

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina

Programa de doctorado en Medicina 3139



TESIS DOCTORAL

Evaluación de los cambios en la respuesta linfocitaria en el microambiente tumoral como factor pronóstico y predictivo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante del cáncer de mama triple negativo estadio II-III.

Carmen Herrero Vicent.

DIRIGIDA POR:

DRA. DÑA. AMPARO RUIZ SIMÓN

DR. D. VICENTE GUILLEM PORTA.

DRA. DÑA. ANA MARIA CALATRAVA FONS.

TUTORA: DRA. DÑA. ANA LLUCH HERNÁNDEZ

MARZO 2019

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Medicina



Tesis Doctoral:

Evaluación de los cambios en la respuesta linfocitaria en el microambiente tumoral como factor pronóstico y predictivo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante del cáncer de mama triple negativo estadio II-III.

Estudios de doctorado cursados:

Programa de Doctorado en Medicina 3139

Doctorando:

Carmen Herrero Vicent

Directores:

Dra. Dña. Amparo Ruiz Simón
Dr. D. Vicente Guillem Porta
Dra. Dña. Ana Maria Calatrava Fons
Tutora: Dra. Dña. Ana Lluch Hernández

Dra. **Ana LLuch Hernández**, Catedrática de Universidad del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia.

Dra. **Amparo Ruiz Simón**, Doctora en Medicina y Jefa de la Unidad de Mama del Instituto Valenciano de Oncología de Valencia.

Dr. **Vicente Guillem Porta**, Doctor en Medicina y Jefe del Servicio de Oncología Médica del Instituto Valenciano de Oncología de Valencia.

Dra. **Ana Maria Calatrava Fons**, Doctora en Medicina y Jefa de Servicio de Anatomía Patológica del Instituto Valenciano de Oncología de Valencia.

CERTIFICAN que la presente memoria **“Evaluación de los cambios en la respuesta linfocitaria en el microambiente tumoral como factor pronóstico y predictivo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante del cáncer de mama triple negativo estadio II-III”** resume el trabajo de investigación realizado, bajo su dirección, por Carmen Herrero Vicent y constituye su Tesis para optar al título de Doctora.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Valencia a 28 de febrero 2019.



Amparo Ruiz Simón



Vicente Guillem Porta



Ana Maria Calatrava Fons



Ana LLuch Hernández

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que han ayudado a que esta tesis sea posible:

En primer lugar a mis Directores de tesis la Dra. Amparo Ruiz Simón, la Dra. Ana Calatrava y el Dr. Vicente Guillem Porta. Gracias por darme la oportunidad de profundizar en el estudio de tan apasionante materia, por guiarme en el camino, y sobre todo por creer que yo podía hacerlo. Y agradezco a la Tutora la Dra Ana Lluch Hernández el apoyo que ha demostrado por este proyecto.

En segundo lugar a todos los que han colaborado en este proyecto:

Al Sº de Anatomía Patológica y Biología Molecular del Instituto Valenciano de Oncología, ya que sin ellos no hubiera sido posible ponerlo en marcha.

Especialmente le agradezco con todo mi cariño a Paco Gozalbo, todo el tiempo compartido conmigo y enseñarme de forma paciente. A Mari Cruz por su trabajo técnico en la extracción de los cortes histológicos para este estudio.

A Marta Ramírez Calvo, Antonio Fernández-Serra y José Antonio López Guerrero por su inestimable contribución y apoyo.

En tercer lugar agradezco la ayuda que me han ofrecido en este tiempo mis adjuntos y ahora compañeros; Ángel Guerrero Zotano, Joaquín Gavilà Gregori y Eduardo Martínez de Dueñas. Por animarme en los momentos de flaqueza y ayudarme en las dudas que este trabajo ha generado durante su desarrollo.

Y dejo para el final a los pilares de mi vida; Arnau, mis padres y hermanos. Doy las gracias a Arnau por comprender esos malos días que de vez en cuando he tenido y por sus sensatos consejos. A mis padres y hermanos (Esmeralda, Pasqual, Vicente y Raquel) por estar siempre a mi lado y por todas las palabras de ánimo y cariño.

Por último doy a las gracias a las pacientes, que todos los días nos dan una lección de valentía, nos dan la energía para seguir con nuestro trabajo asistencial y nos enseñan a darle importancia a las cosas que realmente la tienen.

Dedicat a Paco Gozalbo... esta tesi és dels dos.

ÍNDICE

Índice general

1	Introducción.....	27
1.1	Bases del cáncer de mama.	27
1.2	Caracterización histopatológica del subtipo triple negativo.	31
1.2.1	Caracterización molecular del subtipo triple negativo <i>basal like</i> y <i>no basal like</i>	33
1.2.2	Clasificación por Vanderbilt del cáncer de mama triple negativo.	35
1.2.3	Comportamiento clínico del cáncer de mama triple negativo.	37
1.3	Fundamentos del tratamiento neoadyuvante en el cáncer de mama localmente avanzado.....	41
1.3.1	Indicaciones de la quimioterapia neoadyuvante.	41
1.3.2	Ventajas del abordaje neoadyuvante frente al tratamiento adyuvante.	41
1.3.3	Objetivo del tratamiento neoadyuvante: La respuesta completa patológica.	43
1.3.4	Valoración de la enfermedad residual tras la quimioterapia neoadyuvante.	44
1.3.5	Limitaciones del abordaje neoadyuvante.	46
1.4	Fundamentos para el estudio del infiltrado linfocitario tumoral.	47
1.4.1	Descripción del microambiente tumoral y carcinogénesis.....	47
1.4.2	Determinación del infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama.	52
1.4.3	Relación del infiltrado linfocitario tumoral y la quimioterapia.....	57
1.4.4	Valor pronóstico y predictivo del infiltrado linfocitario tumoral.	60
1.4.5	Las subpoblaciones del infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama.	65
2	Hipótesis y objetivos del estudio.	73
2.1	Hipótesis.	73
2.2	Objetivos del estudio.	73
3	Material y métodos.....	77
3.1	Población a estudio.	77
3.2	Diseño del estudio.	80
3.3	Estudio de infiltrado linfocitario tumoral.	81
3.4	Análisis de los datos.	85

3.5	Secuenciación de inmunogenes.	86
3.5.1	HTG EdgeSeq Immuno-Oncology: herramienta para el <i>profiling</i> tumoral.	86
3.5.2	Protocolo para el procesado de las muestras.	89
3.5.3	Preparación de las librerías.	91
3.5.4	Secuenciación y ensamblaje de datos.....	95
3.5.5	Análisis estadístico y algoritmo de agrupamiento.	96
4	Resultados del estudio.	101
4.1	Estudio descriptivo de la serie de pacientes.....	101
4.2	Estudio descriptivo de la infiltración linfocitaria tumoral en la biopsia diagnóstica y en la pieza quirúrgica.	104
4.3	Estudio descriptivo de los dos grupos según el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.....	111
4.4	Estudio del valor predictivo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.....	116
4.5	Estudio del valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral.	125
4.5.1	Valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.	126
4.5.2	Valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica	131
4.5.3	Estudio del cambio entre el infiltrado linfocitario tumoral basal en la biopsia diagnóstica y residual en la pieza quirúrgica.....	138
4.6	Conclusiones de la primera fase del estudio	144
4.7	Secuenciación de inmunogenes de la enfermedad residual tras quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo.	147
4.7.1	Características anatomopatológicas y clínicas de las pacientes analizadas.	147
4.7.2	Valoración de la robustez de los resultados.....	150
4.7.3	Valoración de la heterogeneidad intratumoral.	152
4.7.4	Análisis de expresión de inmunogenes en la enfermedad residual.....	153
4.6	Conclusiones de la segunda fase del estudio.....	168
5	Discusión.....	173
5.1	Controversias en la definición del infiltrado linfocitario tumoral.....	173

5.2	Controversias en la determinación del punto de corte del infiltrado linfocitario tumoral.....	177
5.3	Población incluida en el estudio y diferencias entre los dos grupos según el infiltrado linfocitario tumoral basal.....	179
5.4	Factores predictivos de respuesta y pronóstico dependientes del microambiente tumoral.	183
5.4.1	Factor predictivo de respuesta en el cáncer de mama triple negativo estadio II-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante.....	184
5.4.2	Valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama triple negativo.....	187
5.4.3	Valor del infiltrado linfocitario tumoral en la enfermedad residual en la pieza quirúrgica.....	189
5.4.4	Valor de los cambios de infiltrado linfocitario tumor entre la biopsia y la pieza.....	192
5.4.5	Firmas de inmunogenes en el cáncer de mama triple negativo frente al resto de subtipos moleculares en cáncer de mama.....	194
5.5	Secuenciación de nueva generación de la enfermedad residual tras quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo.	198
5.5.1	Firmas de inmunogenes y la heterogeneidad tumoral en el cáncer de mama triple negativo.....	200
5.5.2	Firmas de inmunogenes y su valor pronóstico en cáncer de mama triple negativo.....	204
6	Perspectivas de futuro. Implicaciones clínicas y terapéuticas.....	211
6.1	Alternativas terapéuticas en el cáncer de mama triple negativo: la inmunoterapia.....	211
6.1.1	Dianas terapéuticas en cáncer de mama triple negativo.....	212
6.1.2	Diseño de ensayos clínicos en cáncer de mama triple negativo.....	215
7	Conclusiones.....	221
8.	Anexo: Becas, publicaciones y presentaciones a congresos.....	225
9	Bibliografía.....	229

Lista de símbolos, abreviaturas y siglas

cTIL	Infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica
ypTIL	Infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica
ILE	Intervalo libre de evento
QTneo	Quimioterapia neoadyuvante
RCP	Respuesta completa patológica
MPCA	Análisis de componentes principales multidimensional
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RCB	Residual cancer burden
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
mRNA	RNA mensajero
TCGA	The Cancer Genome Atlas
AJCC	American Joint Committee on Cancer
FFPE	Muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina
qNPA	Ensayo de protección por nucleasas
NGS	Secuenciación de próxima generación
CMTN	Cancer de mama triple negativo
METABRIC	Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium
TMA	Microarrays de tejido

Lista de Tablas

Tabla 1 Tabla con características genómicas de los subtipos moleculares del cáncer de mama. Extraída de la revisión de Koboldt D et al., (25).

Tabla 2 Heterogeneidad en la metodología empleada para la determinación del infiltrado linfocitario tumoral.

Tabla 3 Resumen de los ensayos comentados en los que se ha determinado el infiltrado linfocitario tumoral en adyuvancia y neoadyuvancia.

Tabla 4 Resumen de las diferentes subpoblaciones presentes en el infiltrado linfocitario tumoral y la función que realizan. Tabla extraída de la revisión de Savas et al., (52).

Tabla 5 Características clínicas, anatomopatológicas y terapéuticas de las pacientes.

Tabla 6 Tabla de distribución del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

Tabla 7 Tabla de distribución del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica.

Tabla 8 Correlación de Pearson entre el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica (cTIL) y en la pieza quirúrgica (ypTIL).

Tabla 9 Características clínicas, histopatológicas y terapéuticas en función del nivel de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

Tabla 10 Tabla de contingencia entre la respuesta patológica alcanzada y los grupos según infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

Tabla 11 Relación entre la adición de platino al esquema neoadyuvante y la respuesta patológica alcanzada.

Tabla 12 Análisis univariante de las variables asociadas a un incremento del riesgo de recaída tumoral.

Tabla 13 Análisis multivariante de las variables significativas que se relacionan con un aumento del riesgo de recaída tumoral.

Tabla 14 Características clínicas, histopatológicas y terapéuticas de las pacientes que no consiguen una respuesta completa patológica en función de los niveles de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza.

Tabla 15 Características clínicas, histopatológicas y terapéuticas en función del cambio de TIL entre la biopsia y la pieza.

Tabla 16 Lista de las 33 pacientes analizadas junto a una serie de datos del historial clínico que incluyen: el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia y la pieza, el desarrollo de recaída o no y la supervivencia libre de evento en meses.

Tabla 17 Lista de los 104 genes diferencialmente expresados entre los dos clusters.

Tabla 18 Gen que destaca por expresarse diferencialmente de forma significativa entre ambos grupos de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica.

Tabla 19 Lista de los genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes con bajo versus alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia basal.

Tabla 20 Lista de los genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes con recaída vs no recaída tumoral.

Figura 1 Alteraciones moleculares en el cáncer de mama triple negativo. Extraído de la revisión de Denkert C et al., (133).

Figura 2 Residual Cancer Burden. Extraído de la revisión de Symmans WF et al., (57).

Figura 3 La heterogeneidad del cáncer de mama triple negativo. Extraído de la revisión de Balko JM et al., (140).

Figura 4 Microambiente tumoral en el cáncer de mama. Extraído de la revisión de Savas P et al., (52).

Figura 5 La evaluación de las diferentes subpoblaciones en la cooperación o antagonismo de la respuesta inmune y el cáncer. Extraído de la revisión por Salgado et al., (97).

Figura 6 Diagrama de trabajo para la valoración del infiltrado linfocitario tumoral.

Figura 7 Algoritmo del abordaje para la evaluación del infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama. Extraído de Salgado et al., (84).

Figura 8 Guía para la evaluación del porcentaje de infiltrado linfocitario en el estroma tumoral. Extraído de Salgado et al., (84).

Figura 9 Vías de señalización que guardan relación con el sistema inmune incluidas HTG EdgeSeq Immuno-Oncology.

Figura 10 Representación gráfica del flujo de trabajo durante la realización del ensayo HTG EdgeSeq.

Figura 11 Representación de la microdissección de 1.5mm^2 de 5micras de tejido fijadas con formalina y embebidas en parafina.

Figura 12 Procesado de las muestras; Obtención del área de interés con un bisturí.

Figura 13 Procesado de las muestras; Extracción de RNA mensajero.

Figura 14 Depósito del RNA mensajero en placas de 96 pocillos y preparación de las librerías.

Figura 15 Adición de las sondas complementarias a los RNA diana de los 549 genes y PCR.

Figura 16 Esquema gráfico del proceso de protección por nucleasas (qNPA).

Figura 17 Preparación de librerías con *clean-up*.

Figura 18 PCR cuantitativa.

Figura 19 Boxplot de la distribución del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

Figura 20 Curva ROC que determina el punto de corte del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

Figura 21 Boxplot de la distribución del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica.

Figura 22 Curva ROC para el punto de corte del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica.

Figura 23 Cambio del infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia diagnóstica y pieza quirúrgica.

Figura 24 Diagrama de dispersión para la correlación entre el infiltrado linfocitario tumoral en biopsia diagnóstica (cTIL) y en pieza quirúrgica (ypTIL).

Figura 25 Flow chart de distribución de las pacientes en dos grupos en función del infiltrado linfocitario tumoral presente en la biopsia diagnóstica.

Figura 26 Distribución del estadio clínico al diagnóstico (recuento del número de pacientes). El grupo de alto infiltrado linfocitario (en verde) versus el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral (en azul).

Figura 27 Recuento de pacientes tratadas mediante cirugía conservadora entre el grupo de alto infiltrado linfocitario (en verde) versus el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral (en azul).

Figura 28 Recuento de pacientes que alcanza una respuesta completa patológica en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral (en verde) versus bajo infiltrado linfocitario tumoral (en azul).

Figura 29 Boxplot que relaciona el alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica con la respuesta completa patológica versus el nivel bajo de infiltrado linfocitario tumoral con la enfermedad residual.

Figura 30 Flow chart de la distribución de las pacientes según el nivel de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica y la respuesta patológica alcanzada.

Figura 31 Recuento de pacientes según la enfermedad residual tras la cirugía por estadios. El grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral (en verde) versus bajo infiltrado linfocitario tumoral (en azul).

Figura 32 Recuento de pacientes según la enfermedad residual en la mama. El grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral (en verde) versus bajo infiltrado linfocitario tumoral (en azul).

Figura 33 Recuento de pacientes según la enfermedad residual en la axila. El grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral (en verde) versus bajo infiltrado linfocitario tumoral (en azul).

Figura 34 Relación entre el tratamiento con antraciclinas taxanos +/- platino y la respuesta patológica alcanzada.

Figura 35 Curva Kaplan Meyer de supervivencia libre de enfermedad en la población total.

Figura 36 Recuento de pacientes que presentan una recaída tumoral en función del grupo según infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

Figura 37 Flow chart de la distribución en función del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia, la respuesta patológica y la recaída tumoral.

Figura 38 Curva Kaplan Meyer de supervivencia libre de enfermedad entre el grupo de alto (verde) y bajo (azul) infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

Figura 39 Distribución de las pacientes que no consiguen una respuesta completa patológica, en función del estadio clínico al diagnóstico y el infiltrado linfocitario tumoral en la pieza.

Figura 40 Distribución de las pacientes que no consiguen una respuesta completa patológica, en función del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza y los cambios entre la biopsia-pieza.

Figura 41 Curva Kaplan Meyer de supervivencia libre de recaída tumoral en función de infiltrado linfocitario residual en pieza quirúrgica.

Figura 42 Cambio del infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia diagnóstica y la pieza quirúrgica. (preNACT=previo a la quimioterapia neoadyuvante y postNACT=postquimioterapia).

Figura 43 Distribución de las pacientes que no consiguen una respuesta completa patológica, en función del estadio clínico al diagnóstico y de los cambios que presenta el infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia y la pieza.

Figura 44 Influencia del cambio de infiltrado linfocitario tumoral entre biopsia y pieza en relación a la recaída tumoral.

Figura 45 Curva Kaplan Meyer de supervivencia libre de enfermedad entre los grupos según en cambio se infiltrado linfocitario tumoral.

Figura 46 Muestras de tejido mamario incluidas en parafina procedentes de pacientes con cáncer de mama triple negativas que no han conseguido una respuesta completa patológica y con marcaje del área con mayor presencia de células tumorales.

Figura 47 Gráfico de normalización de los resultados donde se eliminaron el duplicado del TIL13 y el TIL24 (en rojo).

Figura 48 Correlación de Pearson para valorar la robustez de los resultados.

Figura 49 Correlación de Pearson para valorar la heterogeneidad intratumoral.

Figura 50 Boxplot con normalización de los datos de los 32 casos y 11 duplicados de los mismos.

Figura 51 Análisis de componentes principales tridimensional (PCA) realizado entre el grupo de pacientes con alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza frente a pacientes con bajo infiltrado linfocitario tumoral.

Figura 52 Heat map que refleja los datos de expresión de 549 genes en los 32 casos analizados en cluster; cluster 1 en azul (n= 13) y cluster 2 en rojo (n= 19).

Figura 53 Heat map que refleja los datos de expresión de 104 genes en los 32 casos analizados en cluster; cluster 1 en azul (n= 13) y cluster 2 en rojo (n= 19).

Figura 54 Curva Kaplan Meyer de supervivencia libre de evento entre el cluster 1 y el cluster 2.

Figura 55 Heat map que refleja los datos de expresión de pacientes alto infiltrado linfocitario tumoral (n=14) bajo infiltrado linfocitario (n=17) en la pieza quirúrgica.

Figura 56 Heat map que refleja los datos de expresión de pacientes alto infiltrado linfocitario tumoral (n=4) bajo infiltrado linfocitario (n=28) en la biopsia basal.

Figura 57 Heat map de los genes que mayor expresión diferencial presentaban entre los pacientes que presentan una recaída tumoral (n= 17) frente los casos que no la presentan (n=15).

Figura 58 Boxplot de expresión diferencial en PDL1 en las pacientes que presentan una recaída tumoral y las que no la presentan.

INTRODUCCIÓN

1 Introducción.

1.1 *Bases del cáncer de mama.*

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en la mujer, siendo la segunda causa de muerte por cáncer, tras el cáncer de pulmón (1). La incidencia de cáncer de mama en España ha aumentado en los últimos años debido a la eficacia de los programas de detección precoz, diagnosticándose en 2017, 26.370 casos nuevos de cáncer de mama. Sin embargo, en los últimos años la mortalidad por cáncer de mama está disminuyendo: en 2016 se registraron 6477 casos (2). Esta disminución en la tasa de mortalidad es debida a los diagnósticos precoces, así como a los avances en la caracterización y los tratamientos específicos del cáncer de mama (3)(1).

Se han descrito diversos factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama: ser mujer, edad precoz de menarquía, edad avanzada en el primer embarazo, menopausia tardía, obesidad, sedentarismo, tratamiento hormonal sustitutivo prolongado y mutaciones de los genes BRCA 1/2. Aunque el 95% de los casos de cáncer de mama, se presentan de forma esporádica y a una edad superior a los 50 años, si bien hay un bajo porcentaje de casos, estimado en un 5%, en los que el cáncer de mama aparece como cáncer familiar. El origen de la susceptibilidad heredada reside frecuentemente en la mutación de los genes BRCA1, localizado en el cromosoma 17 (17q21) y BRCA2 localizado en el cromosoma 13 (13q12) (4). De los estudios epidemiológicos que se han realizado en la población española, se ha

concluido que no más del 20% de los casos de cáncer de mama y de ovario hereditarios se atribuyen a estos dos genes (5).

Una explicación plausible para el elevado número de muertes en España por el cáncer de mama es en parte que no tenemos una imagen completa de la heterogeneidad biológica de los tumores en cuanto a la composición celular, las alteraciones moleculares ni sensibilidad al tratamiento (6). En esta línea, se ha definido el cáncer de mama como una enfermedad heterogénea que engloba entidades clínicas, morfológicas y moleculares diferentes. Sin embargo, a lo largo de los años han surgido avances en las clasificaciones del cáncer de mama, que han supuesto un mejor abordaje de la enfermedad (7).

Desde el punto de vista histopatológico se distinguen dos grandes grupos: carcinomas in situ y carcinoma invasivo (carcinoma ductal infiltrante supone el 70% de los casos, el carcinoma lobulillar infiltrante representa el 10%, seguidos por otros subtipos menos frecuentes como carcinoma tubular, cribiforme, coloide, micropapilar y metaplásico). Posteriormente surgieron otras clasificaciones basadas en factores biológicos pronósticos y de respuesta a tratamiento como son: la expresión de receptores hormonales de estrógeno y progesterona, la sobreexpresión de Her2, el grado histológico y ki67.

La heterogeneidad del cáncer de mama no está reflejada por los parámetros histopatológicos comentado previamente ni tampoco por los parámetros clínicos que utilizamos en la práctica diaria para el estadiaje de las pacientes como son la edad, el tamaño tumoral o la afectación ganglionar (8). La variabilidad biológica que presenta el cáncer de mama se ha puesto de manifiesto gracias al análisis de la expresión de genes que hacen posible una caracterización más precisa de la biología tumoral (7). Sin embargo, los perfiles moleculares del cáncer no han

sustituido a los métodos diagnósticos histopatológicos convencionales porque constituyen un complemento al mismo (9).

La evaluación de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama en la última década nos ha permitido entender mejor el comportamiento clínico de cada uno de las entidades biológicas. El trabajo más relevante en este sentido es el publicado por Perou, que ha conducido a una nueva clasificación molecular del cáncer de mama en cuatro entidades: luminal A, luminal B, HER2 positivo y basal-like (10). Estos subtipos intrínsecos de tumores han demostrado poseer diferencias en cuanto a su incidencia (12), supervivencia (13) y respuesta a tratamientos (14).

El grupo de Standford definió una lista de genes intrínsecos, es decir, genes cuya expresión varía entre los tumores de diferentes pacientes en comparación con las muestras repetidas del mismo tumor/paciente, a través del análisis de *microarrays* de cADN de 38 cáncer de mama (36 carcinomas ductales infiltrantes y 2 carcinomas lobulillares), 1 carcinoma in situ, 1 fibroadenoma y 3 muestras de mama normales. El análisis de agrupamiento utilizando esta lista de genes intrínsecos, reveló la existencia de cuatro subtipos moleculares del cáncer de mama; luminal, tipo Her2, basal y similar a mama normal. Posteriormente un estudio del mismo grupo puso de manifiesto que el subgrupo luminal podría dividirse en al menos dos grupos con la información del seguimiento, luminal A y luminal B. (13) Estos dos subgrupos fueron confirmados y ampliados en posteriores estudios por diferentes grupos independientes (15).

Parker desarrolló el método PAM50, basado en RT-PCR de 50 genes derivado de la lista de 500 genes intrínsecos en 189 muestras fijadas, consiguiendo un predictor de subtipo intrínseco que se comprobó en dos cohortes de pacientes; una cohorte de 761 pacientes que no recibió tratamiento adyuvante y 133 pacientes tratadas

con quimioterapia neoadyuvante. Entre los tumores con receptores de estrógenos negativos, 11% eran luminales A o B, 32% eran de tipo HER2, el 50% fueron basal-like y el 7% eran similares a la mama normal. Por el contrario, los tumores con receptores de estrógenos positivos estudiados, 73% fueron luminales A o B, 11% fueron HER2, el 5% eran basal like y el 11% eran similares a la mama normal. Las conclusiones de los autores fueron que el receptor de estrógeno y el estado de HER2 no son características suficientes para obtener los verdaderos subtipos intrínsecos, lo que plantea cuál es el sistema de clasificación óptima para tomar decisiones terapéuticas (16).

	Luminal A	Luminal B	Basal-like	HER2E
% ER+/HER2-	87%	82%	10%	20%
% HER2+	7%	15%	2%	68%
% TNBC	2%	1%	80%	9%
p53 Pathway	TP53 mut (12%) Gain of MDM2 (14%)	TP53 mut (32%) Gain of MDM2 (31%)	TP53 mut (84%) Gain of MDM2 (14%)	TP53 mut (75%) Gain of MDM2 (30%)
PIK3CA/PTEN Pathway	PIK3CA mut (49%) PTEN mut/loss (13%) INPP4B loss (9%)	PIK3CA mut (32%) PTEN mut/loss (24%) INPP4B loss (16%)	PIK3CA mut (7%) PTEN mut/loss (35%) INPP4B loss (30%)	PIK3CA mut (42%) PTEN mut/loss (19%) INPP4B loss (30%)
RB1 Pathway	Cyclin D1 amp (29%) CDK4 gain (14%) Low expression of CDKN2C High expression of RB1	Cyclin D1 amp (58%) CDK4 gain (25%)	RB1 mut/loss (20%) Cyclin E1 amp (9%) High expression of CDKN2A Low expression of RB1	Cyclin D1 amp (38%) CDK4 gain (24%)
mRNA Expression	High ER cluster Low proliferation	Lower ER cluster High proliferation	Basal signature High proliferation	HER2 amplicon signature High proliferation
Copy Number	Most diploid Many with quiet genomes 1q, 8q, 8p11 gain 8p, 16q loss 11q13.3 amp (24%)	Most aneuploid Many with focal amps 1q, 8q, 8p11 gain 8p, 16q loss 11q13.3 amp (51%) 8p11.23 amp (28%)	Most aneuploid High genomic instability 1q, 10p gain 8p, 5q loss MYC focal gain (40%)	Most aneuploid High genomic instability 1q, 8q gain 8p loss 17q12 focal ERBB2 amp (71%)
DNA Mutations	PIK3CA (49%) TP53 (12%) GATA3 (14%) MAP3K1 (14%)	TP53 (32%) PIK3CA (32%) MAP3K1 (5%)	TP53 (84%) PIK3CA (7%)	TP53 (75%) PIK3CA (42%) PIK3R1 (8%)
DNA Methylation		Hyper-methylated phenotype for subset	Hypo-methylated	
Protein Expression	High Estrogen-signaling High cMYB RPPA reactive subtypes	Less Estrogen-signaling High FOXM1 and cMYC RPPA reactive subtypes	High expression of DNA repair proteins, PTEN and INPP4B loss signature (p-AKT)	High protein and phospho-protein expression of HER1 and HER2

Tabla 1 Tabla con características genómicas de los subtipos moleculares del cáncer de mama. Extraída de la revisión de Koboldt D et al., (25).

1.2 Caracterización histopatológica del subtipo triple negativo.

Los tumores triple negativo comprenden un 15 % de todos los casos de cáncer de mama (17). La definición histopatológica del subtipo de cáncer de mama triple negativo está basada en la negatividad de los receptores hormonales y la falta de sobreexpresión o amplificación de HER2 (18).

