CD8+ activadas en los tres compartimentos, estuvieron explicadas en buena medida por la elevación de las concentraciones de Treg activadas en esos mismos compartimentos, en un 50 %, 70 % y un 45 % respectivamente (Fig. 4A, C-D). En la asociación entre las Treg

y las CD8⁺ activadas a nivel de la ascitis, hubo el mejor ajuste a la recta con la intensidad más fuerte de todas las correlaciones estudiadas, R²= 0,70 (Fig. 4C). Curiosamente se encontró que en la medida que se incrementaron las CD8⁺ activas en el microambiente del tumor disminuyeron un 42 % en las ascitis (Fig. 4B). Estos hallazgos sugieren que la evidencia de actividad funcional se correlaciona mejor que los inmunofenotipos de linaje.

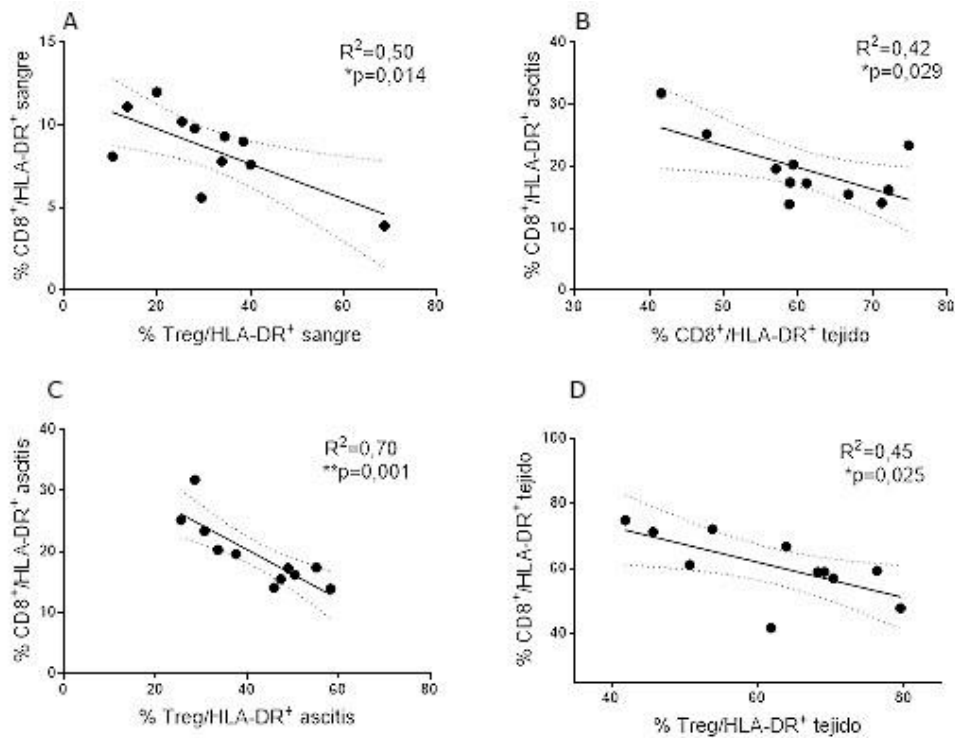


Fig. 4 - Correlaciones entre inmunofenotipos funcionales. A) Correlación entre las concentraciones de las Treg activas y CD8⁺ activas a nivel de la sangre, B) entre CD8⁺ activas del tejido y sus homólogas de la ascitis, C) entre las Treg activas y las CD8⁺ activas en la ascitis y D) entre las Treg activas y las CD8⁺ activas del tejido. Líneas de puntos: intervalos de confianza al 95 %. Estadístico F, Significativo p < 0,05. R²: coeficiente de determinación.

Discusión

Los cánceres son un grupo de enfermedades de gran heterogeneidad, que se manifiestan con carácter interindividual y también intraindividual. Este fenómeno refleja el amplio rango de posibilidades de respuestas terapéuticas y cursos clínicos que pueden observarse en una misma localización, como el CO. Por tal motivo tanto la respuesta terapéutica como la evolución clínica no pueden explicarse solamente por la clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), ni por su tipo histológico.^(16,17)

La inmuno escala se ha creado para caracterizar el infiltrado linfocitario que acompaña al tumor y ajustar el diagnóstico y pronóstico según su gradación. Esto ha conducido a la sustitución de los criterios *RECIST* por los inmuno relacionados (irRECIST). Si bien esto se realiza a nivel del tumor, en el COE se evalúa también la ascitis que aparece en muchos casos, la cual es considerada una extensión del microambiente del tumor. Además, la repercusión sistémica es de vital importancia al evaluar el sistema inmune en estas pacientes. Ante este escenario se requiere evaluar la composición inmunofenotípica a tres niveles: tumor, ascitis y sangre.^(16,17,18,19,20,21)