La patogenia de los tumores triple negativos se basa en dos modelos. El tradicional o estocástico considera que cualquier célula somática madura tiene el potencial de desarrollar un cáncer tras adquirir mutaciones secuenciales a lo largo del tiempo determinados por una inestabilidad genómica y/o por factores ambientales. Como alternativa a este modelo surge el modelo de las células madre tumorales, según el cual la mutación o mutaciones afectan sólo a la célula madre tisular y desregulan los mecanismos de proliferación normales.

De acuerdo con el modelo del origen de línea celular, los tumores basales procederían preferentemente de células tipo basal no diferenciadas, pero una parte puede derivar de células luminales o mioepiteliales tipo basal diferenciadas. En el modelo de las células madre los carcinoma triple negativos se originarían a partir de células madre receptores estrógenos negativas (19).

Los carcinomas triple negativos desde el punto de vista histopatológico se caracterizan por poseer un alto grado histológico/nuclear, necrosis tumoral, elevado número de mitosis, infiltrado linfocitario prominente, bordes expansivos, focos fibróticos que se asocian a la hipoxia y neoangiogénesis (19).

Desde el punto de vista histológico, los tumores triple negativos son heterogéneos e incluyen además del *basal like*, el carcinoma apocrino, el medular, el secretor, el adenoide quístico, el carcinoma metaplásico, el mioepitelial y el neuroendocrino (20).

Un estudio ha intentado mejorar la definición actual de triple negativo comentada previamente, incluyendo EGFR y queratinas CK5/6 como marcadores positivos. Esta definición se conoce como método de los 5 biomarcadores o el grupo *core basal* y puede identificar con una sensibilidad del 76% y una especificidad del 100% al subtipo *basal like* (21).

El subtipo *basal like* recibe este nombre porque las células neoplásicas expresan genes que habitualmente se encuentran en las células basales y células mioepiteliales de la mama, incluyendo las queratinas CK5/6, CK 17, P-cadherina, caveolinas 1 y 2, nestina, CD44 y EGFR.

Como se ha comentado, se ha de diferenciar los términos triple negativo y *basal like*, porque no son equivalentes. Esto se debe a que se ha observado que el 9% de los tumores *basal like* expresa receptores hormonales y un 10% sobreexpresa HER2 (22). En una serie con 4.046 cánceres de mama el 17% se definía como triple negativo, mientras que el 9% eran *basal like* por la definición de los 5 marcadores *core basal*. Cuando se determinó la supervivencia de este grupo versus al grupo sin positividad para ninguno de los 5 marcadores la supervivencia del subtipo *core basal* fue significativamente peor. Sin embargo, la utilidad clínica de clasificar la enfermedad triple negativa en *core basal*, es sólo para predecir el pronóstico (23).

1.2.1 Caracterización molecular del subtipo triple negativo *basal like* y no *basal like*.

El subtipo *basal like* fue descubierto hace más de 10 años gracias a los *microarrays* de ADN de primera generación (12) (24). A raíz de la caracterización molecular del Atlas del Genoma Humano, se han podido determinar cinco tipos de datos moleculares en 463 muestras incluyendo expresión génica, expresión de miRNA, mutaciones somáticas del ADN, estatus de metilación del ADN y aberraciones en el número de copias de ADN como son amplificaciones y deleciones (25).

Se mostraron mutaciones somáticas en el gen de la proteína supresora tumoral TP53 en el 80% de los casos, siendo las más frecuentes las mutaciones tipo sin sentido (*non-sense*) y del tipo con cambio, desplazamiento o desfase del marco de lectura (*frameshift*). Las mutaciones somáticas en TP53 cuando se combinan con datos de actividad de la vía TP53 sugieren la pérdida de la función de TP53 (26).

El segundo gen más frecuentemente mutado en los tumores *basal like* es el gen fosfoinositol-3-quinasa (PI3KCA) en un 9%. Sin embargo, independientemente de la presencia o no de dicha mutación, la vía del fosfoinositol-3-quinasa/diana de rapamicina en células de mamífero (PI3K/mTOR) se encuentra activada en la mayoría de tumores *basal like*. Entre otros mecanismos activadores de la vía de PI3K se encuentra la pérdida de la fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3 fosfatas (PTEN) o la amplificación PIK3CA (27).

Además presentan la pérdida del gen del retinoblastoma 1 (RB1) y del gen supresor de cáncer de mama 1 (BRCA1). El gen BRCA 1 está implicado en la reparación del ADN, en la regulación de la transcripción y en la remodelación de la cromatina.

Asimismo, éste es junto con el BRCA2 esencial en el proceso de la recombinación homóloga tras la ruptura de la doble cadena del ADN por agentes quimioterápicos (inhibidores de la topoisomerasa y agentes alquilantes).

Posteriormente, en un estudio que secuenció a 102 tumores triple negativos se identificó un espectro de mutaciones somáticas similar a las del Atlas del Genoma Humano (26). Se identificaron seis genes significativamente mutados en el subtipo de tumores *basal like* (el gen de la proteína supresora tumoral TP53, el gen de fosfoinositol3quinasa PI3KCA, el gen de fosfatidilinositol-2,3,4-trifosfato3-fosfatasa PTEN, el gen del retinoblastoma 1 RB1, el gen de la miosina IIIA MYO3A, y el gen de la hormona del crecimiento 1 GH1).

En los últimos años gracias a los estudios genómicos ha habido un especial interés en subclasificar la enfermedad triple negativa. El 75% de los tumores triple negativos son *basal like* y el resto son tumores que pertenecen a otros subtipos moleculares (28).

Las características de expresión de los tumores *basal like* incluyen una elevada expresión de una firma que contiene las queratinas 5, 6, 17 y una elevada expresión de genes asociados a la proliferación y relacionados a su vez con el factor de transcripción FOXM1. Éstos además se han descrito en los tumores *basal like* y se caracterizan por una hiperactivación del oncogen MYC y de la red HIFI-a/ARNT, responsable de la angiogénesis y de otros procesos inducidos por hipoxia.

El subtipo *claudin-low*, con propiedades biológicas similares a las células madre tumorales, se caracteriza por la baja expresión de genes involucrados en la unión intercelular, incluyendo tres tipos de claudinas la 3, 4 y 7 (16). Hay dos grupos de genes intrínsecos que se expresan de forma única en el subtipo *claudin-low*; uno de este grupo incluye genes asociados a las uniones intercelulares, como la e-caderina,

occludina, cingulina y claudina 3, 4 y 7. Por otro lado, el otro grupo de genes compuesto por unos 40 genes está enriquecido por genes relacionados con la respuesta inmunológica. Muchos de estos genes provienen de las células inmunitarias tipo linfocito T y B. En cuanto a la caracterización clínica del subtipo *claudin-low*, éste subtipo representa tan sólo el 5% del total registrado de cáncer de mama. En este caso, la mayoría suele presentar un elevado grado histológico la tasa de respuestas a la quimioterapia intermedia entre el subgrupo *basal like* y los luminales y presentan un peor pronóstico comparado con los tumores luminales.

1.2.2 Clasificación por Vanderbilt del cáncer de mama triple negativo.

El grupo de Vanderbilt presentó una clasificación de los tumores triple negativos en 6 subtipos diferentes llamados: subtipo basal 1, subtipo basal 2, subtipo inmunomodulador, subtipo mesénquima, subtipo mesenquimal *stem-like* y el grupo luminal/receptor de andrógeno (29).

Los subtipos basal 1 y basal 2 se caracterizan por una elevada expresión de genes proliferativos y de genes relacionados con la reparación del ADN. Las líneas celulares *in vitro* representativas de estos grupos respondieron a platinos. En el contexto de la neoadyuvancia con antraciclinas y taxanos, el subtipo basal 1 mostró la tasa de respuesta completa patológica más elevada, mientras que el subtipo basal 2 mostró la más baja (30) (31).

Los grupos mesenquimal y mesenquimal *stem-like* se caracterizan por procesos biológicos relacionados con la transición epitelio mesénquima y vías de crecimiento. Las líneas celulares *in vitro* respondieron a un inhibidor de la vía PI3K/mTOR. El subtipo *claudin-low* fue clasificado en su mayor parte por estos dos grupos.

El grupo luminal/receptor de andrógeno muestra una mejoría de la supervivencia de los pacientes respecto al resto de grupos, y se caracteriza por la elevada expresión de los genes relacionados con la vía de señalización del receptor de andrógeno. Las líneas celulares con este perfil respondieron a un antagonista del receptor de andrógeno como la bicalutamida (32) (33).

La clasificación de los subtipos inmunomodulador, mesenquimal y mesenquimal *stem-like* están definidos por la expresión génica proveniente del microambiente y por lo tanto no se tratan de verdaderos subtipos “tumoraes”. En el caso del subtipo inmunomodulador se observa un elevado infiltrado inmunológico, mientras que en el mesenquimal *stem-like* se evidencia una elevada invasión estromal de fibroblastos. Por otro lado en esta clasificación, hasta un 15% de los tumores triple negativos son clasificados como un subtipo inestable.

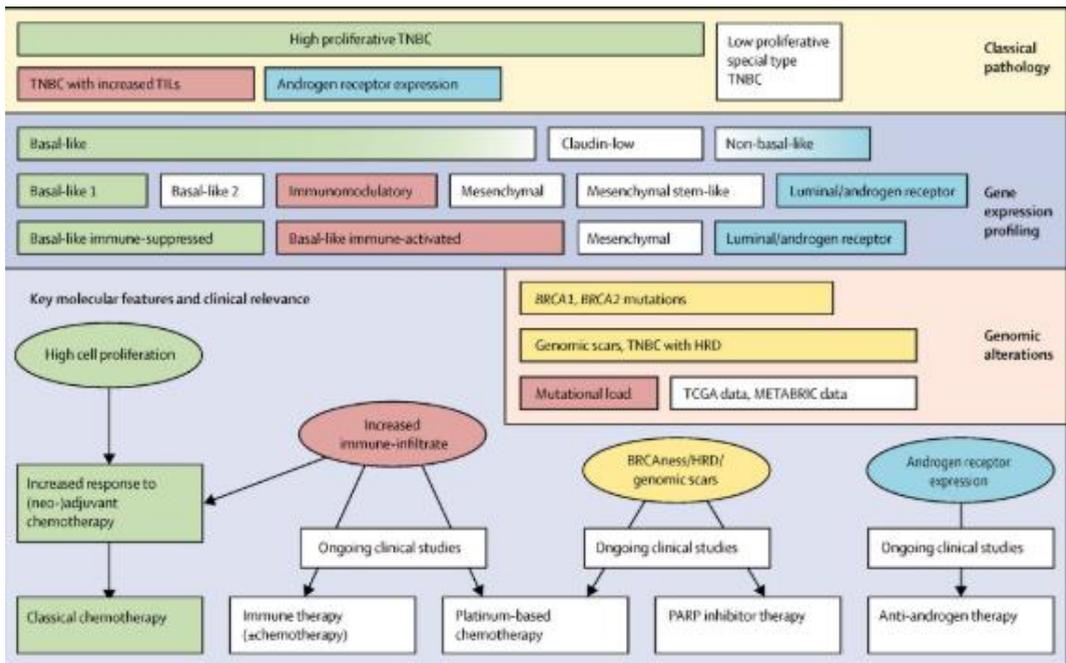


Figura 1 Alteraciones moleculares en el cáncer de mama triple negativo. Extraído de la revisión de Denkert C et al., (133).

1.2.3 Comportamiento clínico del cáncer de mama triple negativo.

En cuanto al comportamiento clínico destaca el subtipo triple negativo por el mal pronóstico que presenta (34). La edad de máxima incidencia está por encima de los 50 años, pero aproximadamente un 30% se diagnostica en mujeres menores de 40 años (8).

Se establece que en las pacientes intervenidas, el riesgo de recaída es elevado durante los 2-3 primeros años, mientras que a partir de los 5 años, las curvas de

supervivencia se aplanan sugiriendo que la mayoría de pacientes con este tipo de enfermedad, y que superen dicho periodo de seguimiento sin presentar recaída, prácticamente pueden considerarse curadas (7). Sin embargo, comparado con los otros subtipos tumorales, se caracteriza por presentar con más frecuencia metástasis viscerales y una supervivencia global de alrededor de 18 meses (19).

A pesar del mal pronóstico, hay un subgrupo de cáncer de mama triple negativo que presenta una alta quimiosensibilidad y tiene una alta tasa de respuestas completas patológicas comparadas con otros subtipos (8). El metaanálisis de Minckwitz et al., demuestra que en el contexto de neoadyuvancia con antraciclina y taxanos la tasa de respuesta en el subtipo *basal like* es del 35-40 % aproximadamente (35). Este fenómeno se ha descrito como la paradoja del subtipo triple negativo, y se ha intentado explicar por el hecho de que una alta proliferación tumoral tiene un peor pronóstico pero al mismo tiempo presenta una mayor probabilidad de respuesta a la quimioterapia (36).

La adición de platinos ha sido también estudiada en este subtipo tumoral con el objetivo de incrementar la tasa de respuestas en el contexto de la neoadyuvancia. En el estudio Geparsixto se demostró un incremento de las respuestas completas patológicas hasta 59% y de la tasa de supervivencia con carboplatino, comparado con el grupo control con antracilinas liposomales y taxanos. Aunque hay que destacar que este incremento en las tasas de respuesta completas patológicas debido al carboplatino fue en el subgrupo de pacientes sin la mutación en BRCA1/2 y que presentaban un alto infiltrado linfocitario tumoral (37). Sin embargo, los resultados del estudio GEICAM 2006-03 no demostraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de respuestas completas patológicas con

epirrubicina, ciclofosfamida seguida de docetaxel con o sin carboplatino intención neoadyuvante (38).

En el contexto de la neoadyuvancia en el subtipo de cáncer de mama triple negativo, la diferencia en supervivencia global de las respondedoras (consiguiendo respuesta completa patológica) y las no respondedoras es particularmente elevada como se demostró en el metaanálisis de Cortazar. La hazard ratio de supervivencia global en las pacientes con respuestas completas patológicas versus las no respondedoras fue de 0.16 (IC 95% 0.11-0.25) para el subgrupo de triple negativo (39). Por esta razón, el abordaje neoadyuvante en el subgrupo del cáncer de mama triple negativo localmente avanzado se ha convertido en la piedra angular.

Paradójicamente, las pacientes no respondedoras presentan un escenario crítico dado que la intuición sugiere que las células tumorales remanentes después de la quimioterapia neoadyuvante contienen una población de células intrínsecamente resistentes a la quimioterapia, y que deberían ser las responsables de las micrometástasis que derivarán en metástasis a distancia (40).

En las pacientes que no alcanzan una respuesta completa patológica, el pronóstico empeora y las estrategias postneoadyuvancia son limitadas. El estándar de tratamiento en pacientes con cáncer de mama triple negativas que no han conseguido la respuesta completa patológica es la observación.

Hay diferentes estudios que han valorado diferentes opciones en adyuvancia con resultados diferentes. El estudio CREATE-X demostró que la capecitabina adyuvante incrementaba la supervivencia en las pacientes que no conseguían una respuesta patológica completa tras neoadyuvancia. El subgrupo triple negativo (37% de las pacientes incluidas) presentó una hazard ratio de 0.58 a favor del tratamiento con capecitabina adyuvante (41).

Sin embargo, el estudio fase III GEICAM/CIBOMA ha sido presentado en el congreso de San Antonio de 2018, con resultados negativo. Es un estudio metacéntrico que comparaba en 876 pacientes con cáncer de mama triple negativo estadios I-III tratadas con cirugía y quimioterapia neoadyuvante o adyuvante estándar, la eficacia de mantenimiento con 8 ciclos de capecitabina o la observación. Con una mediana de seguimiento de 7.3 años, la supervivencia libre de enfermedad a cinco años fue del 79.6% y 76.8%, respectivamente ($p=0.135$). Y la supervivencia global a cinco años fue similar entre los dos brazos (86.2% versus 85.9%; HR, 0.92; $p=0.6228$). En el subgrupo de pacientes con fenotipo no *basal-like*, se demostró un incremento de la supervivencia libre de enfermedad a cinco años (82.6% versus 72.9%; HR, 0.53; $p=0.02$) y de la supervivencia global (89.5% versus 79.6%; HR, 0.42; $p=0.007$) a favor del brazo de la capecitabina.

En esta línea, el estudio IBSCG 22-00 investigó el tratamiento de mantenimiento con ciclofosfamida y metotrexate tras la quimioterapia neoadyuvante o adyuvante. En el subgrupo de pacientes triple negativas con afectación axilar, no se demostró un incremento de la supervivencia libre de enfermedad (42).

Por otro lado, las pacientes con mutaciones germinales y/o somáticas de BRCA1 y BRCA2, hasta un 20% de tumores *basal like* las presentan lo que sugiere que 1 de cada 5 tumores *basal like* podría beneficiarse de inhibidores de poliadenosindifosfato ribosa polimerasa 1 (43). Hoy en día, también se están identificando otras estrategias terapéuticas con intención adyuvante con inhibidores de poliadenosindifosfato ribosa polimerasa 1, clave en la reparación de las roturas de la cadena única de ADN.

1.3 *Fundamentos del tratamiento neoadyuvante en el cáncer de mama localmente avanzado.*

1.3.1 Indicaciones de la quimioterapia neoadyuvante.

La cirugía es el tratamiento de elección en el cáncer de mama precoz. En el estadio I-II se ha demostrado que la cirugía conservadora y linfadenectomía seguida de radioterapia adyuvante es equivalente a la mastectomía radical (44). En los últimos años la realización de la biopsia del ganglio centinela en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama con afectación axilar clínica reduce las complicaciones de la linfadenectomía, siendo equivalente a ésta en términos de efectividad (45).

Desde hace más de veinte años, la administración de quimioterapia con intención neoadyuvante o preoperatoria en el cáncer de mama, es una opción considerada estándar tanto en tumores operables no susceptibles de cirugía conservadora inicialmente como en tumores localmente avanzados (estadios IIIA, IIIB, IIIC y tumores inflamatorios) (46) (47) (48).

1.3.2 Ventajas del abordaje neoadyuvante frente al tratamiento adyuvante.

En el cáncer de mama operable diversos estudios han demostrado que la supervivencia libre de enfermedad, así como la supervivencia global, son

equivalentes independientemente del manejo neoadyuvante o adyuvante del tumor (49).

Recientemente, se ha publicado un metaanálisis con datos de 16 estudios que incluían 2.794 pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante y 2.799 pacientes con quimioterapia adyuvante, en el que se demostró una asociación entre las recaídas locorregionales y las cirugías conservadoras. Sin embargo, no hubo diferencias en términos de supervivencia global (HR=1.03, p=0.51) entre los dos grupos (50).

Es difícil establecer un esquema óptimo de quimioterapia neoadyuvante, pero al igual que en la adyuvancia, parece claro que el uso de antraciclinas seguido de taxanos, produce un aumento significativo en la tasa de respuestas completas patológicas y, por tanto, en la tasa de cirugías conservadoras (51).

Sin embargo, el tratamiento neoadyuvante presenta numerosas ventajas para esta modalidad de tratamiento frente al tratamiento adyuvante: la disminución del tamaño tumoral con el aumento de la posibilidad de cirugía conservadora, la infraestadificación tumoral/ganglionar, que es además un marcador predictivo de buena evolución posterior y la evaluación de la quimiosensibilidad tumoral. También se ha sugerido que el tratamiento sistémico precoz podría ser más efectivo para la erradicación precoz de las micrometástasis y así disminuir la posibilidad de diseminación de células tumorales al intervenir el tumor (49).

Además el abordaje con intención neoadyuvante en el cáncer de mama se considera el contexto ideal para la exploración de nuevas dianas terapéuticas, dado que por un lado permite estudiar *in vivo* potenciales marcadores predictivos de respuesta. Por otro lado, la enfermedad residual tras la quimioterapia neoadyuvante constituye un escenario rico en factores pronósticos y marcadores

de resistencia que pueden facilitar la selección de las pacientes candidatas a tratamientos adicionales (52).

1.3.3 Objetivo del tratamiento neoadyuvante: La respuesta completa patológica.

Desde el punto de vista pronóstico, el factor más importante en el cáncer de mama triple negativo es la presencia de la respuesta completa patológica, ya que se considera un marcador válido y precoz en largos supervivientes sin recaída tumoral (53) (54).

La definición de respuesta completa patológica más aceptada considera la ausencia de carcinoma infiltrante con la existencia o no de carcinoma ductal in situ residual post-tratamiento, ya que no influye en la supervivencia de las pacientes (55).

Sin embargo, se ha publicado un análisis del impacto de las diferentes definiciones de respuesta completa patológica en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. En este estudio que incluía 6.377 pacientes de siete ensayos prospectivos en neoadyuvancia, se concluyó que la definición de respuesta completa patológica con ausencia de tumor en mama y axila ($ypT0/ypN0$) es la que mejor discrimina entre la evolución favorable y desfavorable de las pacientes (35).

Además el análisis que hicieron según los diferentes subtipos tumorales al diagnóstico revela la respuesta completa patológica como marcador subrogado de supervivencia en las pacientes con cáncer de mama no luminales. Las pacientes que alcanzan la respuesta completa patológica son las que tienen mejor supervivencia,

mientras que las que no la alcanzan tienen una supervivencia acorde con el subtipo tumoral al diagnóstico (39) (35).

1.3.4 Valoración de la enfermedad residual tras la quimioterapia neoadyuvante.

Al igual que la determinación de la respuesta completa patológica, es importante la valoración de la enfermedad residual. Durante años la determinación del tumor residual utilizada fue la de *Miller and Payne* (56). Pero existen otros sistemas de puntuación, como el estadio patológico del tumor residual de la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) que se han utilizado en diversos estudios.

Probablemente la determinación del *score residual cancer burden* (RCB) publicado por Symmans et al., sea la mejor definición de enfermedad residual existente, ya que tiene en cuenta, aparte del tamaño de la enfermedad residual, la celularidad encontrada, así como la afectación ganglionar residual (57). Además demostraron que el RCB era un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de enfermedad y que incluso este sistema de puntuación discriminaba subgrupos pronósticos dentro de los diferentes grupos de enfermedad residual según el estadio patológico de la AJCC.

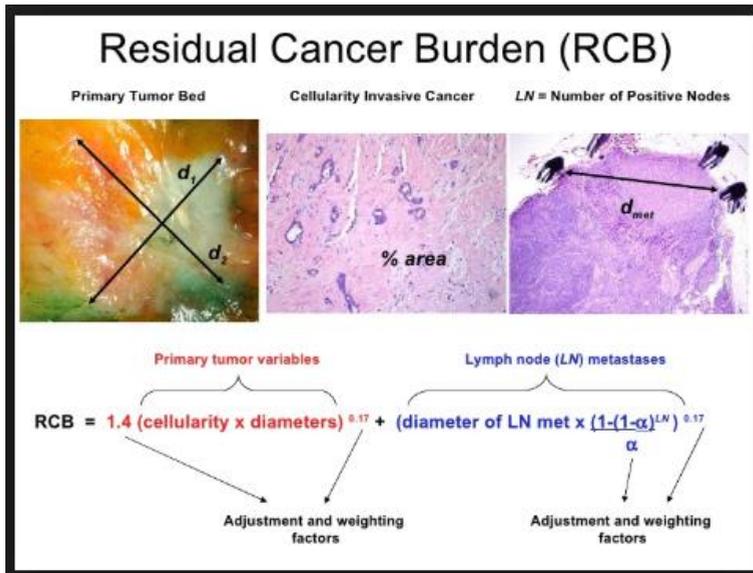


Figura 2 Residual Cancer Burden. Extraído de la revisión de Symmans WF et al., (57).

La quimioterapia neoadyuvante como se ha comentado anteriormente, es un modelo adecuado para valorar la sensibilidad de la neoplasia al tratamiento así como para buscar marcadores biológicos con valor pronóstico (58).

Junto a los factores relacionados con las células neoplásicas, han cobrado un interés creciente las alteraciones del microambiente tumoral como determinantes de la progresión neoplásica y como factores predictivos de la respuesta al tratamiento con quimioterapia (59). Entre los factores del microambiente que probablemente interactúen con la quimioterapia modulando su eficacia, se encuentra la respuesta inmune antitumoral, determinada por el grado y tipo de infiltración linfocitaria del tumor, que parece especialmente importante en el caso del cáncer de mama triple negativo. (52).

1.3.5 Limitaciones del abordaje neoadyuvante.

En los últimos años ha cambiado la percepción del cáncer de mama y sabemos que no es una entidad única (8). La introducción hace más de una década de los *microarrays* de expresión génica global, los cuales miden la expresión de todos los genes conocidos del genoma humano, ha permitido estudiar e identificar la mayor parte de los procesos biológicos que se producen en el cáncer de mama de una forma no sesgada. Estos procesos biológicos pueden formarse tanto en las mismas células tumorales, como en el microambiente tumoral o en ambos (7). La heterogeneidad biológica del cáncer de mama ha dado lugar a la aparición de distintas respuestas el mismo abordaje neoadyuvante dentro de un mismo subtipo tumoral.

Está claro que la utilización de la clasificación molecular en la práctica clínica diaria no está al alcance de todos los centros, por lo que sería muy interesante saber si con técnicas de inmunohistoquímica, mucho más asequibles, se pueden diferenciar subgrupos que se correspondan con los obtenidos mediante técnicas de evaluación de expresión génica. En este sentido, existen estudios donde se pone de manifiesto la posibilidad de clasificación en subtipos moleculares del cáncer de mama desde el punto de vista de la inmunohistoquímica.

La integración de datos genómicos junto a datos clínicos e histopatológicos, incluyendo el microambiente tumoral, puede ayudar a tomar decisiones terapéuticas más acertadas.

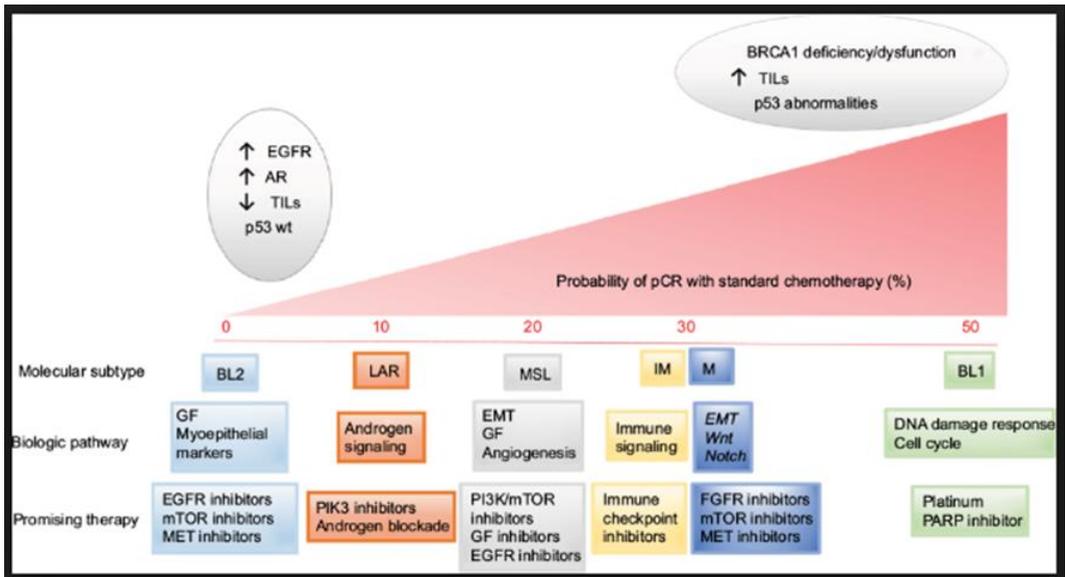


Figura 3 La heterogeneidad del cáncer de mama triple negativo. Extraído de la revisión de Balko JM et al., (140).

1.4 Fundamentos para el estudio del infiltrado linfocitario tumoral.

1.4.1 Descripción del microambiente tumoral y carcinogénesis.

En la actualidad existe suficiente evidencia para considerar la modulación de la respuesta inmune como una característica clave en el proceso de la progresión neoplásica, tal como se refleja en la actualización del esquema de Hanahan y Weinberg (60). De hecho en los últimos años se ha puesto de manifiesto la

importancia que las alteraciones del microambiente tumoral pueden tener a nivel pronóstico o predictivo de respuesta al tratamiento antineoplásico.

El microambiente tumoral comprende las células inmunes (linfocitos, células *natural killer* y células presentadoras de antígenos), los vasos sanguíneos y el estroma tumoral (fibroblastos y adipocitos). Las células inmunes que encontramos de forma más frecuente en el microambiente tumoral son los macrófagos y los linfocitos T.

Los linfocitos T presentan la capacidad de reconocer antígenos presentados por el complejo de histocompatibilidad mayor o HLA. Los linfocitos T se clasifican en citotóxicos (CD8), reguladores (CD4, CD25, FOXP3) y *helper* (CD4).

Los linfocitos T citotóxicos (CD8) producen la muerte celular mediante la producción de IFN-gamma y son fundamentales junto a las células *natural killer* en la respuesta antitumoral.

Los linfocitos T reguladores se caracterizan por la expresión de CD4, CD25, FOXP3 y se subclasifican en dos categorías: Th1-CD4, que al ser activados secretan interferón (IFN), factor de crecimiento beta y factor de necrosis tumoral (TNF), e inducen el procesamiento de antígenos y activa a los macrófagos. El segundo grupo de CD4, los Th2-CD4, expresan interleukinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que inducen la inactivación de células T. En esta línea, en algunas series de cáncer de mama se han descrito que el infiltrado tumoral elevado de CD4 se correlacionan con progresión tumoral.

Los linfocitos B son activados en los órganos linfoides por los antígenos. De esta manera los linfocitos B activos secretan diversas inmunoglobulinas que activan la cascada del complemento y reclutan más células de la inmunidad innata de la circulación. Sin embargo, también se sabe que la activación crónica de los linfocitos B puede conducir al desarrollo de tumores.

A nivel fisiológico, la inmunidad celular innata es la primera línea de defensa contra los agentes extraños e incluye macrófagos, granulocitos, mastocitos, células dendríticas y células *natural killer*. Ante las células tumorales, los macrófagos secretan citoquinas y quimoquinas, que remodelan la matriz celular reclutando leucocitos. Las células dendríticas se activan con los antígenos tumorales y migran a los órganos linfoides donde activan la inmunidad adaptativa. Por lo que la activación de la inmunidad celular innata termina activando la inmunidad celular adaptativa, cuyas células efectoras son los linfocitos T y B.

Por tanto, una de las funciones del sistema inmune es eliminar células tumorales para impedir la formación de tumores y existen tres aspectos importantes a tener en cuenta en las interacciones entre el sistema inmune y el tumor (61).

La infiltración del tumor por células inmunes: la infiltración precoz por linfocitos determina en la mayoría de las ocasiones el desarrollo posterior de las lesiones. Concretamente en el cáncer de mama se ha descrito que las lesiones precancerosas con infiltración por linfocitos T tienen un riesgo 30 veces mayor de desarrollar un carcinoma invasivo, que otras lesiones premalignas (62).

Los antígenos tumorales y la respuesta inmune: un antígeno tumoral se considera a cualquier proteína que pueda ser sintetizada en cualquier momento por la célula

neoplásica. Existen dos grandes grupos de antígenos tumorales, los exclusivos del tumor (secuencias peptídicas mutadas que son exclusivas de las modificaciones genéticas de cada tumor y por lo tanto de cada paciente en concreto) y los antígenos compartidos entre tumores que son proteínas que aparecen en varias neoplasias de distintos pacientes, habitualmente con un origen histológico común (63). En el estudio del Atlas del Genoma Humano, los investigadores encontraron una correlación entre el incremento de la tasa de mutaciones y la infiltración de los linfocitos T. En el cáncer de mama esta correlación era débil comparada con otros tumores como el melanoma, porque presenta una tasa de mutaciones inferior. Sin embargo, varía dentro de los diferentes subtipos intrínsecos de cáncer de mama, siendo el subtipo triple negativo el que presenta una tasa de mutaciones mayor que el subtipo luminal (64).

La inmunosupresión y la carcinogénesis: desde el punto de vista del sistema inmunitario, el desarrollo del cáncer, implica el éxito de los mecanismos de escape del tumor sobre la respuesta inmune antitumoral. El proceso por el que el sistema inmune detecta a la célula neoplásica y finalmente la elimina, antes del desarrollo del tumor propiamente dicho se ha denominado "*immunoediting*" y consta de tres fases: eliminación, equilibrio y escape (63). En todas ellas desempeña un papel clave el microambiente tumoral, concretamente el infiltrado linfocitario tumoral.

Diversos estudios demuestran que la respuesta inmune tiene lugar en etapas muy precoces, antes de la formación del tumor propiamente dicho. Inicialmente su objetivo es la erradicación del tumor y se produce el fenómeno de "*immunosculpting*", que es llevado a cabo por células inmunes efectoras y comprende los mecanismos a través de los cuales el tumor se transforma y adapta al sistema inmune (65).

Como se ha comentado previamente, en el infiltrado inflamatorio tumoral encontramos células T efectoras CD4, células T citotóxicas CD8, células *natural killer*, células T reguladoras CD4, CD25, FOXP3 y células B CD20. Se ha atribuido a los desequilibrios entre las distintas poblaciones de células inmunes el desarrollo de algunas neoplasias o la progresión tumoral.

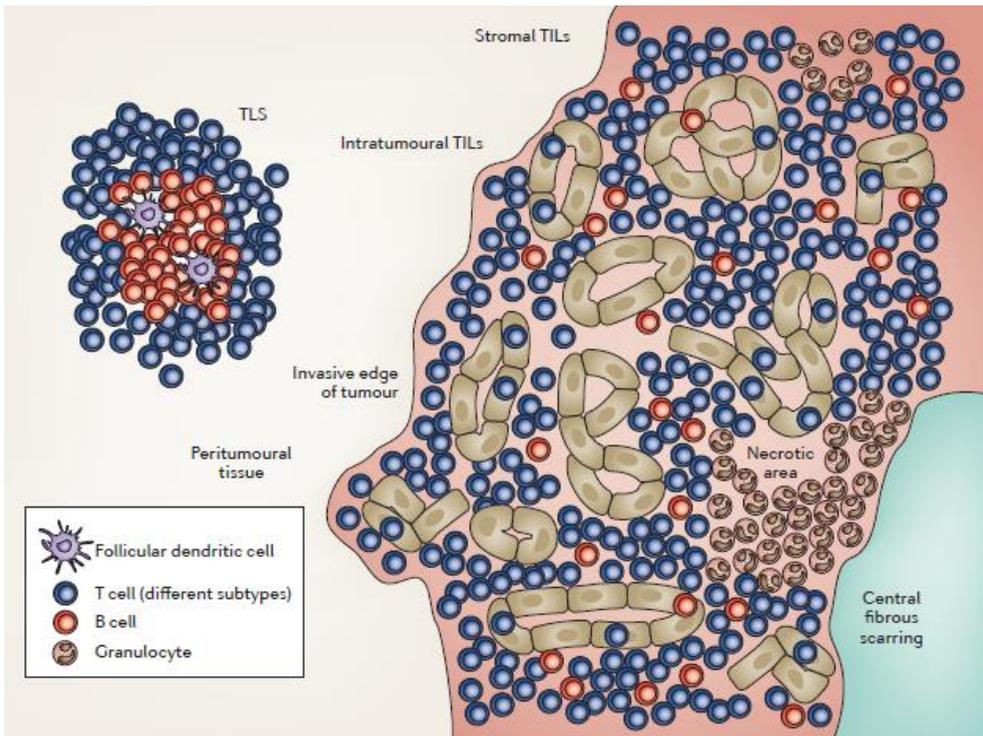


Figura 4 Microambiente tumoral en el cáncer de mama. Extraído de la revisión de Savas P et al., (52).

1.4.2 Determinación del infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama.

El infiltrado linfocitario tumoral se refiere a células mononucleares inmunes que infiltran el estroma tumoral (66). Los primeros estudios que identifican el infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama comprenden principalmente tres tipos de células mononucleares inmunes: los linfocitos T citotóxicos CD8, los linfocitos T *helper* CD4 y también en menor frecuencia pueden aparecer células *natural killer* (67).

Estudios iniciales identifican diferencias en el infiltrado linfocitario, entre el presente en el tejido mamario normal y en el tejido mamario tumoral. En el tejido mamario normal se presenta mayor número de macrófagos que juegan un papel importante en el desarrollo del lobulillo mamario (68). Durante la lactancia hay un aumento de células B que producen inmunoglobulinas que se secretan en la leche materna (69).

Mientras que en el tejido mamario tumoral se observa un mayor número de linfocitos T activados CD8/CD4, que son reactivos a los antígenos tumorales derivados de las mutaciones cáncer específicas. En estudios *in vivo* se ha demostrado la capacidad citolítica y la secreción de citoquinas de la infiltración linfocitaria tumoral en muestras con cáncer de mama (62) (70).

La determinación y cuantificación del infiltrado linfocitario tumoral se ha realizado mediante tinciones de hematoxilina-eosina en laminillas a través de un microscopio, o mediante tinciones específicas para las diferentes subpoblaciones.

Cuando se han evaluado las laminillas con hematoxilina-eosina se puede dividir el infiltrado linfocitario en el compartimento estromal o intratumoral. El estroma tumoral es el área fibrosa de estroma adyacente a las células tumorales, mientras que el infiltrado linfocitario intratumoral se refiere al infiltrado de linfocitos en contacto con las células tumorales. Así mismo como se verá, se ha descrito además una heterogeneidad espacial en el infiltrado linfocitario entre el estroma y el infiltrado (71).

En los estudios publicados hasta el momento, la determinación del nivel de infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama ha sido heterogénea, lo que ha dificultado la interpretación de los resultados.

Por un lado, la localización del infiltrado linfocitario tumoral ha sido valorada de forma diferente en diferentes estudios, algunos de ellos tenían en cuenta los linfocitos intratumorales, los estromales o ambos. Mahmoud et al., valoraban mediante un recuento manual el infiltrado linfocitario tumoral combinando tres zonas; intratumoral (nidios celulares), estroma a distancia (alejado > 1 diámetro de célula tumoral) y estroma adyacente (dentro de un diámetro celular del tumor) (72). Sin embargo, Liu et al., valoraban las diez áreas con mayor densidad de infiltrado linfocitario 5 del lecho tumoral y 5 áreas periféricas (73). Y en otros estudios anteriores como por ejemplo el de Shou et al., o Ladoire et al., no se determinaba exactamente la localización del infiltrado linfocitario (74) (75).

Por otro lado, sus puntos de corte para diferenciar entre pacientes con alto o bajo infiltrado linfocitario tumoral han sido variables en función del estudio. Loi et al., consideraron que el punto de corte para diferenciar entre alto infiltrado y bajo infiltrado linfocitario fuera de 50% teniendo en cuenta tanto el infiltrado linfocitario

intratumoral como el estromal (76). Denkert et al., consideraron que el punto de corte debía situarse en el 60% para poder clasificar los tumores con alta y baja infiltración de linfocitos tumorales cuantificando de forma digitalizada mediante *Mscope slide explorer* los linfocitos tanto del estroma como intratumorales (77).

Otros estudios como el de Ono et al., valoraban la proporción de área estromal con infiltrado linfocitario alrededor de los nidos celulares mediante un score de 0 a 3 considerando tres puntos de corte; <10%, entre 10-50% y >50%. Consideraron un score de intensidad de 0-3 definiendo como ausencia, intensidad moderada o intensidad marcada, sin especificar exactamente cómo definir cada una de las intensidades y dando lugar a una gran subjetividad. La suma de los dos scores comentados clasificaba al infiltrado linfocitario tumoral en bajo de 0-2 o alto infiltrado linfocitario entre 3-5 (78).

Mientras que Yamaguchi et al., definen el infiltrado linfocitario tumoral y peritumoral entre ausente, débil si se objetivan linfocitos ocasionales, moderado si es intermedio o denso si el infiltrado se encuentra en márgenes y estroma (79).

En la tabla siguiente se describen las diferencias en la metodología seguida para la determinación del infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama.

Estudio	N	Determinación TIL	TIL
Mahmoud 2011, 2012 (72) (80)	1334	Recuento manual de TIL en tres zonas, recuento total combinando tres zonas (Intratumoral (nidios celulares); estroma a distancia (alejado > 1 diámetro de célula tumoral; estroma adyacente (dentro de un diámetro celular del tumor). Microarray, determinación antiCD8 y conteo por microscopio. TMA determinación IHQ de CD20.	CD8 CD20
Liu 2011 (73)	1270	Recuento manual de las diez áreas con mayor densidad de TIL (5 de lecho tumoral y 5 áreas periféricas). Determinación de TIL en lecho tumoral (A) y en periferia tumoral (B). Tejido parafina, determinación IHQ de CD8 y FOXP3.	CD8 FOXP3
Sheu 2008 (74)	24	Determinación en tejido fresco. Citometría de flujo.	CD4, CD8, CD3, NK, LB
Loi 2013 (76)	2009	Infiltración linfocitaria intratumoral: Porcentaje de mononucleares que invaden los nidios tumorales. Infiltración linfocitaria estromal: Porcentaje de estroma tumoral que contiene linfocitos. Revisión por dos patólogos. Punto de corte con predominio de linfocitos, > 50%	
Denkert (77) (81)	1058	Según localización de linfocitos: intratumorales y estromales (alejados del tumor) Determinación IHQ en tejido H-E, digitalización y recuento mediante VMscope slide explorer Punto de corte con predominio de linfocitos > 60%. Adicional en 134 muestras: determinación de expresión génica mediante RT-PCR de CD3, CD247 (CD3z), PTPRC (CD45), IGKC, CXCL9, CXCL13, RPL37A	CD3, CD20
Ono (78)	92	Score de proporción: Proporción área estroma, con infiltración linfocitaria alrededor de nidios tumorales. 0-3 según ausencia, 10 o 10-50 o >50%. Score de intensidad: 0-2, según ausencia, intensidad media o marcada. TIL score es la suma de ambos scores. TIL bajos= 0-2; TIL altos =3-5	
Ladoire (75)	56	Determinación IHQ de extensión H-E. Recuento manual semicuantitativo (Black score modificado)	CD3, CD8 FOXP3, Granzyma
Yamaguchi (79)	68	Densidad TIL: Ausente Débil: linfocitos ocasionales en estroma tumoral y peritumoral Moderado: Intermedio Denso: Infiltrado denso en márgenes tumorales y estroma	CD3 CD20

DeMaria 2001 (82)	25	Determinación IHQ de extensión H-E. Recuento manual semicuantitativo (Black score modificado) Según localización: linfocitos intratumorales y en estroma (asociados al tumor)	CD3, CD8
----------------------	----	---	-------------

Tabla 2 Heterogeneidad en la metodología empleada para la determinación del infiltrado linfocitario tumoral.

Como vemos cada estudio ha seguido una metodología con una gran subjetividad y dificultad para reproducir el método empleado. Se ha considerado que para determinar la interacción entre el sistema inmune y el tumor, se describe la localización, la naturaleza y la densidad de las células inmunes en el tumor. A pesar de estas dificultades comentadas anteriormente, el valor del infiltrado linfocitario tumoral presenta un interés destacable como han reconocido diferentes investigadores independientes (83).

Sin embargo, tras la introducción de las recomendaciones del Grupo de Trabajo Internacional del infiltrado linfocitario tumoral en cáncer de mama liderado por Salgado, se podría simplificar su realización a la vez que hacer más objetiva y reproducible la valoración (84). Este paso ha sido esencial para estandarizar la valoración del infiltrado linfocitario tumoral y este trabajo sigue las recomendaciones comentadas para una valoración reproducible.

1.4.3 Relación del infiltrado linfocitario tumoral y la quimioterapia.

Algunas quimioterapias inducen apoptosis mediante el aumento de receptores de muerte, como FAS, TNF y en otras ocasiones mediante la liberación del citocromo C de la mitocondria.

La muerte celular no apoptótica puede producirse por mecanismos de necrosis, autofagia o mitosis catastrófica; mientras que la apoptosis o muerte celular programada, está activada por caspasas y tradicionalmente se ha considerado no inmunogénica. Sin embargo, cada día está más claro que la apoptosis puede suponer la activación del sistema inmune innato. Esta activación se lleva a cabo por marcadores moleculares, que se liberan de la célula cuando muere. La fosfatidilserina, es el mayor representante, aunque existen otras moléculas intracelulares que son liberadas en la muerte celular y que de igual modo, pueden activar el sistema inmune. Estas moléculas producen la activación de mediadores inflamatorios (TGF-beta e interleukina 10) (85).

La diferencia entre que la apoptosis celular active o no el sistema inmune, se encuentra en la cantidad de apoptosis que se produce. En una apoptosis controlada, las células muertas son fagocitadas por lo que no se liberan los activadores de la inflamación al exterior. Mientras que en una apoptosis masiva, no todas las células pueden ser fagocitadas, desencadenándose la cascada inflamatoria y activándose el sistema inmune (86).

Los mecanismos de cooperación del sistema inmune con la quimioterapia pueden depender de la eliminación de poblaciones de linfocitos T reguladores FOXP4 por la

quimioterapia, de la respuesta inmune generada por la liberación de determinados antígenos tras la destrucción neoplásica por la quimioterapia o bien de otros mecanismos no conocidos. Se han postulado diferentes teorías sobre cómo interacciona la quimioterapia como las antraciclinas y los taxanos con el microambiente tumoral, y el posible efecto quimiosensibilizante del infiltrado linfocitario tumoral.

Existen posibles hipótesis que explicarían la relación existente entre las antraciclinas y la inmunidad:

- Las antraciclinas pueden actuar como inhibidores de los linfocitos T reguladores FOXP3 del microambiente tumoral, lo que implicaría el cese de la inhibición del sistema inmunitario (75).

- Las antraciclinas podrían sensibilizar a las células tumorales frente a las células T citotóxicas CD8. Este hecho podría llevarse a cabo bien mediante la activación de las células citotóxicas mediada por antígeno específicos; bien, mediante activación de la vía TRAIL (apoptosis inducida por ligando, en relación con TNF) o incluso por la inducción de receptores FAS en la superficie de las células tumorales, lo cual llevaría consigo la apoptosis de la célula tumoral mediada por el receptor FAS (87).

- Las antraciclinas inducirían la muerte celular inmunogénica, mecanismo en el que intervendrían las células dendríticas y las células T citotóxicas CD8. Este proceso, en el que las antraciclinas inducirían la fagocitosis de la célula tumoral por las células dendríticas, se inicia mediante la activación de la vía mediada por la calreticulina que finalmente produce la liberación de la parte extracelular del receptor HMGB1/TLR4. Éste mecanismo es exclusivo de las antraciclinas (88).

En el caso de los taxanos, trabajos más recientes han permitido profundizar en los mecanismos que podrían participar en estos efectos inmunógenos de la

quimioterapia, que parecen mediados por TLR4 (*toll-like receptor 4*), fundamental para la presentación antigénica de determinadas moléculas liberadas por las células tumorales apoptóticas. Estos mecanismos podrían también estar mediados por otros efectos inmunes locales o sistémicos de algunos fármacos antineoplásicos, y en particular de los taxanos, que habitualmente forman parte de los regímenes de quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama (89).

Sin embargo, el microambiente tumoral puede inducir también quimiorresistencia en las células tumorales, a través de varios mecanismos como son:

- La liberación local de factores solubles como interleukina 6, que promueve la supervivencia y crecimiento tumoral.
- Las interacciones célula-célula con las células tumorales (*crosstalk* y trogocitosis oncológica, como mecanismo de quimiorresistencia a través de intercambios entre puntos de unión de la membrana celular y proteínas MDR) e interacciones célula-matriz extracelular.
- La generación de células tumorales resistentes, sometidas a condiciones de hipoxia, la cual activa el factor de crecimiento plaquetario B (PDGF-B), el factor de crecimiento B (TGF-B), el factor de crecimiento insulínico-2 (IGF-2) y el factor de crecimiento epidérmico (EGFR).
- La conversión de células tumorales en células madre tumorales.

Por lo que podemos concluir que se han descrito mecanismos de cooperación y también de antagonismo del sistema inmune con la quimioterapia.

1.4.4 Valor pronóstico y predictivo del infiltrado linfocitario tumoral.

En 1922 Sistrunck documentó que la presencia de infiltrado linfocitario tumoral se relacionaba con un favorable pronóstico en una cohorte de pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales. La relación entre el infiltrado linfocitario tumoral y el pronóstico varía según el subtipo de cáncer de mama. Como se ha comentado previamente, el subtipo de cáncer de mama triple negativo se considera el subtipo óptimo comparado con el resto de subtipos de cáncer de mama. Si nos centramos en este subtipo de cáncer, se han publicado diferentes estudios retrospectivos que demuestran el valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama triple negativo tratado tanto con quimioterapia adyuvante como neoadyuvante (52).

En el estudio BIG-02-98, con 2.009 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama con afectación ganglionar se comparó la administración de docetaxel adyuvante administrado secuencial o en combinación con doxorrubicina seguido de CMF (ciclofosfamida + metotrexate + fluoruracilo) o doxorrubicina sola o en combinación con ciclofosfamida seguida de CMF. En las 256 pacientes que presentaban un cáncer de mama triple negativo se objetivó que ante mayor infiltrado linfocitario tumoral en el estroma tumoral, se daba mejor supervivencia libre de enfermedad (HR=0.84; IC95% 0.74-0.98, p=0.025) y mayor supervivencia global independientemente de la quimioterapia recibida. Además se observó la correlación entre un incremento del 10% en el infiltrado linfocitario tumoral con una disminución del 15% del riesgo de recaída tumoral (76).

Estos resultados se confirmaron posteriormente en dos ensayos fase III ECOG 2197 y 1199, con 481 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo que recibieron tratamiento adyuvante con doxorubicina, ciclofosfamida y docetaxel. Se valoró el infiltrado linfocitario tumoral en el estroma y se demostró mejor supervivencia libre de enfermedad (HR=0.84; IC95% 0.74-0.95, p= 0.005) y por cada elevación del 10% de infiltrado linfocitario tumoral, se reducía un 18% el riesgo de recaída a distancia (p=0.040) y un 14% el riesgo de muerte (p=0.020) (90).

Ali et al., estudiaron en cuatro estudios SEARCH, BCCA, NBCS y NEAT con 12.439 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, el valor de las subpoblación linfocitaria de CD8 y FOXP3 de las CD4 reguladoras determinado por inmunohistoquímica. En el cáncer de mama triple negativo se demuestra que existe una mayor densidad de FOXP3 si lo comparamos con el resto de subtipos de cáncer de mama y que la presencia de infiltración por CD8 estromal se relaciona con una mayor supervivencia global cáncer-específica comparado con la ausencia de CD8 estromal (HR=0.79; IC95% 0.67-0.93, p=0.004). Este beneficio aún es mayor cuando las pacientes reciben antraciclinas adyuvante en el ensayo NEAT (HR =0.54; IC95% 0.37-0.79) versus tumores CD8 negativos (HR =0.87; IC95% 0.55-1.38) (91).

En base a lo comentado y de acuerdo con Simmon et al., el valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama triple negativo podría ser considerado con un nivel I de evidencia (92).

En el contexto del tratamiento neoadyuvante, la presencia de infiltrado linfocitario tumoral también se ha relacionado con un incremento de la tasa de respuestas completas patológicas (52). Ono et al., demostraron en una serie de 474 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativas tratadas con quimioterapia

neoadyuvante, que la tasa de respuestas completas patológicas era mayor en las pacientes con niveles altos de infiltrado linfocitario tumoral que en las que presentaban niveles bajos (37% versus 16%; $p=0.050$). Sin embargo, en este estudio se especificaba que la infiltración linfocitaria era alrededor de nidos tumorales. Se estableció un *score* para la proporción de área del estroma con infiltrado linfocitario de 0-3 según ausencia, <10%, 10-50% o >50% y otro *score* según la intensidad 0-2, según ausencia intensidad media o marcada. El infiltrado linfocitario tumoral era el sumatorio de la puntuación de los dos *scores* y se clasificaba en infiltrado linfocitario bajo de 0-2 y alto de 3-5 (78).

Resultados similares obtienen Yamaguchi et al., en 68 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama sometidas a quimioterapia neoadyuvante. En este estudio se definía la densidad del infiltrado linfocitario tumoral en el estroma y peritumoral, clasificando en ausente, débil si se objetivaban ocasionales linfocitos, moderado en caso de ser intermedio y denso si el infiltrado era denso a nivel de margen tumoral y estroma. Como resultado concluyen que los niveles altos de infiltrado linfocitario tumoral es el mejor predictor de respuesta completa patológica de forma independiente (OR 4.7; IC 2.2-10.06; $p=0.0001$) (79).

Sin embargo, hay estudios que determinan con mayor precisión la metodología usada para valorar el infiltrado linfocitario tumoral. Como por ejemplo, el amplio estudio publicado por Denkert et al., en el que estudian la infiltración linfocitaria intratumoral y estromal en las biopsias diagnósticas de 1.058 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama tratadas con quimioterapia neoadyuvante e incluidas en los ensayos GeparDuo (tratadas con doxorrubicina, ciclofosfamida y docetaxel) y GeparTrio (tratadas con doxorrubicina, ciclofosfamida, docetaxel, vinorelbina y capecitabina). El infiltrado linfocitario tumoral estromal e intratumoral

fue valorado como una variable continua, considerando como una variable dicotómica con el punto de corte de 60%. Clasificaron como tumores con un alto infiltrado linfocitario aquellos que el infiltrado linfocitario tumoral estromal presentaba valores mayores o iguales al 60%. Las pacientes con alto infiltrado linfocitario estromal al diagnóstico alcanzaban una mayor tasa de respuestas completas patológicas comparado con las pacientes con bajo infiltrado linfocitario (41.7% versus 9.3%) en las pacientes tratadas según el estudio Geparduo y (40% versus 13.9%) en el estudio Gepartrio. Los autores concluyen que la infiltración linfocitaria estromal es un factor predictivo estadísticamente significativo de respuesta a la quimioterapia (77).

En el estudio Gerparsixto se demostró que en las pacientes con alto infiltrado linfocitario tumoral estromal, la adición de carboplatino al esquema con antraciclinas liposomales y taxanos presentó un incremento de la tasa de respuestas completas patológicas de 74% versus 43% con antraciclinas liposomales y taxanos únicamente ($p=0.005$) (81).

Estudio	N	Subtipo	QT esquema	Localización	Resultado
BIG 2-98 (76)	256	Triple negativo	-Aduvancia Doxorrubicina Ciclofosfamida CMF Docetaxel	Estromal	Por cada 10% incremento de infiltrado linfocitario tumoral: PFS. HR=0.84 (IC95% 0.74-0.98, P=0.025)
E 2197 y E1199 (90)	481	Triple negativo	-Aduvancia Doxorrubicina Ciclofosfamida Docetaxel	Estromal	Por cada 10% incremento de infiltrado linfocitario tumoral:

					PFS. HR=0.84 (IC95% 0.74-0.95, P=0.005)
SEARCH BCCA NBCCS NEAT (91)	3590	Triple negativo RE- /Her2+	-Adyuvancia Esquemas no estandarizados	CD8 en estroma e intratumoral	Presencia de CD8 vs ausencia; Supervivencia cáncer-específica, HR=0.79 (IC95% 0.67-0.93, =0.004)
GeparDuo (77)	218	Todos	-Neoadyuvancia Doxorrubicina Ciclofosfamida Docetaxel	Estromal, intratumoral	>60% TIL estromal pCR 41.7% <60% TIL estromal pCR 9.3 %
GeparTrio (77)	840	Todos	-Neoadyuvancia Doxorrubicina Ciclofosfamida Docetaxel Vinorelbina Capecitabina	Estromal e intratumoral	>60% TIL estromal pCR 40% <60% TIL estromal pCR 13.9 %
GeparSexto (81)		Triple negativo RE- /Her2+	-Neoadyuvancia Doxorrubicina liposomal, Paclitaxel Carboplatino Bevacizumab Trastuzumab	Estromal e intratumoral	>60% TIL estromal; pCR 59.9 % <60% TIL estromal; pCR 33.8 % P<0.001

Tabla 3 Resumen de los ensayos comentados en los que se ha determinado el infiltrado linfocitario tumoral en adyuvancia y neoadyuvancia.