Las poblaciones linfocitarias seleccionadas en el presente trabajo, poseen un rol definido en el COE. Los reportes en la literatura revisada coinciden en que los linfocitos B, los TCD8⁺, las NK y las NKT y las TDN, TDP contribuyen a la respuesta antitumoral en diferentes medidas, mientras que las Treg son netamente supresoras. En este sentido las diferencias significativas encontradas entre controles y pacientes en la mitad de las poblaciones celulares estudiadas, indican que las modificaciones en las concentraciones relativas de linfocitos en las pacientes se deben a la presencia de la enfermedad. Estos resultados concuerdan con estudios previos referenciales.^(6,12,20,22) No obstante, existen otras estirpes celulares con funciones supresoras relacionadas con el curso y pronóstico de la enfermedad, no abordadas en este trabajo.

Existen fundamentos científicos que explican en parte, la dinámica de recirculación y reclutamiento de linfocitos entre la sangre, la ascitis y el tumor en el CO y se sabe que existe cierto grado de dependencia entre compartimentos, en cuanto a la concentración celular y su funcionalidad.^(20,23)

En el presente trabajo se encontraron resultados concordantes con los reportados previamente, donde algunas poblaciones como los linfocitos CD3⁺, los CD8⁺ y las NK citotóxicas no muestran diferencias significativas entre la ascitis y el tumor, ya que se considera este fluido como una extensión del microambiente del tumor y es en estos compartimentos donde se concentran mayormente.^(20,23,24)

En la actualidad al incremento de las células NK en pacientes con cáncer no siempre se asocia con buen pronóstico, como ha sido preconizado clásicamente. En el presente estudio en la sangre predominaron las citotóxicas, pero en la ascitis y el tejido tumoral predominaron las secretoras y dentro de éstas, el subfenotipo CD3⁻/CD56^{alto}/CD16⁻ a las cuales se les ha adjudicado un rol regulador y angiogénico con baja citotoxicidad y en

resumen protumoral. Estas células son similares a las deciduales pueden expresar CD9, no evaluado en la presente investigación.

El incremento de este subtipo de NK secretoras se describen en otras localizaciones como mama, colon y melanomas,⁽²⁵⁾ así como en cáncer de pulmón de células no pequeñas y se asocian con progresión.⁽²⁶⁾

Los reportes previos demuestran que en más de 90 % de los casos el tumor contiene distintas combinaciones de linfocitos B, T y NK y alrededor de un 10 % de los casos solo CD8⁺. Los estudios de *Kroeger* y otros estimaron la supervivencia en relación al tipo de infiltrado linfocitario del tumor de ovario y muestran ventaja de supervivencia de forma significativa, cuando existe una celularidad mixta (CD8⁺, CD4⁺, CD20⁺ y células plasmáticas), a diferencia de los tumores con CD8⁺ como únicos TIL. De esta forma se evidencia una vez más la importancia de la evaluación integral del inmunofenotipo en cada paciente.⁽²⁷⁾

En los últimos años se estudian con especial interés, algunas poblaciones con menor concentración en los compartimentos que se analizaron como son: las DP, DN y NKT, pues tienen un rol cada vez más definido en la inmunopatogenia del cáncer y su pronóstico. No existen muchos reportes en relación a DP y DN en COE.

Los resultados de la presente investigación, en cuanto al aumento de los linfocitos DP, coinciden con un estudio pionero realizado por *Matsuzaki* y otros, que demostraron el aumento de una población de linfocitos TDP de tipo clonal, con especificidad para el neoantígeno NY-ESO-1 y resulta un blanco atractivo para las terapias celulares en el COE.⁽²⁸⁾ Normalmente esta subpoblación linfocitaria se encuentra por debajo de 5 % y su elevación se asocia a infecciones crónicas y autoinmunidad principalmente.^(29,30,31)

Sin embargo, en cuanto a los linfocitos DN postmaduros que su rol está mejor definido en la autoinflamación, autoinmunidad y el trasplante de órganos, en el caso del cáncer están menos explicados y tienden a estar disminuidas. Se le adjudican funciones antitumorales en las cuales se involucran mecanismos de Fas/FasL. En pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas estas células se encuentran disminuidas significativamente en sangre, en comparación con los controles sanos. El presente estudio evidenció resultados similares, pero no significativos, quizás debido al reducido tamaño de la muestra.^(30,32)