La evaluación del tumor residual en aquellas pacientes que no consiguen una respuesta completa patológica también puede ofrecer un valor pronóstico (39).

De María et al., presenta una serie de 25 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, tratadas con quimioterapia neoadyuvante según el esquema paclitaxel 200mg/m² cada 15 días x 4 ciclos y posteriormente tratadas con cirugía. Tras

evaluar el infiltrado linfocitario tumoral pre y post-quimioterapia neoadyuvante, los autores llegan a la conclusión de que la presencia de infiltrado linfocitario tumoral tras la quimioterapia neoadyuvante se relaciona con el grado de respuesta al tratamiento. En la discusión del estudio también se plantea la importancia del intervalo entre el último ciclo de quimioterapia neoadyuvante y la cirugía, ya que se propone como un posible mecanismo de eliminación de las células tumorales residuales la activación de los linfocitos T citotóxicos CD8, lo que se podría traducir en mayores tasas de respuesta completa patológica (82).

Con todos estos estudios, se podría postular que el infiltrado linfocitario tumoral es un factor predictivo de respuesta completa patológica. Además, el estudio del infiltrado linfocitario tumoral por inmunohistoquímica es una técnica factible desde el punto de vista asistencial y podría tener una implicación clínica para la selección de las pacientes con cáncer de mama triple negativo mediante la combinación de los dos factores predictivos de respuesta a la quimioterapia (los dependientes del tumor y los dependientes del microambiente tumoral) y como determinante de la progresión neoplásica.

1.4.5 Las subpoblaciones del infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama.

Si bien hay datos que apoyan la importancia de la infiltración linfocitaria pretratamiento como factor predictivo y pronóstico, no está totalmente establecido el papel de las distintas subpoblaciones linfocitarias. Se han planteado diferentes hipótesis con respecto al valor que presenta la evaluación de las diferentes

subpoblaciones, ya que podría contribuir al mejor conocimiento de los mecanismos de cooperación o antagonismo de la respuesta inmune y la quimioterapia.

En cuanto a las subpoblación de infiltrado linfocitario tumoral más frecuentes se observa que una mayor infiltración por linfocitos T helper CD4 se asocia a una supervivencia menor (93). Mientras que respecto al infiltrado por linfocitos T citotóxicos CD8, en un estudio con 1.334 pacientes se demuestra que una elevada infiltración tumoral por CD8 se asocia a una mayor supervivencia de forma estadísticamente significativa independientemente del tamaño, la afectación ganglionar, el grado y la infiltración linfovascular (72).

Un estudio en este sentido, es el de Ladoire et al., ya que objetivaron que un alto infiltrado de linfocitos T citotóxicos CD8 y la ausencia de linfocitos T reguladores FOXP3 se asociaba con respuestas completas patológicas tras la quimioterapia neoadyuvante (75). Coincidiendo con estos resultados, Liu et al., observaron también una correlación entre una mayor densidad de infiltración linfocitaria por linfocitos T reguladores FOXP3 intratumoral y una menor supervivencia (73).

En cuanto a las subpoblaciones linfocitarias minoritarias también se valoraron los linfocitos B CD20 peritumorales que se relacionan con una mayor supervivencia (79).

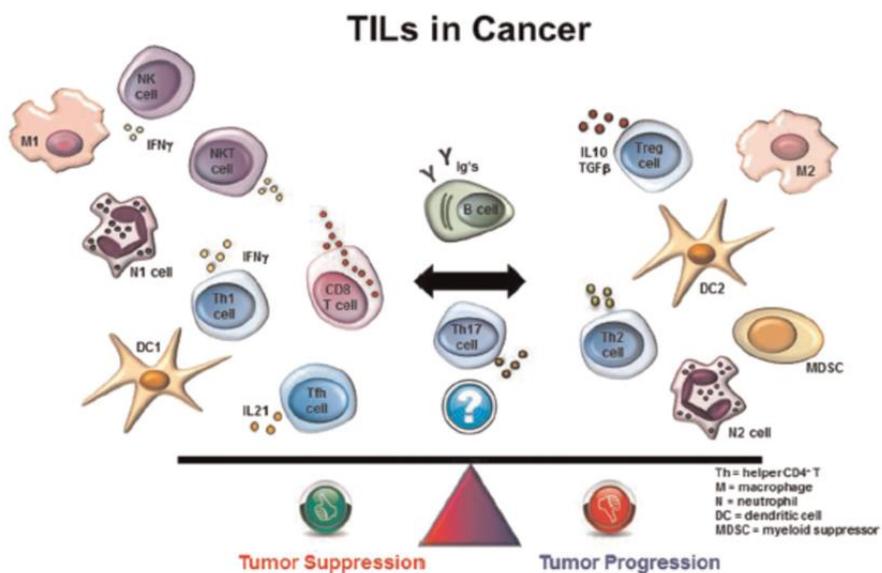


Figura 5 La evaluación de las diferentes subpoblaciones en la cooperación o antagonismo de la respuesta inmune y el cáncer. Extraído de la revisión por Salgado et al., (97).

La diversidad de la respuesta antitumoral del sistema inmune, se ve subestimada en la determinación del infiltrado linfocitario tumoral mediante hematoxilina-eosina y los marcadores inmunohistoquímicos. Existen datos que sugieren que el equilibrio o la relación entre distintas poblaciones de células inmunes tumorales pueden reflejar de forma más exacta el perfil de respuesta inmune en el microambiente tumoral que el análisis de las poblaciones aisladas. Por lo que se han valorado diferentes técnicas como la citometría de flujo y técnicas inmunohistoquímicas multicolor para valorar las diferentes subpoblaciones (94) (95).

Para complementar este estudio de subpoblaciones linfocitarias también se ha utilizado el análisis de expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa qPCR (81), microarrays de ARN (93) o secuenciación de ARN

(96). Gracias a estas técnicas, se ha establecido que el infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama comprende diferentes subpoblaciones con un significado funcional diferente.

Cell	Markers	Subtypes	Normal function	Checkpoint markers	Known/suspected function in tumour microenvironment	Proportion of TILs
Cytotoxic T cells	CD3, CD8	NA	Cytolysis of virally infected cells	PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM3, OX40	Cytolysis of tumour cells	~20%
Helper T cells	CD3, CD4	T _H 1	Response to intracellular pathogens	OX40	Support CD8 ⁺ T cells by secreting IFN γ	~40%
		T _H 2	Response to parasites	NA	Associated with ineffective antitumour immunity	
		T _H 17	Response to fungi and extracellular bacteria	NA	Antitumour and protumour effects	
		T _H 1	B-cell help	NA	Role in tertiary lymphoid structures	
		T _{REG}	Self-tolerance	CTLA-4	Tolerance of tumour antigens	
B cells	CD19, CD20	NA	Antibody production	NA	Antitumour antibodies Possible direct cytotoxic action	<20%
Macrophages	CD14, CD11b, HLA-DR	M1	Inflammation and response to intracellular pathogens	IDO	Secretion of antitumour cytokines	<5%
		M2	Wound response, angiogenesis	NA	Immunosuppressive cytokines, angiogenesis	
NK cells	CD16, CD56, NKG2D	NA	Innate immunity	IDO	Killing of tumour cells	<5%
Dendritic cells	CD135, Flt3, CD117, CD26, CD103	NA	Antigen presentation Co-stimulation	IDO	Cross presentation of tumour peptide antigens	1%

Tabla 4 Resumen de las diferentes subpoblaciones presentes en el infiltrado linfocitario tumoral y la función que realizan. Tabla extraída de la revisión de Savas et al., (52).

Este análisis de subpoblaciones es difícil de conseguir en los estudios de cohortes con un gran tamaño muestral, porque las muestras no son aptas para el estudio

mediante citometría de flujo y éstas además presentan material limitado para realizar esta serie de estudios (52). Sin embargo, en el estudio realizado por Denkert et al., con la cohorte de pacientes tratadas dentro del ensayo Geparsixto comentado previamente, la evaluación de las subpoblaciones del infiltrado linfocitario tumoral es similar al obtenido en el análisis de perfil de expresión inmunogenes (81).

Las diferentes firmas génicas publicadas hasta la fecha han sido una herramienta clave para determinar las características de los diferentes subtipos moleculares del cáncer de mama, y se ha descrito con diferente nivel de evidencia el nivel pronóstico de las mismas. A pesar de todo ello, existen sutiles discrepancias entre ellas, así como en la información pronóstica que cada plataforma estima. Los genes incluidos en las diferentes firmas génicas, en general están en relación con el ciclo celular, invasión, metástasis y angiogénesis. Por otro lado, recientes trabajos ponen de manifiesto la importancia pronóstica de determinadas expresiones génicas en relación con el sistema inmune. En base a todo lo expuesto anteriormente, cada vez se hace más patente la necesidad de integrar en estas plataformas génicas ya clásicas los genes involucrados en las interacciones del tumor con las células inmunes existentes en el microambiente tumoral.

La identificación de la biología subyacente así como la patogénesis del cáncer de mama es crucial para lograr nuevas estrategias personalizadas de diagnóstico, predicción, pronóstico y terapia. El panorama actual en el cáncer de mama triple negativo obliga a la búsqueda de nuevas estrategias de diagnóstico que permitan predecir el curso clínico y facilitar la orientación pronóstica a las pacientes con el fin de aumentar los ratios de supervivencia y garantizar el tratamiento más efectivo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2 Hipótesis y objetivos del estudio.

2.1 *Hipótesis.*

El cáncer de mama triple negativo tratado con quimioterapia neoadyuvante es el escenario idóneo para valorar los posibles cambios en los niveles de infiltrado linfocitario tumoral dado que disponemos de la biopsia antes de la quimioterapia y después obtenemos la pieza quirúrgica.

La determinación del infiltrado linfocitario tumoral es una técnica factible desde el punto de vista asistencial y podría considerarse un marcador subrogado de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante, dado que los biomarcadores clínico-patológicos no son suficientes para predecir respuestas.

2.2 *Objetivos del estudio.*

- **Primera fase.**

Objetivo primario: Determinar el valor predictivo del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica en respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas y taxanos en el cáncer de mama triple negativo estadios II-III siguiendo la metodología del Grupo Internacional de cáncer de mama.

- Valorar si la adición de platino al esquema neoadyuvante mejora la respuesta completa patológica.

Objetivo secundario: Determinar el valor pronóstico de la infiltración linfocitaria tumoral en la biopsia diagnóstica en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo estadios II-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante.

- Analizar el posible valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica en las pacientes que no se obtenga la respuesta completa patológica.
- Determinar el valor pronóstico del cambio en el infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia diagnóstica y la pieza quirúrgica.

- **Segunda fase.**

Objetivo primario: Análisis de expresión de 549 genes relacionados con la inmunoncología mediante secuenciación para conocer el subtipo de infiltración linfocitaria que queda en las pacientes que no obtengan la respuesta completa patológica.

- Caracterizar mediante genes relacionados con el sistema inmune los tumores de forma individual, así como realizar una subclasificación de los mismos permitiendo ofrecer una mejor orientación pronóstica.

Objetivos secundarios:

- Analizar la robustez de los datos obtenidos.
- Analizar la posible heterogeneidad intratumoral.
- Identificar posibles dianas terapéuticas en los pacientes que no han conseguido una respuesta completa patológica.

MATERIAL Y MÉTODOS

3 Material y métodos.

3.1 Población a estudio.

Se han estudiado las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama estadios II y III con receptores de estrógenos, progesterona y Her2 negativos por IHQ (Her2+/++ con FISH no amplificado), que recibieron quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas y taxanos entre 1998 y 2015 en las que se dispone de la biopsia pre y post-tratamiento.

El estudio diagnóstico de las pacientes fue homogéneo e incluyó el estudio de la mama, axila y el estudio de extensión. Además se colocó un clip metálico en los tumores de las pacientes en las que la indicación tras la quimioterapia neoadyuvante fue de cirugía conservadora.

- **Estudio de la mama.**

El estudio de la mama se realizó de forma homogénea según las guías clínicas. Se incluyó la exploración física completa de la paciente, prestando especial atención a la exploración de las fosas supraclaviculares e infraclaviculares, mamas, axilas bilaterales.

Las pacientes se realizaron una mamografía bilateral craneo-caudal y oblicua así como ecografía de mama bilateral.

Se realizó una biopsia percutánea con aguja gruesa del tumor primario 14G para el estudio histológico e inmunohistoquímico de la neoplasia de la mama.

En el caso de proceder a un tratamiento conservador de la mama se realizaba la identificación exacta de la localización original del tumor mediante un marcaje (clip de titanio) para prevenir en caso de presentar una respuesta completa patológica la no identificación del tumor primario.

- **Estudio de la axila.**

El estudio axilar se realizó con una exploración física, prestando especial interés en áreas latero-cervicales, fosas supraclaviculares e infraclaviculares y axilas bilaterales.

Se realizó estudio con ecografía axilar y punción aspiración con aguja fina en caso de sospecha clínica o si existía afectación axilar radiológica.

- **Estudio de extensión.**

El estudio de extensión comprende una analítica con marcadores tumorales, una TAC tóraco-abdomino-pélvico y gammagrafía ósea.

La valoración de respuesta al tratamiento tras cada ciclo fue realizada mediante exploración clínica. Tras cuatro ciclos de antraciclinas se realizó estudio ecográfico, al igual que al final del tratamiento neoadyuvante para valorar la respuesta tumoral de la mama. En caso de progresión durante la quimioterapia neoadyuvante se indicó la cirugía de rescate.

- **Tratamiento.**

Todas las pacientes recibieron tratamiento quimioterápico con antraciclinas y taxanos, según los esquemas habituales. El esquema del ensayo clínico NSABP-B27 con Adriamicina $60\text{mg}/\text{m}^2$ y Ciclofosfamida $600\text{mg}/\text{m}^2$ x 4 ciclos seguido de Docetaxel $100\text{mg}/\text{m}^2$ x 4 ciclos o Adriamicina $60\text{mg}/\text{m}^2$ y Ciclofosfamida $600\text{mg}/\text{m}^2$ x 4 ciclos seguido de Paclitaxel semanal x 12 ciclos, fueron los esquemas más empleados.

Se recogen las pacientes que recibieron tratamiento con platino asociado al taxano, según los resultados del ensayo clínico Geparsixto.

La cirugía se llevó a cabo entre la cuarta y quinta semana tras la administración del último ciclo de quimioterapia. Y tras la cirugía en los casos indicados como en las cirugías conservadoras, así como T2 y N1 clínicos recibieron radioterapia adyuvante.

- **Definición de respuesta completa patológica.**

Según el sistema del MD Anderson, la respuesta completa patológica se considera la ausencia de carcinoma infiltrante residual en la pieza de la cirugía, aunque se acepta la presencia de carcinoma ductal in situ residual (pT0 o ypTis y ypN0).

- **Seguimiento de las pacientes tras el tratamiento.**

Se actualizó el seguimiento a mayo de 2017 para el análisis de supervivencia libre de enfermedad.

Las características clínicas, histopatológicas y terapéuticas que se recogieron fueron las siguientes: edad, estado menopáusico, estadio clínico al diagnóstico, histología, grado, infiltración linfovascular, componente de carcinoma in situ asociado, confirmación histológica de la afectación ganglionar, esquema en neoadyuvancia, cirugía del tumor primario, re-resección de márgenes, tasa de respuestas completas patológicas, enfermedad residual en la pieza quirúrgica y radioterapia adyuvante.

3.2 *Diseño del estudio.*

Se recogieron de forma retrospectiva los datos clínicos de las pacientes incluidas revisando la historia clínica. Así mismo, también se recogieron los datos relacionados con el tratamiento administrado a las pacientes.

Los datos histopatológicos del tumor fueron extraídos de los informes de anatomía patológica de la biopsia de aguja gruesa realizadas al diagnóstico, así como de los informes histopatológicos de la pieza de la cirugía.

Como datos de seguimiento fueron recogidos la fecha de muerte y sus causas, la fecha de recaída y los lugares de la misma. Se calculó la supervivencia libre de evento desde la fecha de la cirugía del tumor primario a la fecha de la recaída tumoral o muerte.

De forma gráfica se representa en la siguiente figura.

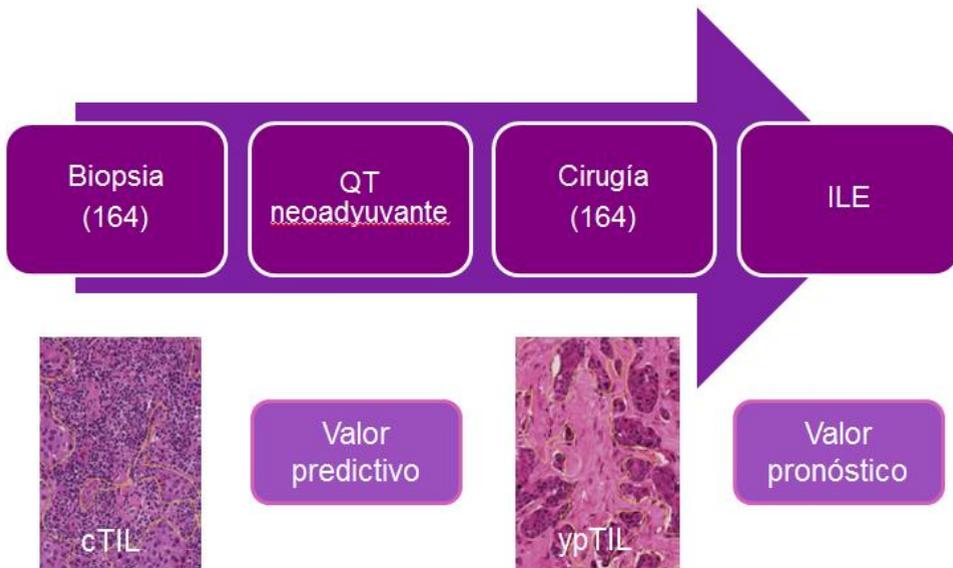


Figura 6 Diagrama de trabajo para la valoración del infiltrado linfocitario tumoral.

3.3 Estudio de infiltrado linfocitario tumoral.

La evaluación y cuantificación de la infiltración linfocitaria basal se realizó según las recomendaciones del Grupo de Trabajo Internacional en Infiltrado linfocitario tumoral (97). La valoración del infiltrado linfocitario en el estroma tumoral se llevó a cabo por el Patólogo especialista en cáncer de mama (F.G.).

Seleccionamos las pacientes con muestra histológica suficiente tumoral pre y post-tratamiento neoadyuvante. Las muestras tumorales estaban fijadas en parafina, y las preparaciones histológicas presentaban un grosor de 4-5micras y estaban teñidas con hematoxilina-eosina. Se valoró al microscopio con un objetivo de 4

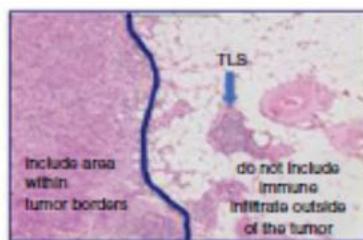
aumentos para localizar el área tumoral y definir un área de estroma tumoral representativa.

Se determinaron todas las células mononucleares (incluidos los linfocitos y las células plasmáticas), pero se excluyen los leucocitos polimorfonucleares. Se valoró el infiltrado linfocitario tumoral en el compartimento estromal es decir, el área ocupada entre los nidos de células tumorales. La evaluación del infiltrado linfocitario tumoral se describía como una variable continua (sin decimales), como el porcentaje de infiltrado linfocitario tumoral estromal.

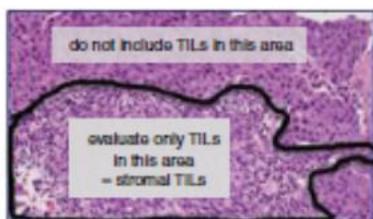
La determinación del infiltrado linfocitario tumoral fue dentro de los límites del tumor invasivo; se excluyó el infiltrado linfocitario fuera del margen del tumor infiltrante, así como las zonas alrededor del carcinoma ductal in situ y lobulillos mamarios normales. También se excluyeron las zonas áreas pequeñas con una alta densidad de infiltración de linfocitos conocidas como (*hot spots*), las zonas con artefactos de aplastamiento, necrosis, hialinización regresiva, así como en el lugar de la biopsia.

Se realizó una curva ROC para definir el punto más sensible y específico para conseguir una respuesta completa patológica, y así definir el punto de corte óptimo y así clasificar en alto infiltrado linfocitario y bajo infiltrado linfocitario en la biopsia diagnóstica. Se muestra en la Figura 7 el algoritmo de trabajo que se siguió para la determinación, así como la guía de evaluación del infiltrado linfocitario tumoral en la Figura 8.

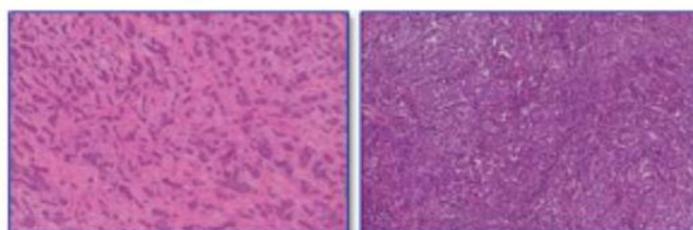
Step 1: Select tumor area



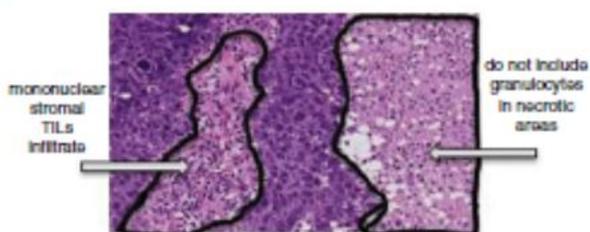
Step 2: Define stromal area



Step 3: Scan at low magnification



Step 4: Determine type of inflammatory infiltrate



Step 5: Assess the percentage of stromal TILs
(examples of percentages shown in figure 4)

Figura 7 Algoritmo del abordaje para la evaluación del infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama. Extraído de Salgado et al., (84).

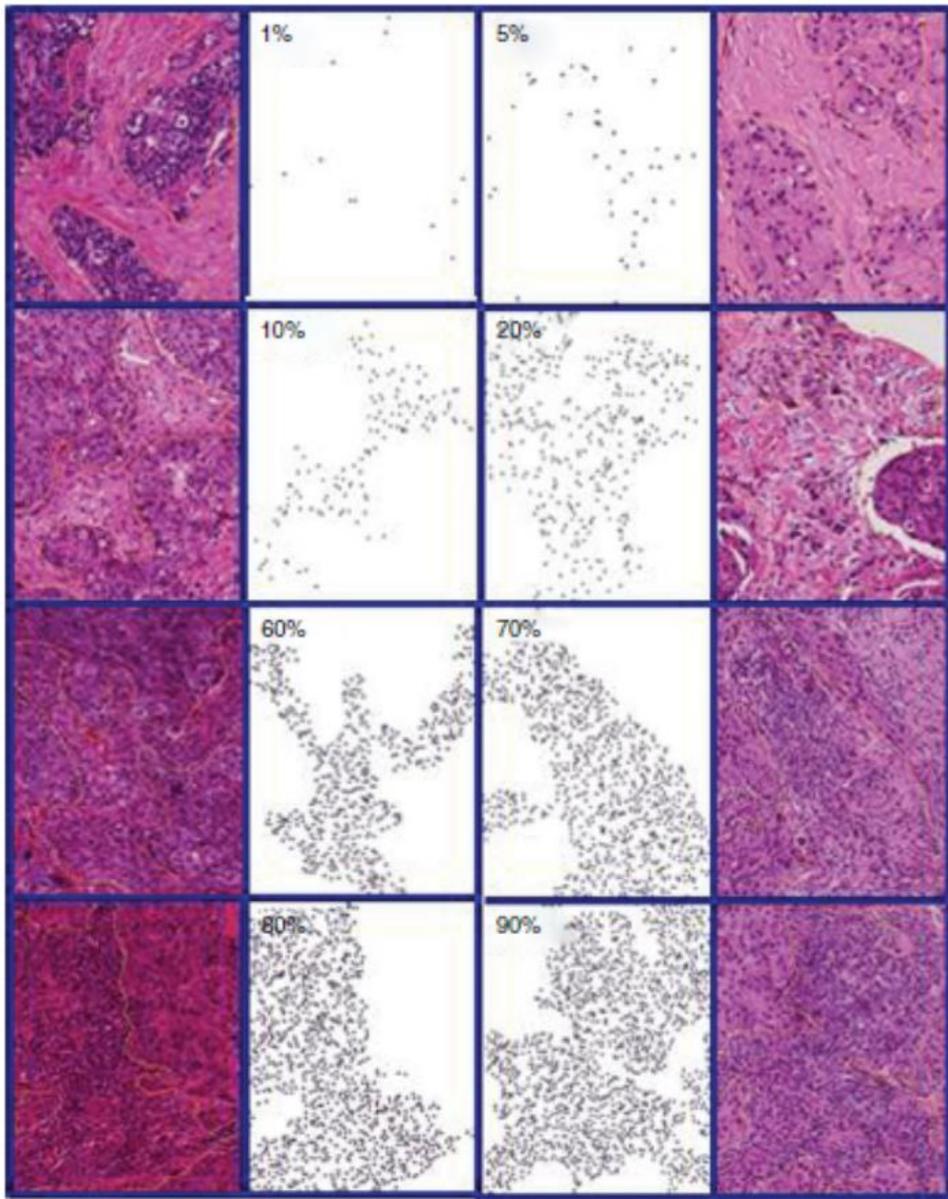


Figura 8 Guía para la evaluación del porcentaje de infiltrado linfocitario en el estroma tumoral. Extraído de Salgado et al., (84).

3.4 *Análisis de los datos.*

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 20.0.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables categóricas y numéricas. Para definir el punto de corte se realizó una curva ROC para el infiltrado linfocitario tumoral.

Se realizó un análisis exploratorio para ver las potenciales relaciones entre las variables y para ello, se realizaron tablas de contingencia para variables categóricas y se utilizó el chi cuadrado. Para comparar la media de infiltración linfocitaria de las diferentes poblaciones linfocitarias, según las diferentes características clínicas y anatomopatológicas relevantes del tumor se utilizó la prueba T de Student para muestras independientes en el caso de variables normales, la prueba U de Mann-Whitney (en las que no tenían distribución normal) y el test de ANOVA. En caso de muestras apareadas utilizamos la T de Student para muestras apareadas o bien el contraste no paramétrico de Wilcoxon para determinar si las poblaciones linfocitarias tienen relación entre sí. Se declararon significativos los contrastes cuando la significación sea inferior al 5%.

Para el análisis de supervivencia libre de enfermedad se utilizaron curvas de Kaplan-Meyer y los grupos se compararon con la prueba de log-rank. Para el análisis univariante, la diferencia entre las funciones de supervivencia se calculó utilizando el modelo de regresión de riesgo proporcional de Cox univariante. Se usaron modelos de regresión de riesgos proporcionales multivariantes de Cox y modelos de regresión logística para el análisis multivariante, que incluyó todos los factores pronósticos que fueron significativos en el análisis univariante.

3.5 *Secuenciación de inmunogenes.*

3.5.1 HTG EdgeSeq Immuno-Oncology: herramienta para el *profiling* tumoral.

El objetivo es identificar y caracterizar la firma molecular utilizando marcadores transcripcionales, la expresión de los cuales está asociada con el microambiente tumoral en el cáncer de mama triple negativo. Con el objetivo de ampliar nuestro conocimiento en la comprensión de una enfermedad heterogénea como es el cáncer de mama triple negativo, se propone el uso de una nueva tecnología genómica, el HTG EdgeSeq, en la determinación del perfil molecular de muestras de tumores de mama triple negativos incluidos en parafina (FFPE).