Las NKT tuvieron mayor concentración en los sitios efectores periféricos y esta tendencia concuerda con estudios previos similares. Obviamente se requiere discriminar entre las de tipo I o II, con sus roles antitumoral y protumoral respectivamente.⁽³³⁾

En los estudios de correlación para analizar la dinámica entre inmunofenotipos celulares y entre compartimentos se comprobaron diferentes tendencias, que sugieren proseguir con nuevos estudios en esta línea de investigación. El valor clínico del análisis de la correlación entre los compartimentos evaluados radica en que, los modelos lineales pueden ofrecer estimadores que determinen la concentración de un linaje celular determinado en los tejidos tumorales o la ascitis, a partir de sus valores en sangre.

La sangre es mucho más accesible que el tejido tumoral o la ascitis, aunque esta última es a su vez, más accesible que el tejido. En este sentido los estudios realizados por *Wicherek* y otros demuestran que la eliminación del tumor de ovario, conlleva a la reducción del número de células Treg circulantes en sangre periférica. Estos resultados reflejan la pertinencia y factibilidad de evaluar modelos de regresión con las concentraciones de las Treg del tejido como variable independiente, pues sugieren nexos evidentes en la dinámica del tráfico linfocitario entre compartimentos.⁽³⁴⁾

Uno de los elementos que reduce las contradicciones existentes en resultados de investigaciones previas es la evaluación de inmunofenotipos funcionales.

En el presente trabajo se determinaron y correlacionaron fenotipos activados con funciones opuestas que evidenciaron una dinámica que explica el predominio de un ambiente supresor a pesar de existir un incremento de la concentración ambas poblaciones CD8⁺ y Treg, en un mismo compartimento efector. Esto es congruente con las evidentes y fisiológicas funciones de control que ejercen las Treg sobre las CD8⁺. Además, un estudio de clonalidad de linfocitos T propone que la variedad de antígenos tumorales en el COE es reducida para estas dos poblaciones celulares y un tanto que compiten por los mismos antígenos, clones un mismo antígeno y con funciones opuestas. Este planteamiento también es sugerido por los resultados de los estudios de *Bonertz* y otros en el cáncer de colon, donde al eliminar las Treg se expandían los linfocitos T específicos para los mismos antígenos que reconocían las Treg.^(19,35)

Conclusiones

Se evidenció el incremento de células con función citotóxica y T reguladoras en el tejido y la ascitis junto con linfocitos Treg. El tipo de correlación encontrada en algunos inmunofenotipos homólogos entre compartimentos, como en linfocitos CD4⁺, CD8⁺, NK y Treg, y entre fenotipos funcionales opuestos, como CD8 y Treg activadas, sugiere que se pueden estimar concentraciones celulares a partir de la sangre. La dinámica de

asociación entre estos fenotipos funcionales demostró un ambiente supresor independiente de las concentraciones globales de CD8 y Treg.

Referencias bibliográficas

1. MINSAP. Anuario estadístico de salud. 2017. La Habana. [Internet]. 2018 [acceso 24/09/2018]. Disponible en: www.sld.cu/sitios/dne
2. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med* [Internet]. 2017 [acceso 12/01/2019];14:9-32. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5365187/>
3. Sumanasekera W, Beckmann T, Fuller L, Castle M, Huff M. Epidemiology of ovarian cancer: Risk factors and prevention. *Biomed J Sci Tech Res* [Internet]. 2018 [acceso 12/01/2019];11(2). Disponible en: <https://biomedres.us/pdfs/BJSTR.MS.ID.002076.pdf>
4. Berek JS, Kehoe ST, Kumar L, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynecol Obstet*. 2018;143(Suppl. 2):59-78. DOI: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ijgo.12614>
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7-30. DOI: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21387>
6. Lukesova S, Vroblova2 V, Tosner J, Kopecky J, Sedlakova I, Čermáková E, et al. Comparative study of various subpopulations of cytotoxic cells in blood and ascites from patients with ovarian carcinoma. *Contemp Oncol (Pozn)* [Internet]. 2015 [acceso 12/01/2019];19(4):290-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4631306/>
7. Zhang B, Chen F, Xu Q, Han L, Xu J, Gao L, et al. Revisiting ovarian cancer microenvironment: a friend or a foe? *Protein Cell* [Internet]. 2018 [acceso 12/01/2019];9(8):674-92. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6053350/>
8. Zhang W, Liu K, Ye B, Hu G, Zhao K, Ren Y. Clinical and biological effects of tumor-associated lymphocytes in the presence or absence of chemotherapy for malignant ascites in ovarian cancer patients. *Oncol Let* [Internet]. 2017 [acceso