El empleo de HTG EdgeSeq se basa en el análisis completo de 549 los genes implicados en la respuesta inmune (Immuno-Oncology Assay) empleando una librería de sondas específicas y posterior acoplamiento, mediante secuenciación de nueva generación que permiten la obtención de perfiles cuantitativos de expresión a partir de muestras pequeñas. La información digitalizada obtenida evalúa el microambiente tumoral, perfilando las subpoblaciones de linfocitos infiltrantes tumorales que podrían facilitar la identificación de biomarcadores específicos asociados a este tipo de cáncer, mejorando así el diagnóstico y la clasificación de los diferentes subtipos de cáncer de mama para la orientación pronóstica y predictiva al tratamiento.

Dado que disponemos en el proyecto de las muestras histológicas pre y post quimioterapia, nos vamos a centrar en la enfermedad residual en cáncer de mama tras la quimioterapia neoadyuvante. Como control se emplearon el *Universal Human Reference RNA (Stratagene)*. Este control se compone de RNA procedentes de 10 líneas celulares humanas de origen tumoral.

Entre los genes analizados, encontramos importantes componentes del microambiente tumoral asociado al tumor. Para determinar las subpoblaciones celulares se incluyen genes que expresa el linfocito B como CD79A, CD79B, BTLA; genes relacionados con el linfocito T regulador CD4 como CTLA-4, IL32, FOXP3; otros genes asociados al linfocito T citotóxico CD8 como el gen CD8A, al macrófago CD68, a las células *natural killer* como KLRF1 y KLRC1 o a las células dendríticas como el gen IL3RA. Además también se incluye el gen CXCR5 como marcador de la respuesta inmune del linfocito T, el gen del antígeno leucocitario humano HLA o genes relacionados con la actividad citotóxica como GZMA y PRF1.

Otros genes analizados son genes relacionados con antígenos cáncer específicos como MAGEA, PRAME, el gen TP53, los genes supresores como CTLA4, LAG3, IDO1/2, TIM3, los genes relacionados con la inhibición de los mecanismo de diseminación metastásica tumoral (IRF1, RNF10, PI3KCG, IRF7, SLC9A3R2), el gen STAT1 relacionado con la inflamación o genes relacionados con fenotipo endotelial anérgico que es capaz de eliminar a los linfocitos T citotóxicos CD8 antes de que infiltren el tumor por la secreción de factor de crecimiento del endotelio vascular como VEGF y la interleukina 10.

Gracias al empleo de HTG EdgeSeq Immuno-Oncology Assay encontramos importantes componentes de vías de señalización principalmente conocidas por estar alteradas en el cáncer de mama. Y además, se investigó el papel de ciertos componentes implicados en la apoptosis y el ciclo celular.

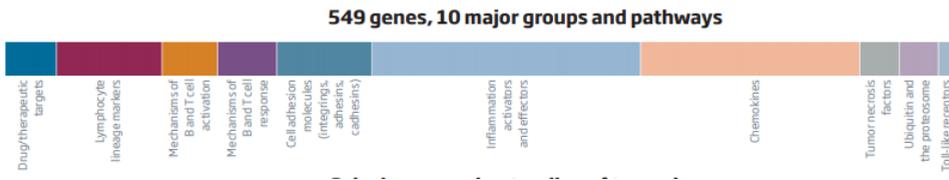


Figura 9 Vías de señalización que guardan relación con el sistema inmune incluidas HTG EdgeSeq Immuno-Oncology.

Este tipo de análisis permite la detección de alteraciones/desregulaciones en genes implicados en importantes funciones celulares que pueden arrojar información clínica significativa, visualizar dichas alteraciones dentro de una red de vías de señalización y con ello identificar la vía que más está contribuyendo al desarrollo del tumor. Mediante el uso de HTG Edge Seq, es posible obtener información sobre diferencias a nivel de expresión génica que se relacionen con la supervivencia y curso clínico. Esta información podría resultar de gran utilidad a la hora de determinar la terapia dirigida más efectiva para un determinado paciente en base a las alteraciones genéticas del cáncer de mama triple negativo en particular.

La metodología de HTG Edge Seq Immuno-Oncology Assay, está optimizada para la automatización del flujo de trabajo en secuenciación de próxima generación (NGS). El protocolo llevado a cabo para el análisis de las muestra se muestra en la figura. Los pasos a seguir se van a comentar en los siguientes apartados de forma más

detallada, empezando por el procesado de las muestras, la preparación de las librerías, la secuenciación y el ensamblaje de datos para finalmente realizar el análisis estadístico y los algoritmos de agrupamiento.

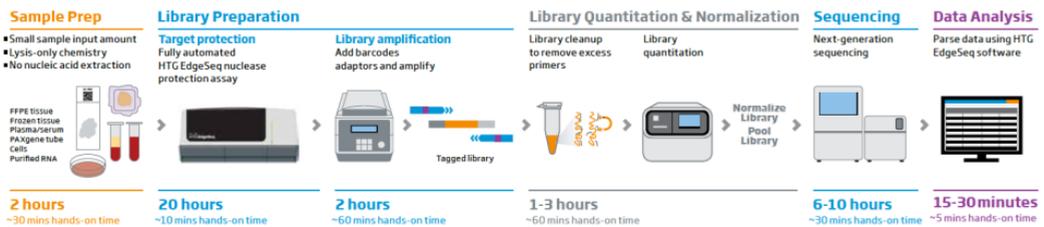


Figura 10 Representación gráfica del flujo de trabajo durante la realización del ensayo HTG EdgeSeq.

3.5.2 Protocolo para el procesado de las muestras.

El ensayo basado en HTG es compatible con múltiples tipos de muestras: muestras incluidas en parafina, plasma y suero. En nuestro caso, partimos de muestras de tejido mamario fijadas con formalina y embebidas en parafina procedentes de las pacientes con cáncer de mama triple negativas que no han conseguido una respuesta completa patológica. El área con mayor presencia de células tumorales requería la realización de un marcaje previamente por un Patólogo para facilitar el procesado de la muestra.

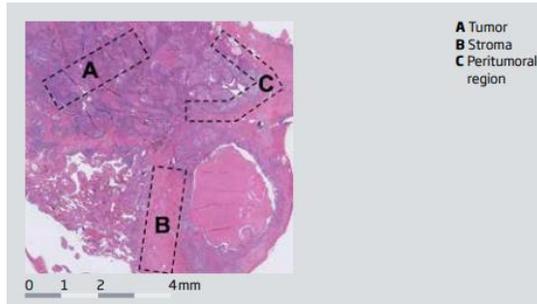


Figura 11 Representación de la microdissección de 1.5mm^2 de 5micras de tejido fijadas con formalina y embebidas en parafina.

Para poder proseguir con el análisis de expresión se hace uso de un método de extracción basado en *buffers* de lisis. Tan sólo 5 micrómetros de muestra son suficientes para el análisis de expresión génica. Se obtuvo el área de interés con ayuda de un bisturí y se midió el área con ayuda de una regla (cm^2).



Figura 12 Procesado de las muestras; Obtención del área de interés con un bisturí.

Para la extracción de RNA mensajero (mRNA), en base al área tumoral obtenida se calculó la cantidad de *buffer* de lisis a emplear en cada caso así como la cantidad de proteinasa K (1/20 del volumen del tampón de lisis). Se dejó incubar con agitación para el lisado de la muestra, que requiere aproximadamente de 30 minutos.

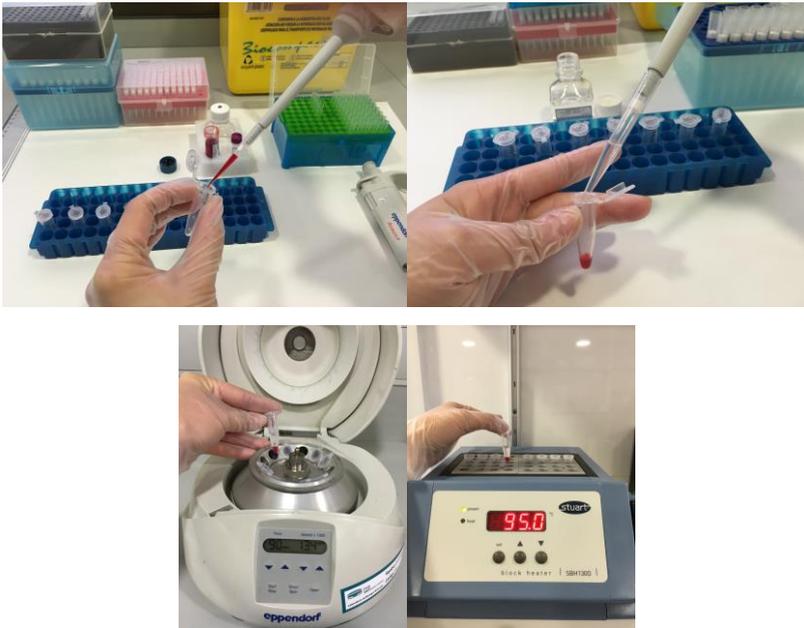


Figura 13 Procesado de las muestras; Extracción de RNA mensajero.

3.5.3 Preparación de las librerías.

Tras obtener los lisados de las muestras, que contiene los mRNA representativos del tumor de mama triple negativo, se depositaron en placas de 96 pocillos. Se transfirieron al procesador HTG Edge Seq donde se realiza el proceso de protección por nucleasas (qNPA) en la preparación de la librería para la posterior secuenciación y análisis de expresión de forma automatizada.



Figura 14 Depósito del RNA mensajero en placas de 96 pocillos y preparación de las librerías.

Para capturar los transcritos, se añadió un *buffer* de lisis junto con las sondas complementarias a los RNA diana correspondientes a los 549 genes a analizar.

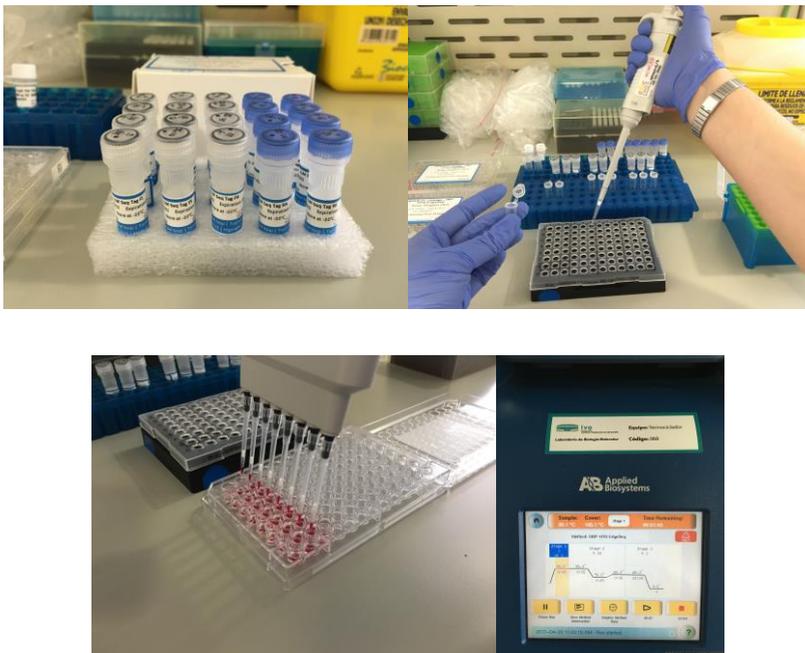


Figura 15 Adición de las sondas complementarias a los RNA diana de los 549 genes y PCR.

Para atrapar los transcritos expresados, las sondas de protección específicas para los transcritos diana (que presentan cebadores universales o *wings*) se unieron a los mRNA contra los que iban dirigidos así como a las sondas *Wingman*. De forma que la sonda, el transcrito y las dos sondas *Wingman* forman un heterodúplex al unirse, como puede verse en el punto 1 de la Figura siguiente.

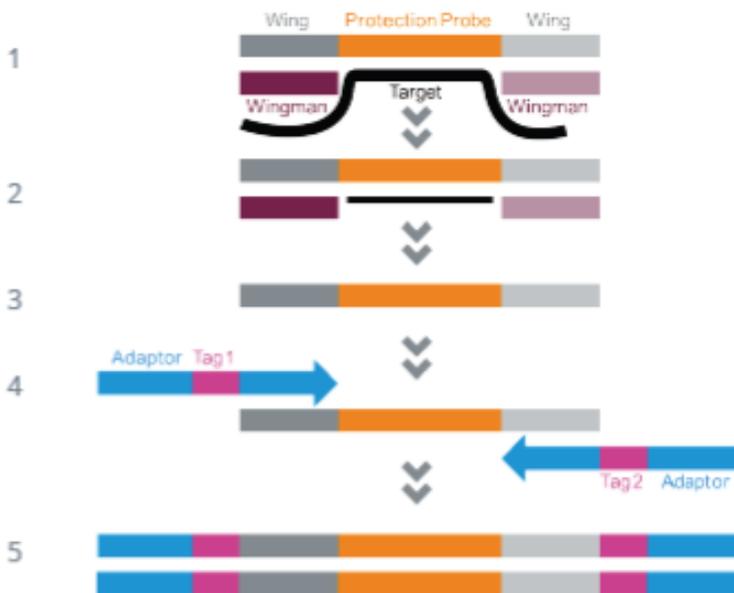


Figura 16 Esquema gráfico del proceso de protección por nucleasas (qNPA).

A continuación, como se ve en el punto 2 de la Figura previa, se añade la nucleasa S1 cuya función es degradar las sondas que no han hibridado así como el mRNA no hibridado, resultando en un ratio estequiométrico de DNA 1:1 entre las sondas y el RNA diana .

En este punto, la reacción se detiene con una solución de parada y calor, la cual destruye a la nucleasa S1 y el RNA hibridado, quedando únicamente las sondas de protección, correspondientes a cada mRNA diana expresado, listas para la unión de los adaptadores. Estas sondas, que son representativas del RNA nativo, están diseñadas para protegerse a esta degradación (punto 3 de la Figura previa)

Se añaden los adaptadores de secuenciación y los *barcodes* ó identificadores a las sondas presentes y se procede a purificar y cuantificar los productos de PCR los cuales ya estarán listos para la secuenciación. No son necesarios pasos adicionales como ligación, adenilación o transcripción reversa en este proceso.

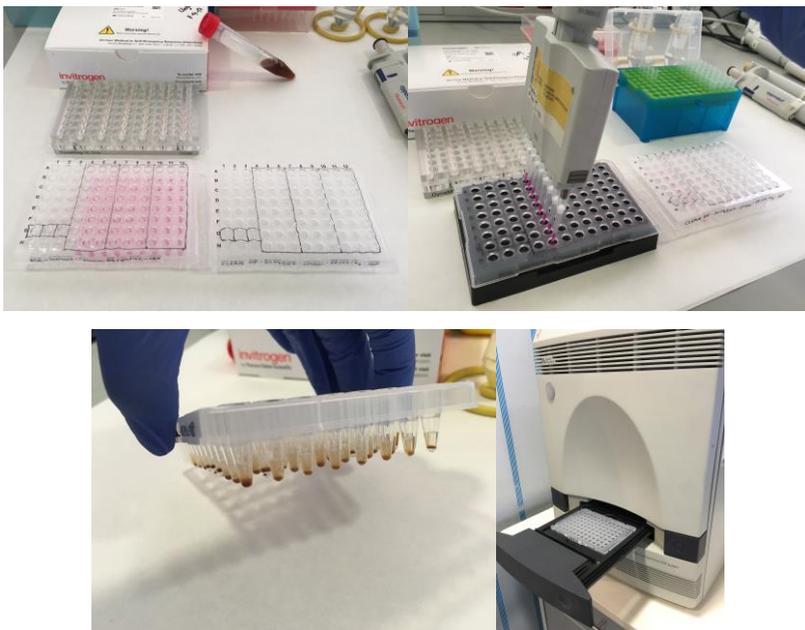


Figura 17 Preparación de librerías con *clean-up*.

En este sentido, la realización de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) es crucial para determinar la concentración, la cual es necesaria conocer para secuenciar. Además, previamente a la secuenciación, se realizó una normalización de la librería generada.

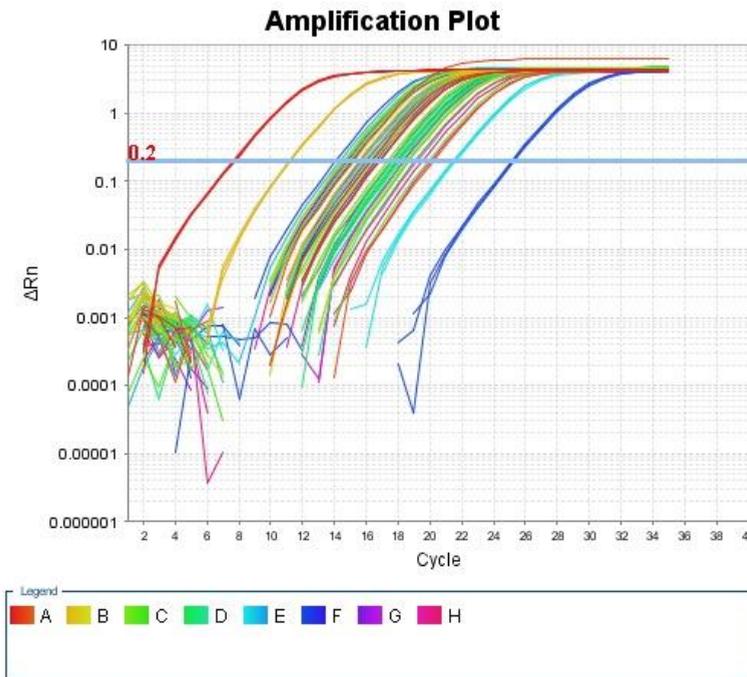


Figura 18 PCR cuantitativa.

3.5.4 Secuenciación y ensamblaje de datos.

El HTG Edge Seq es compatible con numerosos instrumentos de NGS, incluyendo Illumina MiSeq e Ion Torrent. En nuestro caso, se realizó una secuenciación por

Illumina MiSeq del pool de sondas presentes en la librería y que representan a los transcritos expresados por el tejido tumoral mamario.

Una vez finalizada la secuenciación, los archivos FASTQ se cargaron en el *software* analizador de datos de HTG EdgeSeq que se incluye con el sistema, el HTG Parser Software. De esta forma, para el análisis de los datos, a partir de los archivos FASTQ y a la hoja de registro de muestras generada por el sistema HTG donde aparecen listadas las secuencias correspondientes a cada gen analizado, el sistema es capaz de generar perfiles cuantitativos de expresión.

Los archivos FASTQ son alineados con las secuencias de las sondas gracias a que el *software* de análisis de HTG EdgeSeq incorpora Bowtie2, una herramienta de alineación de secuencias. De esta forma, se realiza un conteo digital de los transcritos expresados y el resultado final es una tabla donde, para cada paciente, aparece listado el número de transcritos expresados para cada uno de los genes analizados. El HTG Parser *software* es una forma rápida y sencilla de identificar las secuencias de sondas individuales que están dentro de los archivos FASTQ.

3.5.5 Análisis estadístico y algoritmo de agrupamiento.

Una vez obtenidos los valores de expresión de cada uno de los genes analizados, se realizó un análisis estadístico para determinar aquellos genes que se expresan diferencialmente de forma significativa entre los sets de pacientes analizados.

De este modo, se aplicó el test estadístico Deseq2, un test diseñado para su uso en aproximaciones de RNA-seq y con el que es posible determinar diferencias significativas en la expresión génica en base a un modelo que utiliza una distribución negativa binomial. El Deseq2 constituye un método para el análisis diferencial de los transcritos expresados que utiliza una precisa estimación de la dispersión y los *fold changes* para aumentar la estabilidad y la interpretabilidad de la gran cantidad de datos procedentes de esta clase de estudios. En este caso, el test se aplicó para investigar las diferencias en la expresión de los pacientes en base a alto infiltrado linfocitario o bajo infiltrado linfocitario de las muestras de cáncer de mama triple negativas tratadas con quimioterapia neoadyuvante.

Adicionalmente, se aplicó un algoritmo de agrupamiento jerárquico estándar a los datos de expresión de las muestras analizadas con el objetivo de buscar patrones de expresión génica compartidos que permitan subclasificar a los pacientes y puedan correlacionarse con factores pronósticos.

RESULTADOS DEL ESTUDIO

4 Resultados del estudio.

Ante la heterogeneidad en los trabajos publicados sobre la determinación del infiltrado linfocitario tumoral, el objetivo principal de este trabajo ha sido la determinación según las recomendaciones del Grupo de Trabajo Internacional en Infiltrado linfocitario tumoral (97) para confirmar el valor predictivo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas y taxanos. Como objetivo secundario, se ha determinado el valor pronóstico en relación al infiltrado de células inmunes existentes en el microambiente tumoral tanto en la biopsia diagnóstica como en la pieza quirúrgica.

4.1 *Estudio descriptivo de la serie de pacientes.*

En este trabajo se han revisado 756 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama estadios II-III tratadas mediante quimioterapia con intención neoadyuvante seguido de cirugía del tumor primario entre 1998 y 2015. De éstas pacientes, 181 pacientes fueron diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo (23.9%).

De las 181 pacientes estudiadas, 164 pacientes (90.6%) presentaron muestra histológica suficiente tumoral pre y post-tratamiento quimioterápico neoadyuvante. Las características clínicas y anatomopatológicas al diagnóstico se recogen en la Tabla 5.

La mediana de edad de las pacientes fue de 49 años (rango 29-81 años) y el 57% de las pacientes eran premenopáusicas al diagnóstico.

El 63% de las pacientes presentaban un cáncer de mama operable al diagnóstico, no susceptible de cirugía conservadora. El 31 % de las paciente presentaban un estadio IIA, 32% IIB, 15% IIIA, 10% IIIB y un 12% estadio IIIC al diagnóstico. El tumor era mayor de 5 cm en el 37% de las pacientes. El 61% de las pacientes presentaban metástasis ganglionares confirmadas histológicamente al diagnóstico.

En el 67% de los casos el tipo histológico se diagnosticaron de un carcinoma ductal infiltrante, el 42% de los tumores eran grado III y el 9% de las pacientes presentaban tumores con afectación linfovascular al diagnóstico.

El esquema de quimioterapia administrado se resume en la Tabla 5. El 59% de las pacientes recibieron quimioterapia neoadyuvante con el esquema AC (Adriamicina 60mg/m² –Ciclofosfamida 600mg/m²) cada 21 días x 4 ciclos seguido de Paclitaxel 80mg/m² régimen semanal x 12ciclos. Se utilizó Docetaxel trisemanal en lugar de Paclitaxel semanal tras la administración de las antraciclinas en el 20% de las pacientes. En el 3% de las pacientes se administraron esquemas sin antraciclinas y el 5% de las pacientes recibieron esquemas sin taxanos. El 21% de las pacientes recibieron otros esquemas, y de éstas el 7.3% de las pacientes asociaron al tratamiento con antraciclinas y taxanos, platinos.

El tipo de cirugía realizada tras la quimioterapia neoadyuvante, se recoge en la Tabla 5. La tasa de cirugía conservadora fue 50%, si bien se realizó ampliación de márgenes en el 5,4% de las pacientes, consiguiendo un 99% de márgenes negativos tras la ampliación.

Tras la quimioterapia con intención neoadyuvante, se alcanzó un 37.2% de respuestas completas patológicas (ypT0/ypTis ypN0). La enfermedad residual según los estadios patológicos tras la quimioterapia neoadyuvante fue: 24.1% estadio IA;

15.2% estadio IIA; 7.3% estadio IIB; 12.1% estadio IIIA; 0.6% estadio IIIB y 3.5% estadio IIIC.

En cuanto al tratamiento con intención adyuvante, el 88.4% de las pacientes recibieron radioterapia adyuvante tras la cirugía de mama.

Características	N (%)
Premenopáusicas	93 (57)
Estadio TNM clínico	
IIA	51 (31)
IIB	52 (32)
IIIA	24 (15)
IIIB	16 (10)
IIIC	21 (12)
Histología	
Ductal	110 (67)
Lobulillar	54 (33)
Grado 3	110 (67)
Invasión linfovascular	14 (9)
Confirmación histológica afectación ganglionar	100 (61)
Quimioterapia neoadyuvante	
AC+Paclitaxel semanal	96 (59)
AC+Docetaxel trisemanal	32 (20)
Otros esquemas (platinos)	24/12 (21/7.3)
No taxanos	8 (5)
No antraciclinas	4 (3)
Cirugía conservadora	82 (50)
Re-resección	9 (5.4)

Márgenes negativos	164 (99)
RCP (ypT0/is ypN0)	61 (37.2)
Tumor residual	
IA	39 (24.1)
IIA	25 (15.2)
IIB	12 (7.3)
IIIA	19 (12.1)
IIIB	1 (0.6)
IIIC	5 (3.5)
Radioterapia adyuvante	145 (88.4)

Tabla 5 Características clínicas, anatomopatológicas y terapéuticas de las pacientes.

4.2 Estudio descriptivo de la infiltración linfocitaria tumoral en la biopsia diagnóstica y en la pieza quirúrgica.

La distribución del infiltrado linfocitario tumoral basal, previamente a recibir tratamiento neoadyuvante, se valoró en la biopsia diagnóstica según las recomendaciones del Grupo de Trabajo Internacional en Infiltrado linfocitario tumoral por el Patólogo experto en cáncer de mama (F.G.). Se denominó como “cTIL” para diferenciarlo del infiltrado linfocitario valorado en la pieza quirúrgica tras la quimioterapia neoadyuvante “ypTIL”.

La distribución del infiltrado linfocitario tumoral valorado en la biopsia diagnóstica antes del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante de las 164 pacientes se presenta en la Figura 19. La mediana de infiltrado linfocitario tumoral fue de 10% con un rango de 1-90% (asimetría de 0.762 y una curtosis de -1.074).

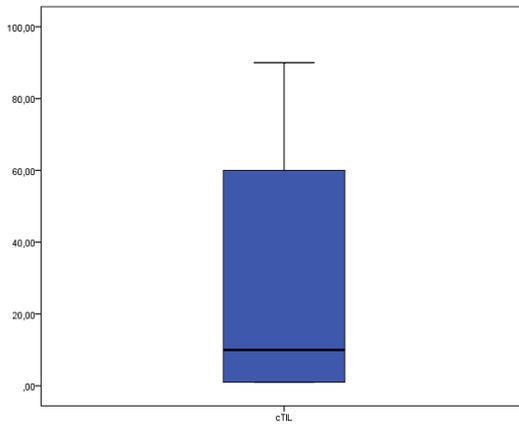
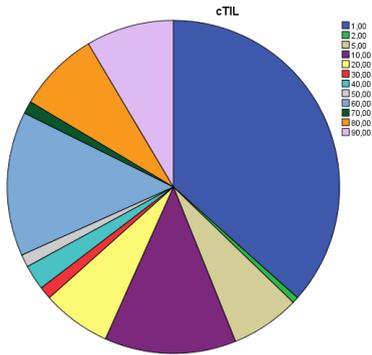


Figura 19 Boxplot de la distribución del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

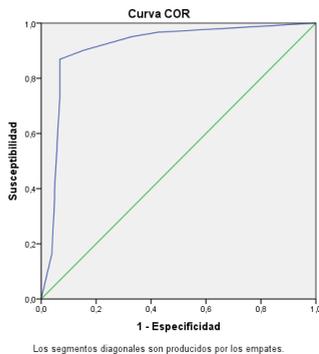
El 67.1% de las muestras obtenidas en la biopsia diagnóstica presentaron un infiltrado linfocitario tumoral entre 1 y 30%. Como se objetiva en la Tabla 6, el 36.6% de las muestras presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 1%, el 0.6% de las muestras de 2%, el 6.7% de 5%, el 12.8% de 10%, el 6.7% de 20% y 1.2% de 30% de infiltrado linfocitario tumoral. El 32.9% de las muestras restantes, presentaron un infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica entre 40 y 90%. El 2.4% presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 40%, 1.2% presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 50%, 14 % presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 60%, 1.2% presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 70%, 7.9% presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 80% y 8.5% presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 90%.



		cTIL			
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1,00	60	36,6	36,6	36,6
	2,00	1	,6	,6	37,2
	5,00	11	6,7	6,7	43,9
	10,00	21	12,8	12,8	56,7
	20,00	11	6,7	6,7	63,4
	30,00	2	1,2	1,2	64,6
	40,00	4	2,4	2,4	67,1
	50,00	2	1,2	1,2	68,3
	60,00	23	14,0	14,0	82,3
	70,00	2	1,2	1,2	83,5
	80,00	13	7,9	7,9	91,5
	90,00	14	8,5	8,5	100,0
Total		164	100,0	100,0	

Tabla 6 Tabla de distribución del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

Con la distribución del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica previamente reflejada en la Figura 19, se realizó una curva ROC para valorar el punto de corte más sensible y específico para clasificar a las pacientes en dos grupos según la probabilidad de respuesta completa patológica (sensibilidad 0.967, especificidad 0.467, $p=0.001$). El punto de corte para diferenciar los dos subgrupos fue de 40%.



Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,912	,026	,000	,862	,963

Figura 20 Curva ROC que determina el punto de corte del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

La distribución del infiltrado linfocitario tumoral tras el tratamiento con quimioterapia neoadyuvante, valorado en la pieza quirúrgica de las 103 pacientes que no consiguieron una respuesta completa patológica, se presenta en la Figura 21. La mediana de infiltrado linfocitario tumoral fue de 5% con un rango de 1-80% (asimetría de 3.308 y una curtosis de 11.920).

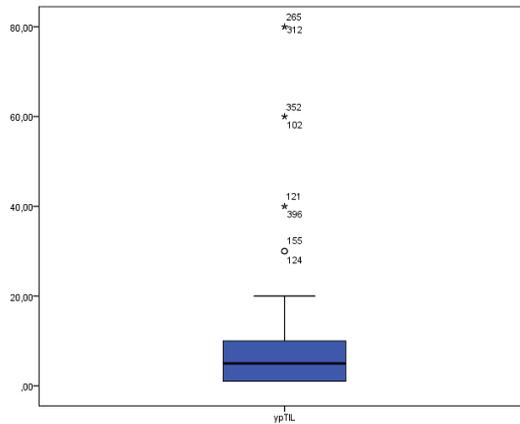
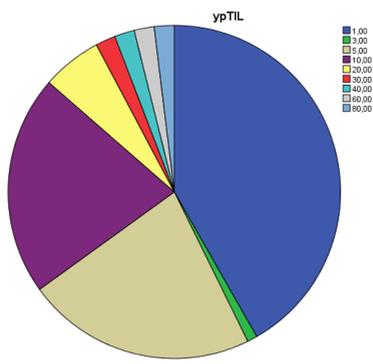


Figura 21 Boxplot de la distribución del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica.

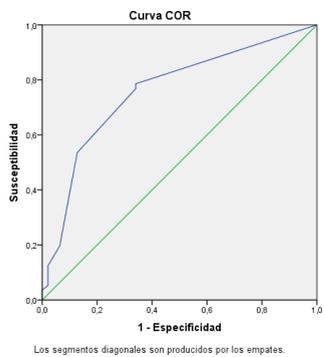
El 86.7% de las muestras presentaron un infiltrado linfocitario tumoral entre 1-10% como se observa en la Tabla 7. El 41.9% presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 1%, el 1% presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 3%, el 22.3% de muestras de 5% y el 21.4% presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 10%. Tan sólo 3.8% de las muestras presentaron un infiltrado linfocitario tumoral entre 40 y 80%. El 1.9% presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 40%, 1.9 % presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 60% y 1.9% presentaron un infiltrado linfocitario tumoral de 80%.



	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 1,00	43	41,7	41,7	41,7
3,00	1	1,0	1,0	42,7
5,00	23	22,3	22,3	65,0
10,00	22	21,4	21,4	86,4
20,00	6	5,8	5,8	92,2
30,00	2	1,9	1,9	94,2
40,00	2	1,9	1,9	96,1
60,00	2	1,9	1,9	98,1
80,00	2	1,9	1,9	100,0
Total	103	100,0	100,0	

Tabla 7 Tabla de distribución del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica.

Se ha realizado una curva ROC para conocer el punto de corte óptimo para la clasificación de las pacientes en dos grupos según el riesgo de recaída. Como el 86.7% de las muestras presentaron un infiltrado linfocitario tumoral entre 1-10% en la pieza quirúrgica, el punto de corte fue el 1% (especificidad de 0.340, sensibilidad de 0.786, $p=0.001$)



Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: ypTIL

Área	Error tip. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,759	,048	,000	,664	,854

Figura 22 Curva ROC para el punto de corte del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica.

Al disponer de los niveles del infiltrado linfocitario tumoral antes y después de la quimioterapia neoadyuvante de forma pareada, en aquellas pacientes que no conseguían respuesta completa patológica, se valoraron los cambios que se presentaron. Se comparó el nivel del infiltrado linfocitario tumoral basal en la biopsia diagnóstica con el nivel de la pieza quirúrgica, y así poder valorar el efecto de la quimioterapia. En nuestra serie, se objetiva un descenso del porcentaje de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica en el 25.2% de las muestras, un aumento en 26.2% de las muestras y no se objetiva ningún cambio en el 48.6% restante, como se objetiva en la Figura 23.

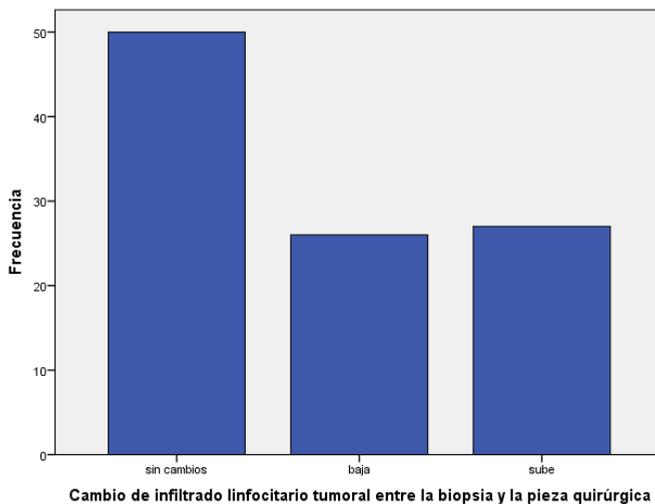


Figura 23 Cambio del infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia diagnóstica y pieza quirúrgica.

Se valoró la correlación que existe entre el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica y en la pieza quirúrgica. Se objetiva que la media de infiltrado linfocitario tumoral entre las muestras en las que disponemos de la determinación

en la biopsia y en la pieza quirúrgica del infiltrado linfocitario tumoral presenta una correlación de Pearson de 0.676 ($p=0.001$).

Correlaciones

		cTIL	ypTIL
cTIL	Correlación de Pearson	1	,676**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	164	103
ypTIL	Correlación de Pearson	,676**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	103	103

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 8 Correlación de Pearson entre el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica (cTIL) y en la pieza quirúrgica (ypTIL).

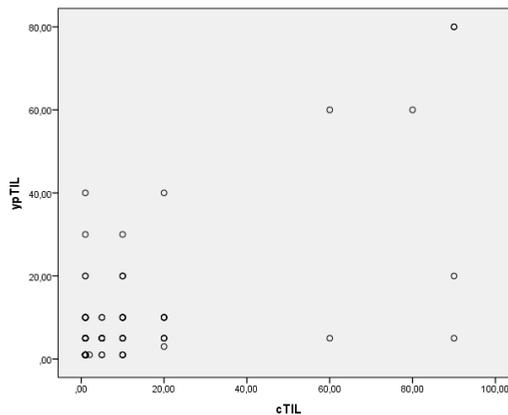


Figura 24 Diagrama de dispersión para la correlación entre el infiltrado linfocitario tumoral en biopsia diagnóstica (cTIL) y en pieza quirúrgica (ypTIL).

4.3 **Estudio descriptivo de los dos grupos según el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.**

Con la distribución del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica previamente reflejada en la Figura 19, se realizó una curva ROC. El punto de corte que clasificaba a las pacientes en dos grupos con alto versus bajo infiltrado linfocitario fue de 40 %.

Las 164 pacientes con cáncer de mama triple negativo estadios II-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas y taxanos, se clasificaron en dos grupos. En nuestra serie, 58 pacientes (35.4%) presentaron niveles altos de infiltrado linfocitario tumoral mientras que las 106 pacientes (64.6%) restante presentaba niveles bajos de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica. De forma gráfica se representa en el *Flow chart* de la Figura 25.

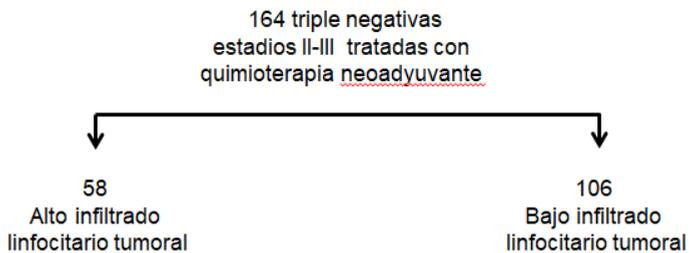


Figura 25 Flow chart de distribución de las pacientes en dos grupos en función del infiltrado linfocitario tumoral presente en la biopsia diagnóstica.

En cuanto a las características clínicas y a las variables anatomopatológicas de los dos grupos de pacientes estaban bien balanceados. La mediana de edad de las

pacientes era similar, el 55% en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral y el 56% en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral presentaban < 40 años ($p=0.345$).

La distribución según el estadio clínico al diagnóstico se presenta en la Figura 26, y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. En el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica 22 pacientes (38%) presentaban un estadio IIA, 22 pacientes (38%) estadio IIB, 7 pacientes (12%) estadio IIIA, 3 pacientes (3%) estadio IIIB y 4 pacientes (7%) estadio IIIC. Mientras que en el grupo de grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral, 29 pacientes (28%) presentaban estadio IIA, 32 pacientes (30%) estadio IIB, 18 pacientes (17%) estadio IIIA, 10 pacientes (9%) estadio IIIB y 17 pacientes (16%) estadio IIIC. ($p= 0.205$).

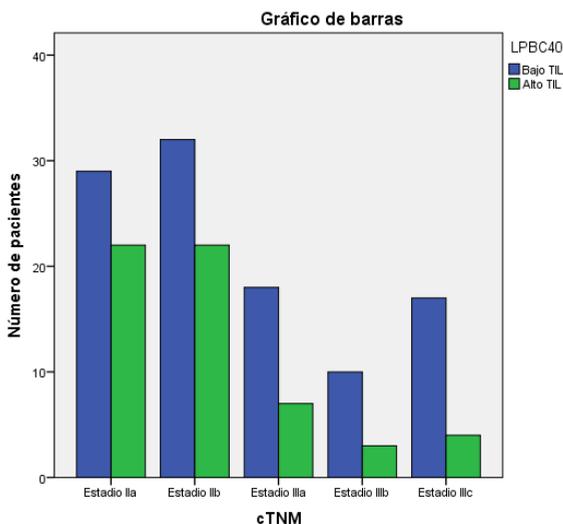


Figura 26 Distribución del estadio clínico al diagnóstico (recuento del número de pacientes). El grupo de alto infiltrado linfocitario (en verde) versus el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral (en azul).

Según las características anatomopatológicas, en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral el 57% de las pacientes se diagnosticaron de carcinomas ductales infiltrantes y el 43% restante fueron carcinomas lobulillares infiltrantes. Mientras que en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral el 60% se diagnosticaron carcinomas ductales infiltrantes y el 40% restante carcinomas lobulillares infiltrantes ($p= 0.060$).

Se valoró la presencia de carcinoma ductal in situ asociado al componente infiltrante; el 10% en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral y en el 6% en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral ($p= 0.486$).

Tampoco hubo diferencias en la infiltración linfovascular presente en la biopsia en el 10% en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral y en el 11% en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral ($p=0.106$).

El ki67 también fue valorado sin objetivar ninguna diferencia, presentando un $ki67>50\%$ en el 86% en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral y en el 85% en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral ($p= 0.270$).

Sin embargo, se objetivó en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral una mayor proporción de carcinomas grado 3 en el 64% versus 34% en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral ($p= 0.005$).

Entre ambos subgrupos de pacientes no hubo diferencias en el tipo de esquema recibido con intención neoadyuvante. La mayoría de las pacientes recibieron un esquema con antraciclinas y taxanos, el 81% en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral y en el 92% en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral

($p= 0.570$). En cuanto a la adición de platino al esquema neoadyuvante, el 6.9% de las pacientes con alto infiltrado linfocitario tumoral y el 7.5% de bajo infiltrado tumoral recibieron además de antraciclinas y taxanos, platino ($p= 0.574$).

Tras la quimioterapia neoadyuvante se realizaba la cirugía del tumor primario y se objetivó en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral, una mayor tasa de cirugías conservadoras 67% versus 40% en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral ($p=0.001$).

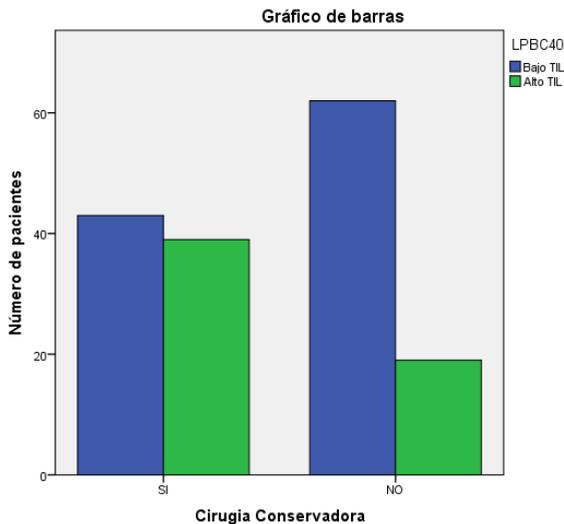


Figura 27 Recuento de pacientes tratadas mediante cirugía conservadora entre el grupo de alto infiltrado linfocitario (en verde) versus el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral (en azul).

En cuanto al tratamiento con radioterapia adyuvante tras la cirugía del tumor primario, el 88% de las pacientes en ambos grupos la recibieron ($p=0.754$).

En la Tabla 9 se resumen las principales características clínico-patológicas y terapéuticas de ambos grupos de pacientes comentadas previamente.

Variable	Niveles de infiltrado linfocitario tumoral		X ²
	Alto	Bajo	
Edad<40 años	32 (55%)	60 (56%)	0.345
Estadio clínico TNM			
Ila	22 (38%)	29 (28%)	0.205
Ilb	22 (38%)	32 (30%)	
IIla	7 (12%)	18 (17%)	
IIlb	3 (5%)	10 (9%)	
IIlc	4 (7%)	17 (16%)	
Histología			
Ductal Infiltrante	33 (57%)	64 (60%)	0.060
Lobulillar Infiltrante	25 (43%)	42 (40%)	
Grado 3	37 (64%)	32 (30%)	0.005
Componente ductal in situ	6 (10%)	7(6%)	0.486
Invasión linfovascular	6 (10%)	12 (11%)	0.106
Ki67>50	50 (86%)	90 (85%)	0.270
Quimioterapia neoadyuvante			
Antraciclinas+taxanos	47 (81%)	98 (92%)	0.570
Antraciclinas+taxanos+platino	4 (6.9%)	8 (7.5%)	0.574
RCP (ypT0/is, ypN0)	51(87.9%)	10 (9.4%)	0.001
Tumor Residual			
Multifocal	4 (7%)	24 (22%)	0.001
Cirugía Conservadora	39 (67%)	43 (41%)	0.001
Radioterapia Adyuvante	51 (88%)	93 (88%)	0.754

Tabla 9 Características clínicas, histopatológicas y terapéuticas en función del nivel de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

4.4 Estudio del valor predictivo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.

En la serie de 164 pacientes con cáncer de mama triple negativo tratadas con antraciclinas y taxanos con intención neoadyuvante, 61 pacientes (37.2%) alcanzaron una respuesta completa patológica considerada como ypT0/is ypN0, mientras que 103 pacientes (62.8%) presentaron enfermedad residual en la pieza quirúrgica. De las 61 pacientes que consiguieron una respuesta completa patológica, 51 pacientes presentaban un alto infiltrado linfocitario tumoral y las 10 pacientes restantes un bajo infiltrado linfocitario tumoral, como se objetiva en la Figura 28($p= 0.001$).

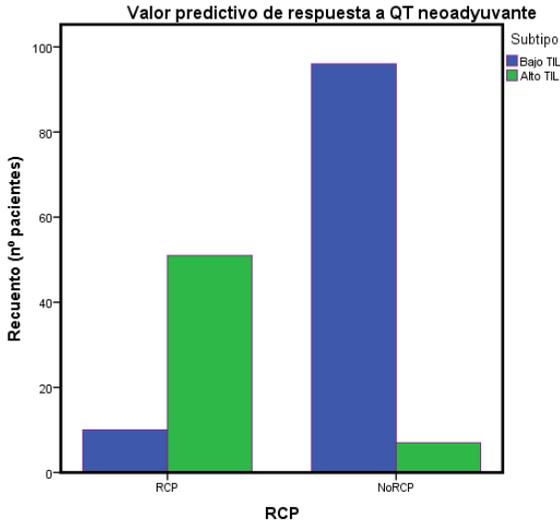


Figura 28 Recuento de pacientes que alcanza una respuesta completa patológica en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral (en verde) versus bajo infiltrado linfocitario tumoral (en azul).

Como se refleja en la Tabla 10 en el grupo de pacientes de alto infiltrado linfocitario tumoral el 87.9% y en el grupo de pacientes de bajo infiltrado linfocitario tumoral el 9.4% de las pacientes consiguieron una respuesta completa, respectivamente ($p=0.001$).

Tabla de contingencia

			LPBC40		Total
			Bajo TIL	Alto TIL	
RCP	RCP	Recuento	10	51	61
		% dentro de RCP	16,4%	83,6%	100,0%
		% dentro de LPBC40	9,4%	87,9%	37,2%
		% del total	6,1%	31,1%	37,2%
NoRCP	NoRCP	Recuento	96	7	103
		% dentro de RCP	93,2%	6,8%	100,0%
		% dentro de LPBC40	90,6%	12,1%	62,8%
		% del total	58,5%	4,3%	62,8%
Total	Total	Recuento	106	58	164
		% dentro de RCP	64,6%	35,4%	100,0%
		% dentro de LPBC40	100,0%	100,0%	100,0%
		% del total	64,6%	35,4%	100,0%

Tabla 10 Tabla de contingencia entre la respuesta patológica alcanzada y los grupos según infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

Estos resultados sugieren que tras la determinación del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica siguiendo la metodología estandarizada del Grupo de Trabajo Internacional, la presencia de un infiltrado linfocitario en la biopsia diagnóstica >40% se asocia a una mayor probabilidad de conseguir una respuesta completa patológica.

Como se objetiva en la Figura 29, la relación entre el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia y la respuesta patológica alcanzada; la mediana de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica en las pacientes que alcanzaron una respuesta completa patológica fue de 60 % mientras que las que presentaron

enfermedad residual la mediana de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia fue de 1% ($p= 0.001$).

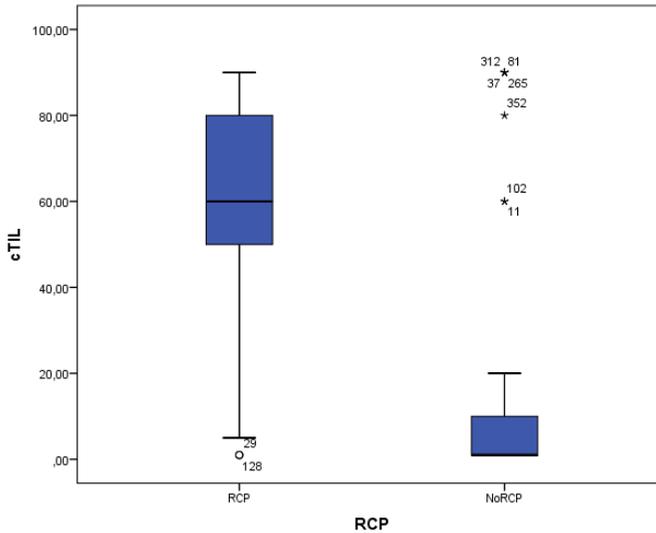


Figura 29 Boxplot que relaciona el alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica con la respuesta completa patológica versus el nivel bajo de infiltrado linfocitario tumoral con la enfermedad residual.

Si dividimos la respuesta patológica alcanzada, en el tumor primario de la mama y en la axila se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. La respuesta tras la quimioterapia neoadyuvante a nivel del tumor primario ($ypT0/is$) fue del 86% en el grupo de pacientes de alto infiltrado linfocitario tumoral y del 12.2% en el grupo de pacientes de bajo infiltrado linfocitario tumoral ($p= 0.002$). Y la respuesta tras la quimioterapia a nivel del axilar ($ypN0$) fue del 93% en

el grupo de pacientes de alto infiltrado linfocitario tumoral y del 45% en el grupo de pacientes de bajo infiltrado linfocitario tumoral ($p= 0.001$).

Por lo que, la distribución de las 164 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo estadios II-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas y taxanos, incluidas en el estudio se refleja en la Figura 30. Según el grupo al que pertenecen en función del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica, 58 pacientes pertenecen al grupo de alto infiltrado linfocitario y las 106 pacientes restantes al de bajo infiltrado linfocitario tumoral. Por otro lado, según la respuesta patológica que consiguen tras la quimioterapia neoadyuvante, 51 de las 58 pacientes del alto infiltrado linfocitario tumoral y 10 de las 106 de bajo infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica alcanzan una respuesta completa patológica.

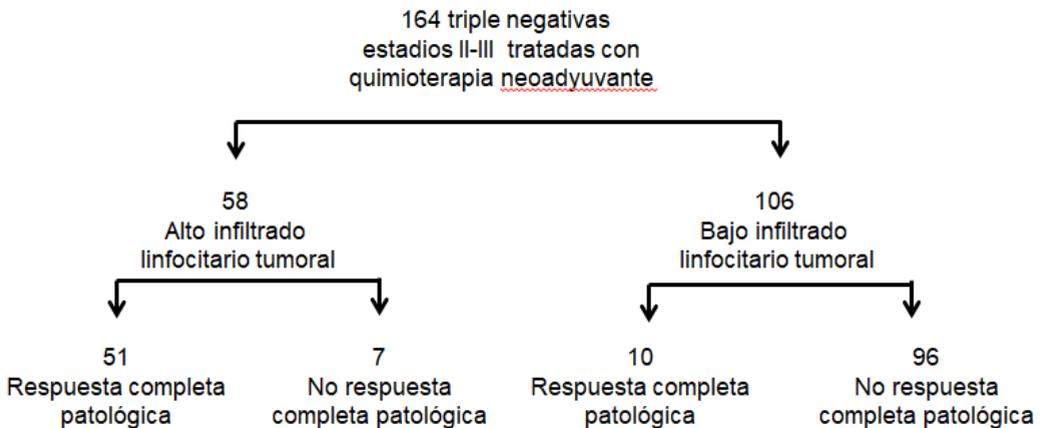


Figura 30 Flow chart de la distribución de las pacientes según el nivel de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica y la respuesta patológica alcanzada.

En cuanto a la enfermedad residual tras la quimioterapia neoadyuvante presente en la pieza quirúrgica; en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral 4 pacientes presentaban un estadio I, 1 paciente estadio IIA, 1 paciente estadio IIIA y 1 paciente estadio IIIB. Y en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral 33 pacientes estadio I, 24 pacientes estadio IIA, 12 pacientes estadio IIB, 20 pacientes estadio IIIA y 7 pacientes estadio IIIC ($p= 0.001$).

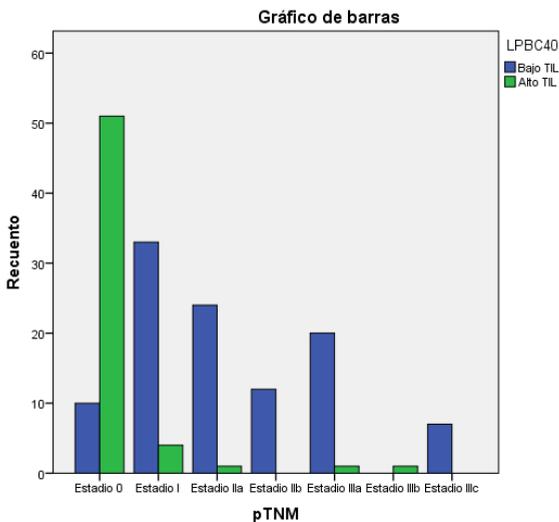


Figura 31 Recuento de pacientes según la enfermedad residual tras la cirugía por estadios. El grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral (en verde) versus bajo infiltrado linfocitario tumoral (en azul).

Si dividimos la enfermedad residual entre la mama y la axila también se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. La enfermedad residual en la mama presentaba un distribución multifocal en el 7% de las pacientes en el grupo de alto infiltrado linfocitario versus el 22% en el grupo de bajo infiltrado

linfocitario tumoral ($p= 0.001$). En cuanto a la enfermedad residual en la mama presente en la pieza quirúrgica entre los dos grupos; en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral; 2 pacientes presentaban ypT1mic, 2 pacientes ypT1a, 1 paciente ypT1b, 2 pacientes ypT1c y 1 paciente ypT2. Mientras que en el grupo de bajo infiltrado linfocitario en la biopsia diagnóstica presentaron la siguiente distribución; 14 pacientes ypT1mic, 14 pacientes ypT1a, 9 pacientes ypT1b, 20 pacientes ypT1c, 31 pacientes ypT2, 4 pacientes ypT3 y 1 paciente ypT4a ($p= 0.002$).

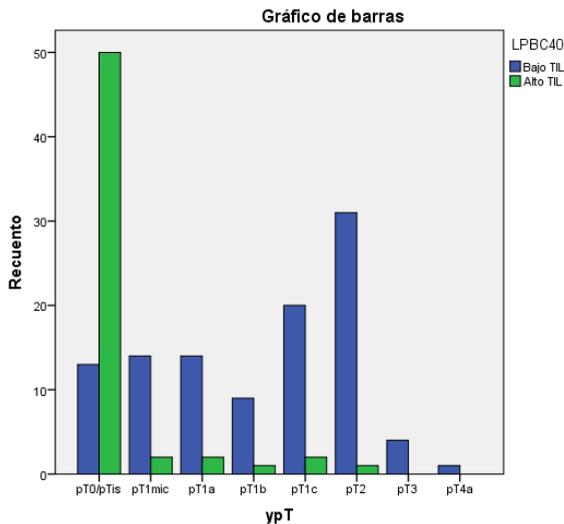


Figura 32 Recuento de pacientes según la enfermedad residual en la mama. El grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral (en verde) versus bajo infiltrado linfocitario tumoral (en azul).

En cuanto a la enfermedad residual en la axila tras la quimioterapia neoadyuvante presente en la pieza quirúrgica entre los dos grupos; en el grupo de alto infiltrado

linfocitario tumoral 1 paciente ypN1, 1 paciente ypN2 y 1 paciente ypN3. Mientras que en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral 2 pacientes ypN1mic, 23 pacientes ypN1, 19 pacientes ypN2, 7 pacientes ypN3 ($p= 0.002$).

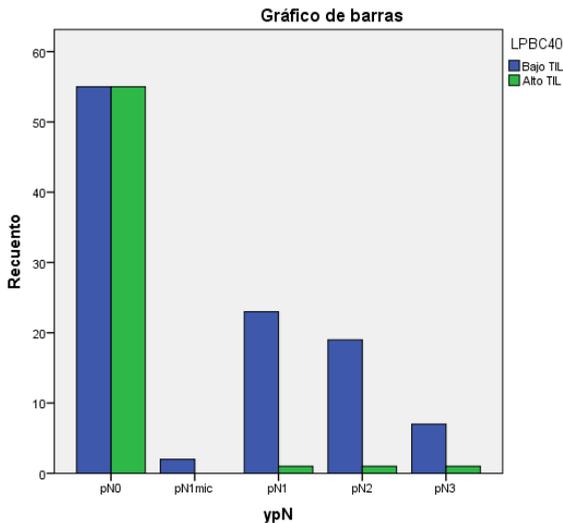


Figura 33 Recuento de pacientes según la enfermedad residual en la axila. El grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral (en verde) versus bajo infiltrado linfocitario tumoral (en azul).