- 12/01/2019];14:3379-86. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5587970/>
9. Muñoz-Galván S, Felipe-Abrio B, García-Carrasco M, Domínguez-Piñol J, Suarez-Martinez E, Verdugo-Sivianes EM, et al. New markers for human ovarian cancer that link platinum resistance to the cancer stem cell phenotype and define new therapeutic combinations and diagnostic tools. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2019 [acceso 12/01/2019];38(1):234. Disponible en: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-019-1245-5>
10. Ceran MU, Tasdemir U, Colak E, Güngör T. Can complete blood count inflammatory parameters in epithelial ovarian cancer contribute to prognosis? a survival analysis. *J Ovarian Res* [Internet]. 2019 [acceso 12/01/2019];12(1):16. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6371536/>
11. Owens GL, Price MJ, Cheadle EJ, Hawkins RE, Gilham DE, Edmondson RJ. Ex vivo expanded tumour-infiltrating lymphocytes from ovarian cancer patients release anti-tumour cytokines in response to autologous primary ovarian cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2018 [acceso 12/01/2019];67:1519-31. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6182400/>
12. Rådestad E, Klynning C, Stikvoort A, Mogensen O, Nava S, Magalhaes I, et al. Immune profiling and identification of prognostic immune-related risk factors in human ovarian cancer, *OncoImmunology* [Internet]. 2019 [acceso 12/01/2019];8(2):e1535730. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6343785/>
13. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. The cancer immunogram. *Science* [Internet]. 2016 [acceso 12/01/2019];352(6286):658-60. Disponible en: <https://science.sciencemag.org/content/352/6286/658/tab-pdf>
14. Goode EL, Block MS, Kalli KR, Vierkant RA, Chen W, Fogarty ZC, et al. Dose-Response Association of CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Survival Time in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *JAMA Oncol* [Internet]. 2017 [acceso 12/01/2019];3(12):1-9. Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2657136>
15. Tanaka A, Sakaguchi S. Targeting Treg cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol* [Internet]. 2019 [acceso 12/01/2019];49(8):1140-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31257581/>

16. Gough A, Stern AM, Maier J, Lezon T, Shun TY, Chennubhotla C, et al. Biologically relevant heterogeneity: metrics and practical insights. *SLAS Discovery* [Internet]. 2017 [acceso 12/01/2019];22(3):213-37. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28231035/>
17. Chandra A, Pius C, Nabeel M, Nair M, Vishwanatha JK, Ahmad S, et al. Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes. *Cancer Med* [Internet]. 2019 [acceso 12/01/2019];8(16):7018-31. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6853829/>
18. Pignon JC, Jegede O, Shukla SA, Braun DA, Horak CE, Wind-Rotolo M, et al. irRECIST for the Evaluation of Candidate Biomarkers of Response to Nivolumab in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Analysis of a Phase II Prospective Clinical Trial. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2019 [acceso 12/01/2019];25(7):2174-84. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30670497/>
19. Jang M, Poh-Yin Y, Hasegawa K, Ikeda Y, Fujiwara K, Fleming GF, et al. Characterization of T cell repertoire of blood, tumor, and ascites in ovarian cancer patients using next generation sequencing. *Oncoimmunol* [Internet]. 2015 [acceso 12/01/2019];4(11):1-10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4589054/>
20. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* [Internet]. 2004 [acceso 12/01/2019];10(9):942-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15322536/>
21. Jiménez-Sánchez A, Memon D, Pourpe S, Veeraraghavan H, Li Y, Vargas HA, et al. Heterogeneous tumor-immune microenvironments among differentially growing metastases in an ovarian cancer patient. *Cell* [Internet]. 2017 [acceso 12/01/2019];170:927-38. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28841418/>
22. Zhang S, Wu M, Wang F. Immune regulation by CD8+ Treg cells novel possibilities for anticancer immunotherapy. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2018 [acceso 12/01/2019];15(9):805-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6203794/>
23. Kovacsovics-Banlowski M, Chisholm L, Vercellini J, Tucker CG, Montler R, Haley D, et al. Detailed characterization of tumor infiltrating lymphocytes in two

distinct human solid malignancies show phenotypic similarities. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2014 [acceso 12/01/2019];2(1):38. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25436113/>

24. Savant SS, Sriramkumar S, O'Hagan HM. The role of inflammation and inflammatory mediators in the development, progression, metastasis, and chemoresistance of epithelial ovarian cancer. *Cancer* [Internet]. 2018 [acceso 12/01/2019];10(8):251. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6116184/>