También se valoraron las diferencias entre las pacientes que recibieron o no platino asociado al esquema de antraciclinas y taxanos con intención neoadyuvante.

En recuento numérico, de las 164 pacientes incluidas en la serie, 12 pacientes asociaron platinos al tratamiento con antraciclinas y taxanos, frente a las 152 pacientes que recibieron antraciclinas y taxanos.

En cuanto a las características clínicas y anatomopatológicas de los dos grupos según el tratamiento neoadyuvante con o sin platinos, no se objetivaron diferencias en la mediana de edad de las pacientes ($p= 0.324$), estadio clínico al diagnóstico ($p= 0.767$), tipo histológico ($p= 0.335$), carcinoma ductal in situ asociado ($p= 0.786$), invasión linfovascular presente ($p= 0.231$), grado histológico ($p= 0.361$) ni Ki67 ($p=0.357$). Tampoco hubo diferencias según los niveles de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica al que pertenecían las pacientes que recibieron platinos; el 7.8% de las pacientes ($n=8$) en el grupo de bajo infiltrado linfocitario y el 6.6% ($n=4$) en el grupo de alto infiltrado linfocitario recibieron platinos ($p=0.574$).

Se valoró si la adición de platinos al esquema con antraciclinas y taxanos se correlacionaba con un aumento de la tasa de respuestas completas patológicas.

Como se refleja en la Tabla 11, de las 61 pacientes que consiguieron una respuesta completa patológica tras la quimioterapia neoadyuvante, 4 recibieron platinos (6.6%) mientras que las 57 pacientes restantes recibieron antraciclinas y taxanos sin platino (93,4%).

Tabla de contingencia Carboplatino * RCP

			RCP		Total
			RCP	NoRCP	
Carboplatino	No Carboplatino	Recuento	57	95	152
		% dentro de Carboplatino	37,5%	62,5%	100,0%
		% dentro de RCP	93,4%	92,2%	92,7%
	Si Carboplatino	Recuento	4	8	12
		% dentro de Carboplatino	33,3%	66,7%	100,0%
		% dentro de RCP	6,6%	7,8%	7,3%
Total	Recuento	61	103	164	
	% dentro de Carboplatino	37,2%	62,8%	100,0%	
	% dentro de RCP	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabla 11 Relación entre la adición de platino al esquema neoadyuvante y la respuesta patológica alcanzada.

Si nos centramos en las 12 pacientes que recibieron platino, 4 alcanzaron una respuesta completa patológica y el 8 presentaron enfermedad residual en la pieza quirúrgica ($p=0.518$)

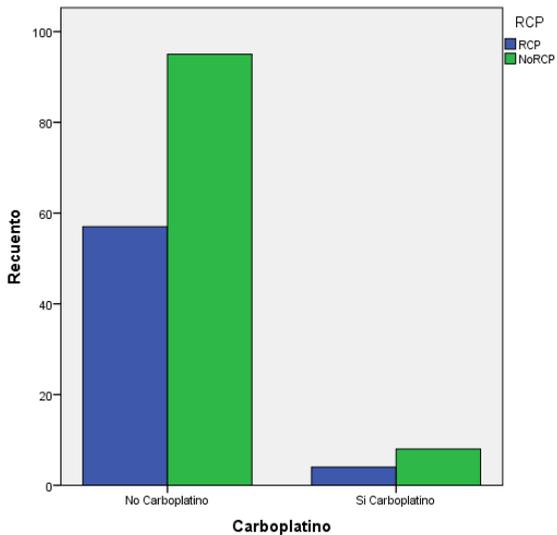


Figura 34 Relación entre el tratamiento con antraciclinas taxanos +/- platino y la respuesta patológica alcanzada.

Tampoco se encontraron diferencias en el infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica ($p=0.177$), en el foco residual ($p=0.563$) ni en la enfermedad residual ypT/ypN ($p=0.440$).

Seguramente si se hubiese incluido un mayor tamaño muestral habríamos obtenido evidencia a favor del tratamiento con platino, pero como es de esperar, es difícil obtener resultados estadísticamente significativos con muestras pequeñas ($n=12$).

4.5 Estudio del valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral.

Con una mediana de seguimiento de 78 meses (6.5 años), de las 164 que se han valorado en esta serie, han presentado una recaída tumoral 60 pacientes (36.6%); 53 pacientes (88.3%) la recaída tumoral fue a distancia mientras que en 7 pacientes (11.7%) fue a nivel locorregional. La localización de la recaída a distancia más frecuente fue la hepática 14 pacientes (26.5%), seguida de 13 pacientes con recaída pulmonar (24.6%), 11 pacientes con ganglionar (20.7%), 8 pacientes recaída ósea (15%) y 7 pacientes en otras localizaciones distintas a las comentadas (13.2%). Se realizó confirmación histológica mediante biopsia en 27 de las 60 pacientes (45%). La supervivencia libre de enfermedad en la serie de pacientes del estudio fue del 63.4% a los 6 años.

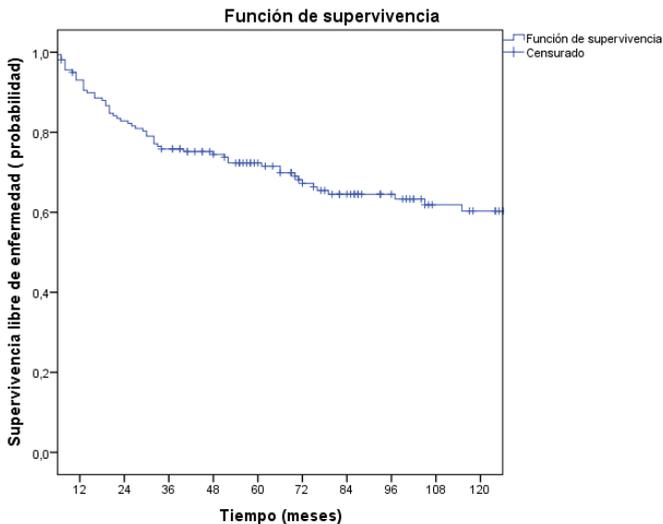


Figura 35 Curva Kaplan Meyer de supervivencia libre de enfermedad en la población total.

4.5.1 Valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

De las 60 recaídas tumorales, la distribución entre los grupos de alto y bajo infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica fue el siguiente; el 81.7% pertenecían al grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral y el 18.3% restante al grupo de alto nivel de infiltrado linfocitario tumoral.

De las 106 pacientes del grupo de bajo infiltrado linfocitario en la biopsia, 49 pacientes (46.2%) presentaron una recaída tumoral y en el grupo de alto infiltrado linfocitario en la biopsia diagnóstica de las 58 pacientes, 11 pacientes (19%) presentaron una recidiva ($p=0.001$).

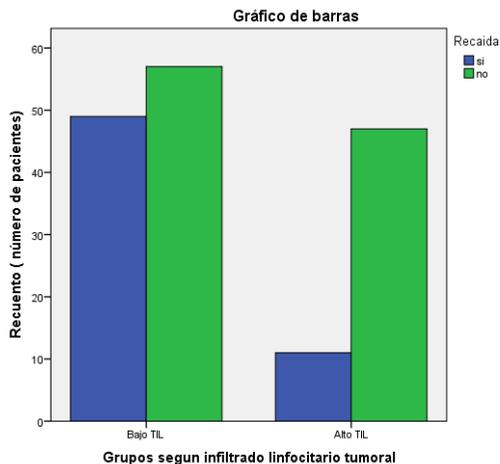


Figura 36 Recuento de pacientes que presentan una recaída tumoral en función del grupo según infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

En cuanto a la localización de la recaída tumoral; en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral, 45 pacientes presentaron la recaída a distancia y 4 pacientes a nivel locorregional, mientras que en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral 8 pacientes presentaron diseminación a distancia y 3 pacientes a nivel locorregional.

De forma gráfica se representa en la Figura 37 la distribución de las recaídas en las pacientes en función del grupo según el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica y la respuesta patológica alcanzada tras la quimioterapia neoadyuvante.

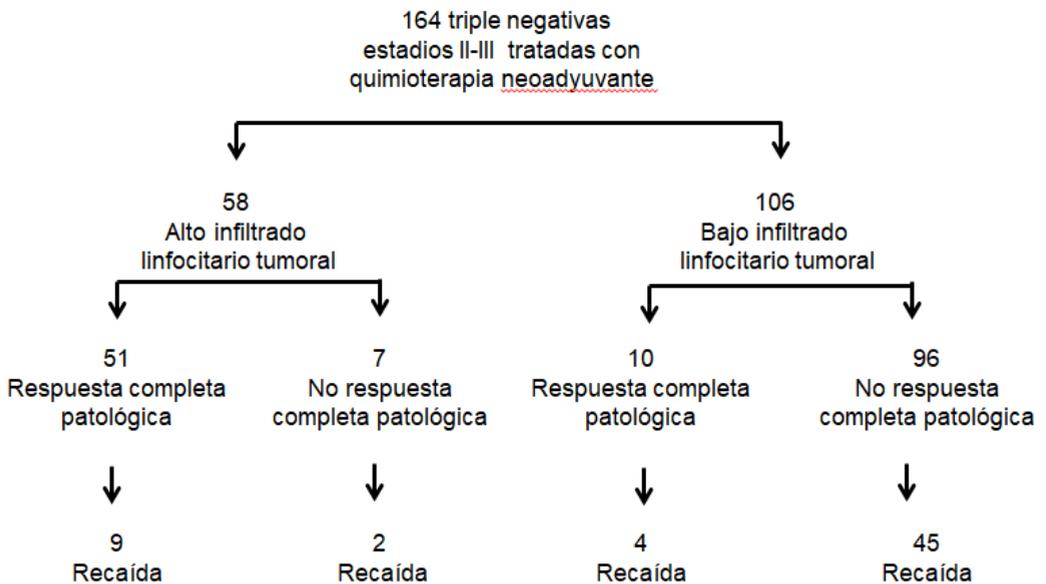


Figura 37 Flow chart de la distribución en función del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia, la respuesta patológica y la recaída tumoral.

A los 72 meses, el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia presenta una recaída tumoral en el 14.2% de las pacientes frente al 42.1% en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral ($p=0.010$).

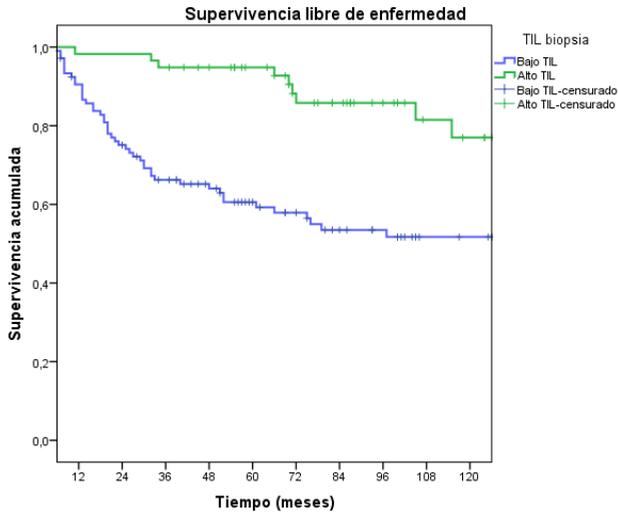


Figura 38 Curva Kaplan Meyer de supervivencia libre de enfermedad entre el grupo de alto (verde) y bajo (azul) infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica.

En el análisis univariante, las variables asociadas a un incremento del riesgo de recaída fueron las recogidas en la Tabla siguiente.

VARIABLE	HR (IC 95%)	P
Estadio clínico al diagnóstico TNM III vs II	HR 2.22 (IC 1.51-4.21)	0.002
cT ; Tumor mama >2cm vs < 2cm	HR 1.76 (IC 0.24-12.77)	0.567
cN; Afectación ganglionar vs no afectación	HR 2.50 (IC 1.39-4.49)	0.020
Grado histológico III vs I-II en la biopsia	HR 1.39 (IC 0.79-2.44)	0.243
TIL en biopsia bajo vs alto	HR 3.44 (IC 1.78-6.65)	0.001
Cambio TIL: Desciende/sin cambios vs aumenta	HR 4.01 (IC 1.69-9.59)	0.002
No RCP vs Si RCP	HR 2.89 (IC 1.56-5.36)	0.001
Enfermedad residual, ypTNM II.-III vs I	HR 4.28 (IC1.91-9.59)	0.001
ypT; Tumor mama >2cm vs <2cm	HR 3.01 (IC1.66-5.44)	0.002
ypN; Afectación ganglionar vs no afectación	HR 3.66 (IC 2.19-6.12)	0.001
TIL en pieza bajo vs alto	HR 4.27 (IC 2.29-7.98)	0.001

Tabla 12 Analisis univariante de las variables asociadas a un incremento del riesgo de recaída tumoral.

Las variables asociadas a un incremento del riesgo de recaída fueron: el estadio clínico al diagnóstico III frente al estadio II con una HR 2.22 (IC 95% 1.51-4.21), el tumor en la mama al diagnóstico >2cm frente a tumores <2cm con una HR 1.76 (IC 95% 0.24-12.77), la afectación ganglionar al diagnóstico frente a la ausencia de afectación ganglionar con una HR 2.50 (IC 95% 1.39-4.49), no conseguir una respuesta completa patológica frente a alcanzarla con una HR 2.89 (IC 95% 1.56-5.36), presentar un bajo frente a un alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia con una HR 3.44 (IC 95% 1.78-6.65), el descenso o no presentar cambios en el infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia y la pieza versus el aumento de infiltrado entre la biopsia y la pieza con una HR 4.01 (IC95% 1.69-9.59), presentar un estadio II-III residual frente a un estadio I con una HR 4.28 (IC95% 1.91-9.59), el tamaño del tumor residual en la mama ypT >2cm vs <2cm con una HR 3.01 (IC 95% 1.66-5.44), la afectación ganglionar en la pieza quirúrgica ypN+ vs la ausencia de afectación ganglionar con una HR 3.66 (IC 95% 2.19-6.12) y presentar bajo infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica frente al alto infiltrado con una HR 4.27 (IC 95% 2.29-7.98).

Para el análisis multivariante para la supervivencia libre de enfermedad se realizó una regresión de Cox, incluyendo las diferentes características clínicas y anatomopatológicas, que hubieran demostrado valor pronóstico en el análisis univariante.

VARIABLE	HR (IC 95%)	P
cN; Afectación ganglionar vs no afectación	HR 2.76 (IC 1.17-6.50)	0.019
Cambio TIL; Sin cambios/desciende vs asciende	HR 2.94 (IC 1.10-8.67)	0.040
ypT; tamaño tumor residual >2cm vs <2cm	HR 2.84 (IC 1.52-5.30)	0.001

Tabla 13 Análisis multivariante de las variables significativas que se relacionan con un aumento del riesgo de recaída tumoral.

En el análisis multivariante para la supervivencia libre de enfermedad conservaron su valor pronóstico independiente; la afectación ganglionar al diagnóstico (cN+) versus la no afectación con una HR 2.76 (IC 1.17-6.50), el tamaño residual en la pieza quirúrgica >2cm (ypT2) versus <2cm con una HR 2.84 (IC 1.52-5.30), y en descenso o la ausencia de cambio entre el infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia y la pieza quirúrgica frente al ascenso de infiltrado con una HR 2.94 (IC 1.10-8.67).

4.5.2 Valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica

Se ha valorado el infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica en las pacientes que no consiguieron una respuesta completa patológica. En las 103 pacientes que presentan enfermedad residual tras el tratamiento neoadyuvante, la distribución del infiltrado linfocitario tumoral se reflejaba en la Figura 21.

Se ha realizado una curva ROC para conocer el punto de corte óptimo para la clasificación de las pacientes en dos grupos según el riesgo de recaída tumoral. Como el 86.7% de las muestras presentaron un infiltrado linfocitario tumoral entre 1-10% en la pieza quirúrgica, el punto de corte fue el 1%. En el grupo de bajo infiltrado tumoral en la pieza quirúrgica había 42 pacientes frente a las 61 pacientes del grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica.

En cuando a las características clínicas y anatomopatológicas, entre los dos grupos según el infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica, no hubo diferencias en la mediana de edad de las pacientes ($p=0.094$), tipo histológico ($p=0.473$), componente de carcinoma ductal in situ asociado en la biopsia ($p=0.363$), invasión linfovascular presente en la biopsia ($p=0.131$), grado histológico ($p=0.675$) ni ki67 en la biopsia ($p=0.270$).

Se objetivaron diferencias en cuanto al estadio clínico al diagnóstico, ya que en el grupo de bajo infiltrado linfocitario en la pieza quirúrgica 14 de las 42 pacientes (33.3%) presentaban al diagnóstico un estadio II, frente a las 44 de las 61 pacientes (72.1%) en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica ($P=0.002$) como se refleja en la Figura 39.

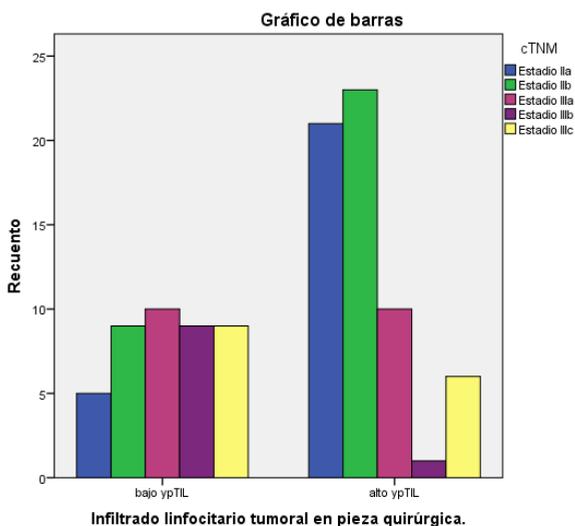


Figura 39 Distribución de las pacientes que no consiguen una respuesta completa patológica, en función del estadio clínico al diagnóstico y el infiltrado linfocitario tumoral en la pieza.

En cuanto al tratamiento recibido entre los dos grupos no se encontraron diferencias en esquema recibido en neoadyuvancia ($p=0.254$), ni en la radioterapia adyuvante ($p=0.252$). Sin embargo, si se encontraron diferencias en la tasa de cirugías conservadoras, que fue mayor en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica, 34 de las 61 pacientes (55.7%) frente a las 9 de las 42 pacientes (22%) en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica ($p=0.001$).

En la pieza quirúrgica tras la cirugía del tumor, tampoco se encontraron diferencias en el foco residual en la pieza quirúrgica ($p=0.649$), en el componente de carcinoma ductal in situ asociado en la pieza quirúrgica ($p=0.311$) pero si en la invasión

linfovascular presente en la pieza quirúrgica ($p=0.048$) como se objetiva en la Tabla 14.

Entre los dos grupos hubo diferencias en el estadio de la enfermedad residual tras la cirugía ya que en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica, el 14.3 % de las pacientes presentaban un estadio I, 35.7% presentaba un estadio II y 50% un estadio III. Mientras que en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza, el 50.8% presentaba un estadio I, el 36% un estadio II y el 13.2% presentaba un estadio III ($p=0.002$). El foco residual multifocal fue del 23.8% y del 21.3% en el grupo de bajo y alto infiltrado linfocitario tumoral, respectivamente ($p=0.649$)

Entre los dos grupos según el infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica, se presentaba una distribución diferente del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia. En las 42 pacientes (100%) del grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica también presentaba niveles bajos en la biopsia diagnóstica. Mientras que en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica 54 de las 61 pacientes (88.5%) presentaban un nivel bajo de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica y las 7 pacientes restantes (11.5%) presentaban un alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica. ($p=0.022$).

En cuando al cambio de infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia diagnóstica y la pieza quirúrgica se objetivaron diferencias. En el grupo de bajo infiltrado linfocitario en la pieza quirúrgica en 36 de las 42 pacientes (85.7%) no se presentan cambios de infiltrado y las 6 pacientes restante (14.3%) disminuía el infiltrado entre la biopsia y la pieza residual. Mientras que en el grupo de alto infiltrado linfocitario en la pieza quirúrgica, 14 pacientes (23%) no se presentan cambios de infiltrado, en

20 pacientes (32.8%) desciende y en las 44 pacientes restantes (44.3%) aumentaba el infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica ($p=0.001$).

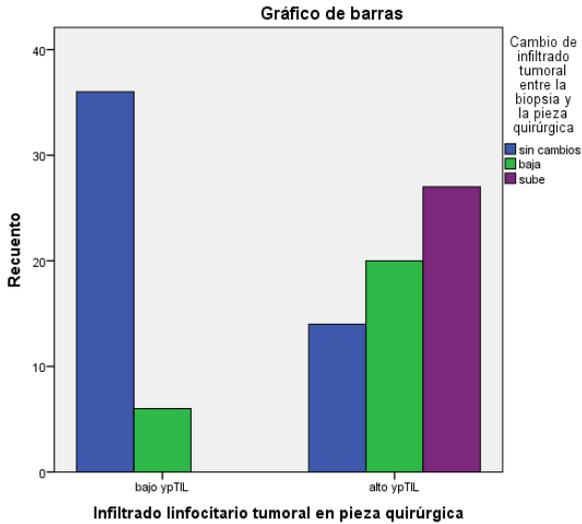


Figura 40 Distribución de las pacientes que no consiguen una respuesta completa patológica, en función del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza y los cambios entre la biopsia-pieza.

En la Tabla 14 se resumen las principales características clínicas, anatomopatológicas en la biopsia diagnóstica y en la pieza quirúrgica, así como los tratamientos recibidos con intención neoadyuvante y adyuvante en ambos grupos de pacientes según el infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica comentadas previamente.

Variable	Niveles de TIL en pieza		X ²
	Alto	Bajo	
Edad<40 años	30 (49%)	27 (64%)	0.094
Estadio clínico al diagnóstico cTNM			
IIa	21 (34.4%)	5 (11.9%)	0.002
IIb	23 (37.7%)	9 (21.4%)	
IIIa	10 (16.4%)	10 (23.8%)	
IIIb	1 (1.6%)	9 (21.4%)	
IIIc	6 (9.8%)	9 (21.4%)	
Histología			
Ductal Infiltrante	39 (63.9%)	25 (60%)	0.473
Lobulillar Infiltrante	22 (36.1%)	17 (40%)	
CDIS en biopsia	40 (65.6%)	31 (73.8%)	0.363
Grado 3	16 (26%)	11 (26%)	0.675
Invasión linfovascular en biopsia	45 (73.8%)	35 (83.3%)	0.131
Ki67<50%	8 (16%)	4 (10%)	0.270
Bajo TIL en biopsia	54 (88.5%)	42 (100%)	0.022
Quimioterapia neoadyuvante			
Antraciclina+taxanos	55 (90%)	40 (95%)	0.254
Estadio patológico ypTNM			
I	31 (50.8%)	6(14.3%)	0.002
IIa	16 (26.2%)	9 (21.4%)	
IIb	6 (9.8%)	6 (14.3%)	
IIIa	6 (9.8%)	15 (35.7%)	
IIIb	1 (1.6%)	0 (0%)	
IIIc	1 (1.6%)	6 (14.3%)	
Tumor Residual			
Multifocal	13 (21.3%)	10 (23,8%)	0.649
CDIS en pieza	9 (14.8%)	9 (21.8%)	0.311
Invasión linfovascular en pieza	12 (19.7%)	16 (38,1%)	0.048
Cirugía Conservadora	34 (55.7%)	9 (22%)	0.001
Radioterapia Adyuvante	52 (85.2%)	40 (95.2%)	0.252

Tabla 14 Características clínicas, histopatológicas y terapéuticas de las pacientes que no consiguen una respuesta completa patológica en función de los niveles de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza.

A los 6 años, el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza presenta una recaída tumoral del 23% mientras que el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral en la pieza fue del 66.2% (p=0.001).

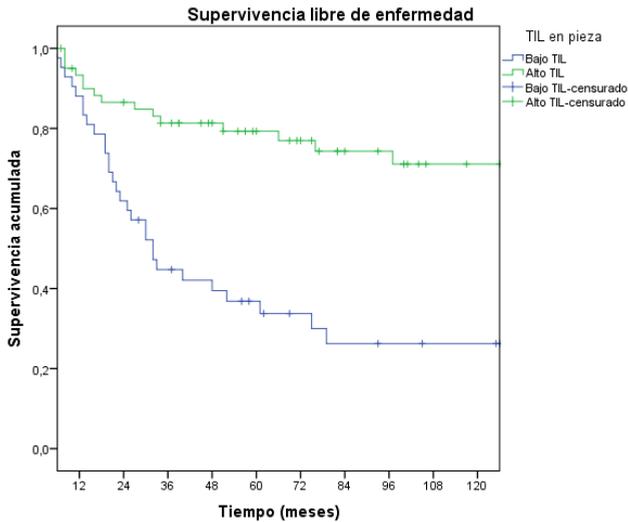


Figura 41 Curva Kaplan Meyer de supervivencia libre de recaída tumoral en función de infiltrado linfocitario residual en pieza quirúrgica.

El valor pronóstico independiente del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica, se valoró en el análisis univariante como se ha reflejado en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Las pacientes con niveles bajos de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica comparado con las que presentan niveles altos de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica, presentan un mayor riesgo de recaída con una HR 4.27; IC 95% 2.29-7.98 (p=0.001).

4.5.3 Estudio del cambio entre el infiltrado linfocitario tumoral basal en la biopsia diagnóstica y residual en la pieza quirúrgica

El cambio de infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia diagnóstica y en la pieza quirúrgica también ha sido estudiado en las pacientes de las que disponemos ambas muestras. De las 103 pacientes que no consiguieron respuesta completa patológica, y por tanto se puede determinar el cambio de infiltrado tras la quimioterapia con intención neoadyuvante; 50 pacientes no presentaron cambios (48.6%), 26 pacientes el porcentaje de infiltrado linfocitario disminuía (25.2%) y en 27 pacientes aumentaba el infiltrado (26.2%).

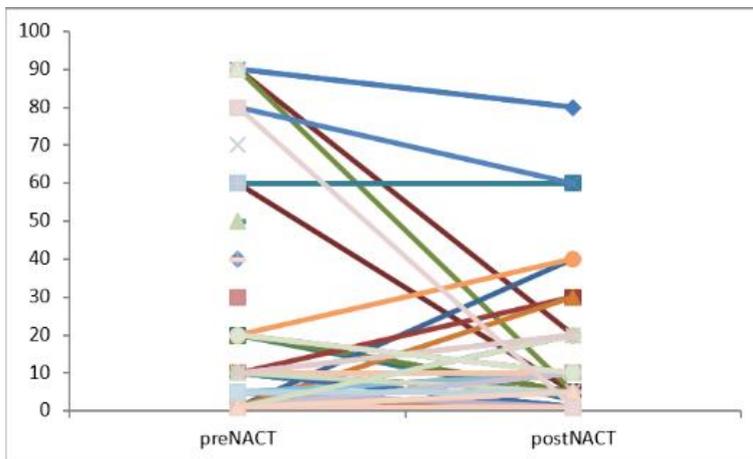


Figura 42 Cambio del infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia diagnóstica y la pieza quirúrgica. (preNACT=previo a la quimioterapia neoadyuvante y postNACT=postquimioterapia).

En cuando a las características clínicas y anatomopatológicas, entre los tres grupos según el cambio de infiltrado linfocitario tumoral no hubo diferencias en la mediana

de edad ($p=0.905$), tipo histológico ($p=0.098$), componente de carcinoma ductal in situ asociado en la biopsia ($p=0.795$), invasión linfovascular presente en la biopsia ($p=0.050$), grado histológico ($p=0.451$) ni ki67 en la biopsia ($p=0.610$). Sin embargo, se objetivaron diferencias en cuanto al estadio clínico al diagnóstico, ya que en el grupo que no presentan cambios de infiltrado linfocitario 31 de las 50 pacientes (62%) presentaban al diagnóstico un estadio III, frente a las 8 de las 26 pacientes (30.7%) en el grupo en el que descendía el infiltrado linfocitario tumoral y los 6 de las 27 pacientes (22,2%) en el grupo en el que ascendía el infiltrado linfocitario. ($p=0.014$).