25. Levi I, Amsalem H, Nissan A, Darash-Yahana M, Peretz T, Mandelboim O, et al. Characterization of tumor infiltrating natural killer cell subset. *Oncotarget* [Internet]. 2015 [acceso 12/01/2019];6:13835-43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26079948/>

26. Bruno A, Focaccetti C, Pagani A, Imperatori AS, Spagnoletti M, Rotolo N, et al. The proangiogenic phenotype of natural killer cells in patients with non-small cell lung cancer. *Neoplasia* [Internet]. 2013 [acceso 12/01/2019];15:133-42. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23441128/>

27. Kroeger DR, Milne K, Nelson BH. Tumor-Infiltrating Plasma Cells Are Associated with Tertiary Lymphoid Structures, Cytolytic T-Cell Responses, and Superior Prognosis in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2016 [acceso 12/01/2019];22(12):3005-15. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26763251/>

28. Matsuzaki J, Tsuji T, Chodon T, Ryan C, Koya RC, Odunsi K. A rare population of tumor antigen-specific CD4⁺CD8⁺ double-positive $\alpha\beta$ T lymphocytes uniquely provide CD8-independent TCR genes for engineering therapeutic T cells. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2019 [acceso 12/01/2019];7:1-18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6325755/>

29. Villegas-Valverde CA, Kokuina E, Breff C. Estimating normal Values of rare T-Lymphocyte populations in peripheral blood of healthy Cuban adults. *MEDICC Review* [Internet]. 2018 [acceso 12/01/2019];20(4):20-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31242168/>

30. Nascimbeni M, Shin EC, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehmann B. Peripheral CD4⁺CD8⁺ T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions.

Blood [Internet]. 2004 [acceso 12/01/2019];104(2):478-86. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15044252/>

31. Young KJ, Kay LS, Phillips MJ and Zhang L: Antitumor activity mediated by double negative T cells. Cancer Res [Internet]. 2003 [acceso 12/01/2019];63:8014-21. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14633734/>

32. Liang H, Chu X, Zhao J, Xing G, Si Y. Elevated peripheral blood B lymphocytes and CD3+CD4-CD8- T lymphocytes in patients with non-small cell lung cancer: A preliminary study on peripheral immune profile. Oncol Lett [Internet]. 2018 [acceso 12/01/2019];15:8387-95. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5950528/>

33. Wefers C, Duiveman-de Boer T, Yigit R, Zusterzeel PLM, van Altena AM, Massuger LFAG, et al. Survival of Ovarian Cancer Patients Is Independent of the Presence of DC and T Cell Subsets in Ascites. Front Immunol [Internet]. 2019 [acceso 12/01/2019];9:3156. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6336918/>

34. Wicherek L, Jozwicki W, Windorbska W, Roszkowski K, Lukaszewska E, Wisniewski M, et al. Analysis of Treg Cell Population Alterations in the Peripheral Blood of Patients Treated Surgically for Ovarian Cancer. A Preliminary Report. Am J Reprod Immunol. 2011;66:444-50. DOI: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0897.2011.01024.x>

35. Bonertz A, Weitz J, Pietsch DH, Rahbari NN, Schlude C, Ge Y, Juenger S, Vlodavsky I, Khazaie K, Jaeger D, et al. Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma. J Clin Invest [Internet]. 2009 [acceso 12/01/2019];119:3311-21. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2769188/>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Carlos Villegas Valverde (concepción de la idea, realización del diseño general del estudio, procesamiento de las muestras y del análisis por citometría de flujo, interpretación de datos del inmunofenotipo, procesamiento estadístico, escritura del borrador inicial del artículo. Aprobación de versión final y supervisión del proyecto).

Griselda Torres López (análisis e interpretación de datos, redacción del borrador del artículo, aprobación de versión final).

María del Carmen Arango (análisis de datos en citometría, revisión del manuscrito y aprobación de versión final).

Raiza Ruíz Lorente y Daisy Hernández Durán (recolección de muestras en el HDGO Ramón González Coro, análisis de datos, revisión del manuscrito y aprobación de versión final).

Lester Lara Acosta (obtención de muestras quirúrgicas INOR, análisis de datos, revisión del manuscrito y aprobación de versión final).

Conrado Ramos Mico (recolección de datos, revisión del manuscrito y aprobación de versión final).

Alejandro Linchenat Lambert y Juan Mario Silveira Pablos (obtención de muestras quirúrgicas INOR, revisión del manuscrito y aprobación de versión final).