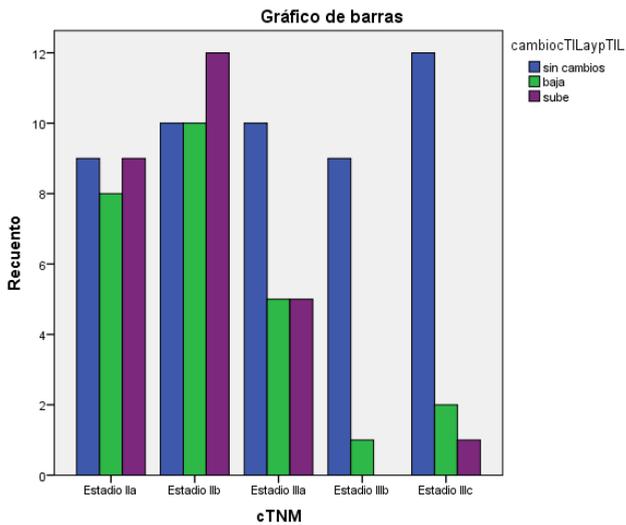


Figura 43 Distribución de las pacientes que no consiguen una respuesta completa patológica, en función del estadio clínico al diagnóstico y de los cambios que presenta el infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia y la pieza.

En cuanto al infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia basal en el grupo donde posteriormente no se presentan cambios, el 98% pertenecía al grupo de bajo infiltrado linfocitario frente al 2% de alto infiltrado linfocitario basal. Mientras que en el grupo en el que desciende el infiltrado, el 76.9% pertenecían al grupo de bajo infiltrado y el 23.1% al de alto infiltrado linfocitario y en el grupo donde aumenta el infiltrado todos los casos presentaban niveles bajo de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia basal ($p=0.014$).

No se encontraron diferencias en el tratamiento recibido entre los tres grupos en cuanto al esquema recibido en neoadyuvancia ($p=0.560$), tasa cirugías conservadoras ($p=0.050$) ni en la radioterapia adyuvante ($p=0.112$).

En la pieza quirúrgica tampoco se observaron diferencias entre los tres grupos en la enfermedad residual tras cirugía ($p=0.384$), ni foco residual ($p=0.393$), invasión linfovascular presente en la pieza ($p=0.671$) ni componente de carcinoma ductal in situ asociado ($p=0.864$).

Al determinar el nivel infiltrado linfocitario en la pieza quirúrgica se objetivaron diferencias entre los tres grupos; en el grupo que no se presentan cambios de infiltrado 26 pacientes (72%) presentaban niveles bajos de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza y 14 pacientes (23%) presentaban niveles altos. En el grupo que disminuye el infiltrado linfocitario tumoral, 6 pacientes restantes (23.1%) presentaban niveles bajos de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza y en las 20 pacientes (76.9%) presentaban niveles altos. Mientras que en el grupo que asciende el infiltrado, las pacientes 27 (100%) presentaban niveles altos de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica ($p=0.001$).

En la Tabla 15 se resumen las principales características clínicas y anatomopatológicas en los tres grupos según el cambio de infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia y en la pieza quirúrgica comentadas previamente.

Variable	Cambios TIL entre la biopsia y la pieza			X ²
	Aumenta	Disminuye	Sin cambios	
Edad<40 años	14 (52 %)	15 (57%)	28 (56%)	0.905
cTNM				
Ila	9 (33.3%)	8 (30.8%)	9 (18%)	0.014
Ilb	12 (44.4%)	10 (38.5%)	10 (20%)	
IIIa	5 (18.5%)	5 (19.2%)	10 (20%)	
IIIb	0 (0%)	1 (3.8%)	9 (18%)	
IIIc	1 (3.7%)	2 (7.7%)	12 (24%)	
Histología				
Ductal	17 (63%)	13 (50%)	29 (58%)	0.098
Lobulillar	10 (37%)	13 (50%)	33 (42%)	
CDIS asociado	16 (59.3%)	18 (69.2%)	37 (74%)	0.795
Grado 3	9 (33.3%)	6 (23.1%)	12 (24%)	0.451
No ILV	19 (70.4%)	22 (84.6%)	32 (78%)	0.050
Ki67<50%	2 (7.4%)	4 (16%)	8 (16.8%)	0.610
Bajo TIL biopsia	28 (100%)	20 (76.9%)	49 (98%)	0.014
Antracicli.+taxano	26 (96%)	23 (89%)	46 (92%)	0.565
ypTNM				
I	11(40.7%)	11 (42.3%)	15 (30%)	0.384
Ila	5 (18.5%)	10 (38.5%)	10 (20%)	
Ilb	5 (18.5%)	1 (3.8%)	6 (12%)	
IIIa	5 (18.5%)	3 (11.5%)	13 (26%)	
IIIb	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	
IIIc	1 (3.7%)	1 (3.8%)	5 (10%)	
Tumor Residual				
Multifocal	5 (18.5%)	7 (26.9%)	11 (22%)	0.393
CDIS en pieza	4 (14.8%)	5 (19.2%)	9 (18%)	0.864

Bajo TIL en pieza	0(0%)	6 (23.1%)	36 (72%)	0.001
ILV en pieza	6 (22.2%)	6 (23.1%)	16 (32%)	0.671
Cirugía conserv.	15 (55.6%)	13 (50%)	15 (30%)	0.050
RT Adyuvante	23 (85.2%)	21 (80.8%)	48 (96%)	0.112

Tabla 15 Características clínicas, histopatológicas y terapéuticas en función del cambio de TIL entre la biopsia y la pieza.

El cambio del infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia diagnóstica y la pieza quirúrgica también ha demostrado que presenta un valor pronóstico. En el grupo que no presentaron cambio de infiltrado linfocitario tumoral 32 de las 50 pacientes (64%) recayeron, en el grupo que disminuía el infiltrado 10 de las 26 pacientes (38.5%) y 5 de las 27 pacientes (21.4%) en las que aumentaba el infiltrado linfocitario tumoral comparando entre biopsia y pieza quirúrgica (p=0.010)

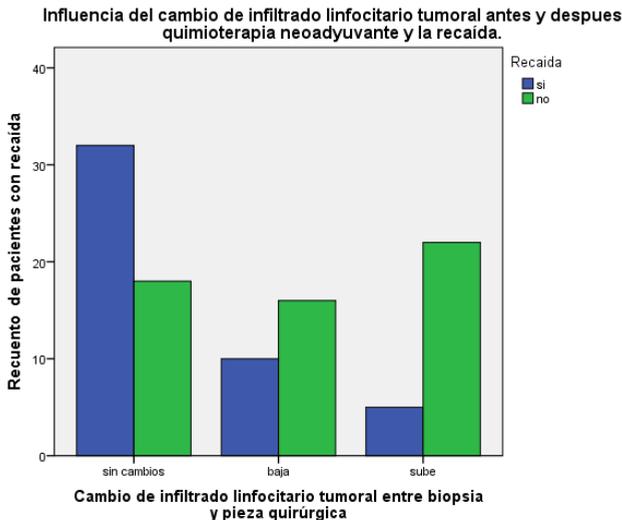


Figura 44 Influencia del cambio de infiltrado linfocitario tumoral entre biopsia y pieza en relación a la recaída tumoral.

A los 6 años, en el grupo que aumenta el infiltrado linfocitario tumoral se presenta una recaída del 16.5 % mientras que en el grupo disminuye el infiltrado linfocitario tumoral es del 38.9% y en el que no presenta cambios del 56.6% ($p=0.001$). La mediana de supervivencia libre de enfermedad en el grupo sin cambios en el infiltrado fue de 40 meses (IC 95% 8.1- 71 meses), en el grupo que disminuía el infiltrado 154 meses (IC 95% 9-327) mientras que en las que aumentaba el infiltrado linfocitario tumoral comparando entre biopsia y pieza quirúrgica aún no se ha alcanzado ($p=0.001$).

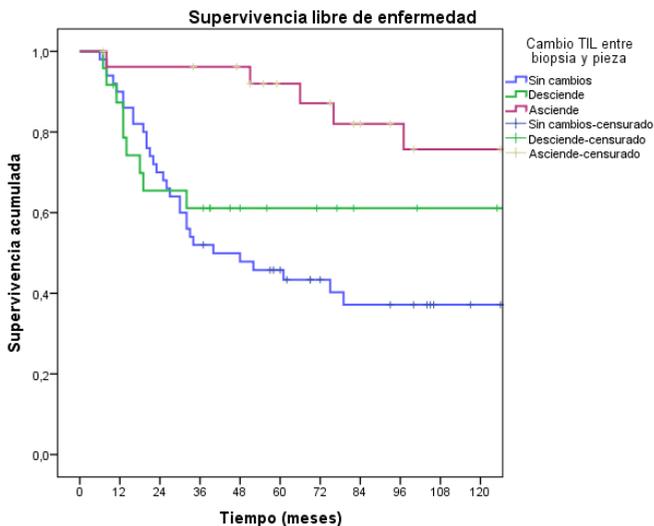


Figura 45 Curva Kaplan Meyer de supervivencia libre de enfermedad entre los grupos según en cambio se infiltrado linfocitario tumoral.

El valor pronóstico se confirmó en el análisis univariante y multivariante como se ha reflejado en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y Tabla 13, respectivamente. Las pacientes que no presentan cambios o disminuye el infiltrado

linfocitario tumoral entre la biopsia y la pieza quirúrgica comparado con las que aumenta el infiltrado linfocitario tumoral, presentan un mayor riesgo de recaída tumoral con una HR 4.01; IC 95% 1.69-9.59 (p=0.002) en el análisis univariante. Este valor pronóstico se mantiene en el análisis multivariante, con HR 2.90; IC 95% 1.05-8.67 (p=0.040).

4.6 ***Conclusiones de la primera fase del estudio***

El hallazgo principal de este trabajo es que se ha identificado factores pronósticos en íntima relación con el microambiente tumoral y que además son independientes de los factores predictivos y pronósticos clásicos dependientes del tumor.

En esta serie se han analizado 164 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo estadio II-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante y se ha valorado el infiltrado linfocitario tumoral siguiendo las recomendaciones según el Grupo de Trabajo Internacional en Infiltrado linfocitario tumoral.

La metodología referida en este trabajo es rápida, segura, reproducible y no supone un sobrecoste económico para el Servicio de Anatomía Patológica, por lo que se puede trasladar a la práctica clínica diaria.

Según el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica, se clasificó a las pacientes en dos grupos, siendo el punto de corte 40% de infiltrado linfocitario tumoral. Según las características clínico-patológicas ambos grupos estaban bien balanceados y homogéneamente tratados. Los resultados confirman el valor

predictivo del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica en respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas y taxanos en cáncer de mama triple negativa. El grupo de alto infiltrado tumoral en la biopsia presentó una tasa de respuestas completas patológicas de 87.9% frente al grupo de pacientes de bajo infiltrado linfocitario tumoral de 9.4% ($p= 0.001$). También se valoró si la adición de platino al esquema neoadyuvante, mejoraba la tasa de respuestas completas patológicas alcanzadas, pero dado el pequeño tamaño muestral que recibió platino ($n=12$), no se objetivaron diferencias con la adición.

El valor **pronóstico** se valora en el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica, y también en la pieza quirúrgica en las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativa estadios II-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante. A los 6 años, el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica presenta una recaída tumoral en el 14.2% de las pacientes frente al 42.1% de las pacientes en el grupo de bajo infiltrado ($p=0.010$). En el análisis univariante se confirma un incremento del riesgo de recaída tumoral al presentar un bajo infiltrado linfocitario tumoral frente a un alto infiltrado en la biopsia diagnóstica con una HR 3.44; IC 95% 1.78-6.65 ($p= 0.001$).

Por otro lado, en cuanto al infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica, como el 86.7% de las muestras presentaron un infiltrado linfocitario tumoral entre 1-10% en la pieza quirúrgica, el punto de corte fue el 1%. A los 6 años, el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica presenta una recaída tumoral del 23 % mientras que el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica del 66.2% ($p= 0.001$). En el análisis univariante se confirma un incremento del riesgo de recaída tumoral al presentar un bajo infiltrado linfocitario

tumoral en la pieza quirúrgica frente a presentar un nivel alto con una HR 4.27; IC 95% 2.29-7.98 (p= 0.001).

Existe una correlación entre el infiltrado tumoral linfocitario en la biopsia diagnóstica y en la pieza quirúrgica en las pacientes que no obtienen la respuesta completa patológica (correlación de Pearson de 0.676, p=0.001).

En nuestra serie, se objetiva un descenso del porcentaje de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica en el 25.2% de las muestras, un aumento en 26.2% de las muestras y no se objetiva ningún cambio en el 48.6% restante. En cuanto a las características clínico-patológicas, los tres grupos estaban bien balanceados y homogéneamente tratados.

Los cambios entre el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia y la pieza quirúrgica también tienen valor pronóstico; a los 6 años, en el grupo que aumenta el infiltrado linfocitario tumoral se presenta una recaída del 16.5 % mientras que en el grupo disminuye el infiltrado linfocitario tumoral es del 38.9% y en el que no presenta cambios del 56.6% (p=0.001). Las pacientes que no presentan cambios o disminuye el infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia y la pieza quirúrgica comparado con las que aumenta el infiltrado linfocitario tumoral, presentan un mayor riesgo de recaída tumoral con una HR 4.01; IC95% 1.69-9.59 (p=0.002) en el análisis univariante y este valor pronóstico se mantiene en el análisis multivariante, con una HR 2.94; IC 95% 1.10-8.67 (p=0.040).

4.7 Secuenciación de inmunogenes de la enfermedad residual tras quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo.

4.7.1 Características anatomopatológicas y clínicas de las pacientes analizadas.

De las 103 pacientes que no consiguieron una respuesta completa, se han seleccionado 36 muestras de forma aleatoria de la pieza residual tras la cirugía del tumor primario. De éstas, 33 pacientes (92%) presentaron muestra histológica suficiente tumoral en la pieza quirúrgica residual para la secuenciación de inmunogenes.



Figura 46 Muestras de tejido mamario incluidas en parafina procedentes de pacientes con cáncer de mama triple negativas que no han conseguido una respuesta completa patológica y con marcaje del área con mayor presencia de células tumorales.

A continuación en la Tabla, se muestra el listado de las 33 pacientes analizadas junto a una serie de datos anatomopatológicos y clínicos.

N°	TILbiopsia	TILpieza	ypTNM	Recaída	SLE
TIL1	Bajo	Bajo	ypT2 ypN2	SI	25
TIL2	Bajo	Alto	ypT1c pN2a	NO	59
TIL3	Bajo	Bajo	ypT1a ypN2	NO	37
TIL4	Bajo	Bajo	ypT2 ypN0	NO	39
TIL5	Alto	Alto	ypT2 ypN2	SI	28
TIL6	Bajo	Bajo	ypT3 ypN3	SI	75
TIL7	Bajo	Alto	ypT2 ypN1	NO	82
TIL8	Bajo	Alto	ypT1b ypN0	NO	51
TIL9	Bajo	Alto	ypT1b ypN0	NO	47
TIL10	Bajo	Bajo	ypT2 ypN1	SI	8
TIL11	Bajo	Bajo	ypT1c ypN2	SI	30
TIL12	Bajo	Bajo	ypT2 ypN0	SI	7
TIL13	Bajo	Bajo	ypT1a ypN1	NO	62
TIL14	Bajo	Bajo	ypT2 ypN3	SI	15
TIL15	Bajo	Bajo	ypT1 ypN0	NO	56
TIL16	Bajo	Bajo	ypT1a ypN1	NO	93
TIL17	Bajo	Alto	ypT3 ypN2	SI	14
TIL18	Bajo	Alto	ypT1c ypN0	NO	60
TIL19	Bajo	Alto	ypT1a ypN1	SI	55

TIL20	Bajo	Bajo	ypT1a ypN2	SI	39
TIL21	Bajo	Bajo	ypT1b ypN2	NO	58
TIL22	Alto	Alto	ypT1a ypN0	NO	82
TIL23	Alto	Alto	ypT1a ypN1	NO	71
TIL24	Bajo	Bajo	ypT2 ypN0	SI	32
TIL25	Bajo	Alto	ypT1a ypN1	SI	27
TIL26	Bajo	Alto	ypT1a ypN1	SI	10
TIL27	Bajo	Bajo	ypT1c ypN0	SI	19
TIL28	Bajo	Bajo	ypT2 ypN2	SI	20
TIL29	Bajo	Bajo	ypT2 ypN1	SI	10
TIL30	Bajo	Alto	ypT1c ypN0	NO	117
TIL31	Bajo	Alto	ypT1c ypN0	NO	34
TIL32	Alto	Alto	ypT1a ypN0	SI	37
TIL33	Bajo	Bajo	ypT2 ypN0	SI	26

Tabla 16 Lista de las 33 pacientes analizadas junto a una serie de datos del historial clínico que incluyen: el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia y la pieza, el desarrollo de recaída o no y la supervivencia libre de evento en meses.

Como es posible observar, se analizaron dos grupos de pacientes con cáncer de mama triple negativas distintos; por un lado un subgrupo de pacientes con alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica (n=15), dentro de los cuales encontramos pacientes con infiltrado linfocitario alto y bajo en la biopsia basal. Por otro lado, un subgrupo de pacientes con un bajo infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica y en la biopsia basal (n=18).

En la tabla se refleja también la enfermedad residual tras la quimioterapia neoadyuvante (entre IA hasta IIIC). Y la evolución clínica de las pacientes, si han presentado una recaída locorregional o a distancia y la supervivencia libre de evento (rango 7-117 meses).

Tras la secuenciación mediante MiSeq System (Illumina), se obtuvo un listado con el número de veces que aparecía cada transcrito del panel I/O para cada paciente. Tras ello, se procedió al análisis estadístico de los resultados, que se detallarán a continuación.

4.7.2 Valoración de la robustez de los resultados.

En primer lugar se realizó un control de calidad de las muestras. Se realizó una normalización de las muestras mediante DESeq2 para minimizar el ruido técnico introducido en los datos durante el proceso de secuenciación y así poder realizar estudios de comparación.

Tras la normalización de los resultados, como se refleja en la figura siguiente, sólo se eliminaron dos muestras TIL13 duplicado y TIL 24 por no recogerse dentro del umbral de calidad.

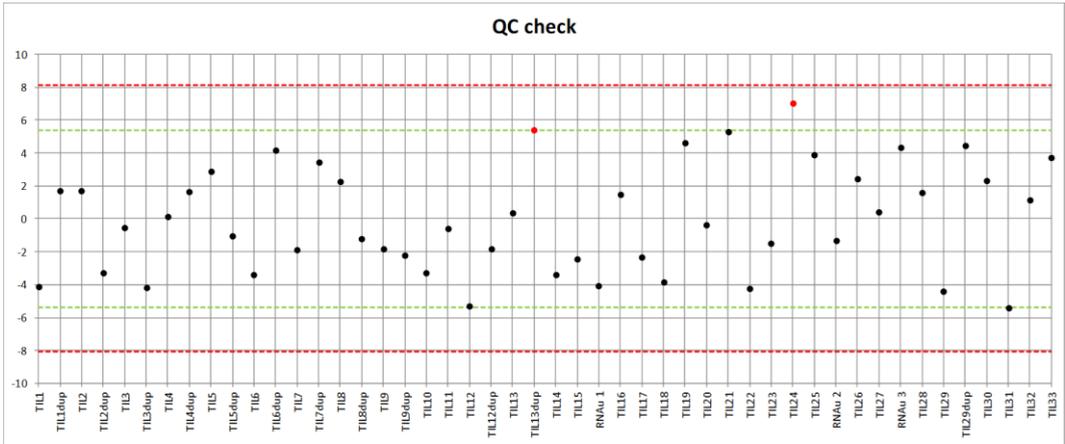


Figura 47 Gráfico de normalización de los resultados donde se eliminaron el duplicado del TIL13 y el TIL24 (en rojo).

De las 33 muestras de las piezas quirúrgicas, se han realizado duplicados para poder determinar la reproducibilidad de los resultados. La robustez se valoró mediante estudios de correlación de Pearson (r). Se ha valorado una misma zona delimitada por el Patólogo en las muestras aleatoriamente seleccionadas (TIL3, TIL 8, TIL9), como duplicados de la misma área. Como objetivamos en la figura siguiente, se presenta una buena correlación de Pearson entre las muestras y sus duplicados (coeficiente de correlación de Pearson de 0.84- 0.86), de forma que se apoya la reproducibilidad.

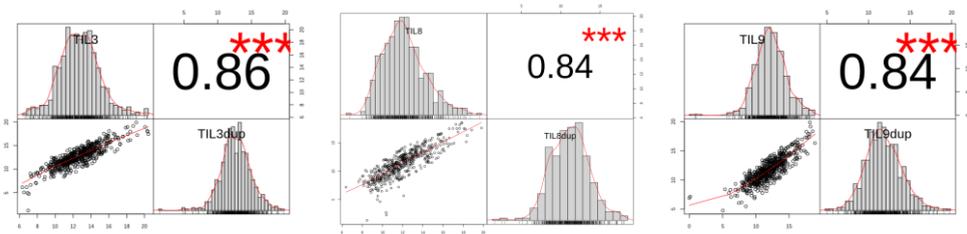
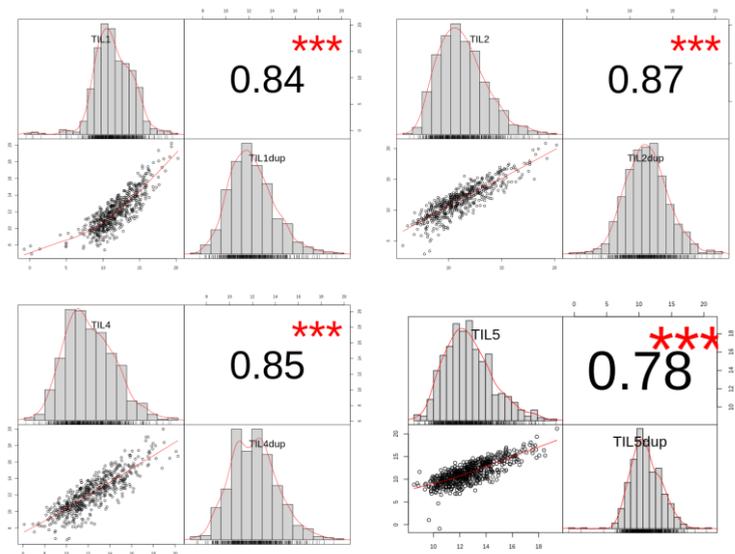


Figura 48 Correlación de Pearson para valorar la robustez de los resultados.

4.7.3 Valoración de la heterogeneidad intratumoral.

Para la valoración de la heterogeneidad intratumoral, se han analizado diferentes áreas tumorales marcadas por el patólogo experto dentro de una misma muestra en parafina (TIL 1, TIL2, TIL 4, TIL5, TIL6, TIL7, TIL 12, TIL29).

La heterogeneidad intratumoral se valoró mediante estudios de correlación de Pearson (r). Como vemos en la figura en las muestras y los duplicados de las mismas (TIL 1, TIL2, TIL5, TIL6, TIL7 y TIL 12) presentan una buena correlación con coeficiente de Pearson >0.78 , mientras que las dos restantes (TIL4 y TIL29) presentan un coeficiente de correlación de Pearson de 0.64 y 0.47, respectivamente, lo que podría apoyar el concepto de heterogeneidad intratumoral.



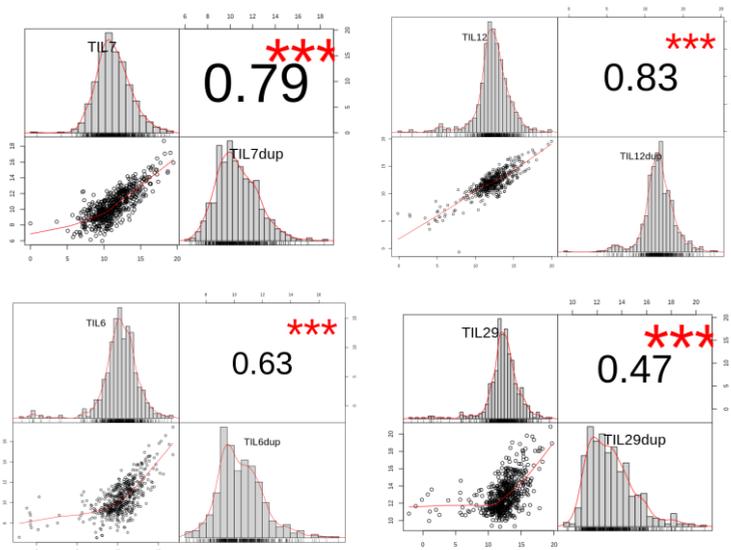


Figura 49 Correlación de Pearson para valorar la heterogeneidad intratumoral.

4.7.4 Análisis de expresión de inmunogenes en la enfermedad residual.

Tras la normalización de los datos y excluir las dos muestras TIL13 duplicado y TIL 24 por motivos estadísticos, disponemos en el análisis de expresión de 32 casos y 11 duplicados de los casos como de forma gráfica se puede objetivar en el siguiente boxplot.

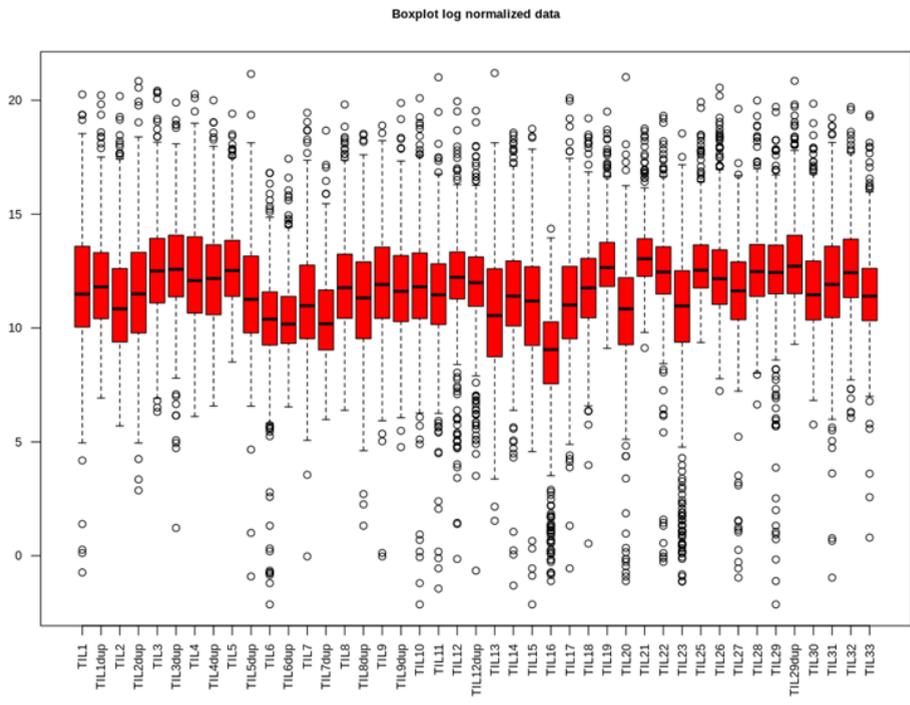


Figura 50 Boxplot con normalización de los datos de los 32 casos y 11 duplicados de los mismos.

Inicialmente se realizó un análisis exploratorio mediante un análisis de componentes principales (PCA) en este set de pacientes. En este caso, el PCA permitió ver la separación espacial de los pacientes en base a los patrones de expresión génica compartidos y diferenciales únicamente. Se llevó a cabo un análisis de componentes principales entre los casos con alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza frente a casos con bajo infiltrado linfocitario tumoral como técnica exploratoria. El resultado del PCA se muestra a continuación, sin objetivar diferencias entre las dos poblaciones. Cabe destacar que una muestra (TIL16) se

agrupa de forma alejada siendo diferente del resto, lo que también podía observarse en la gráfica de normalización.

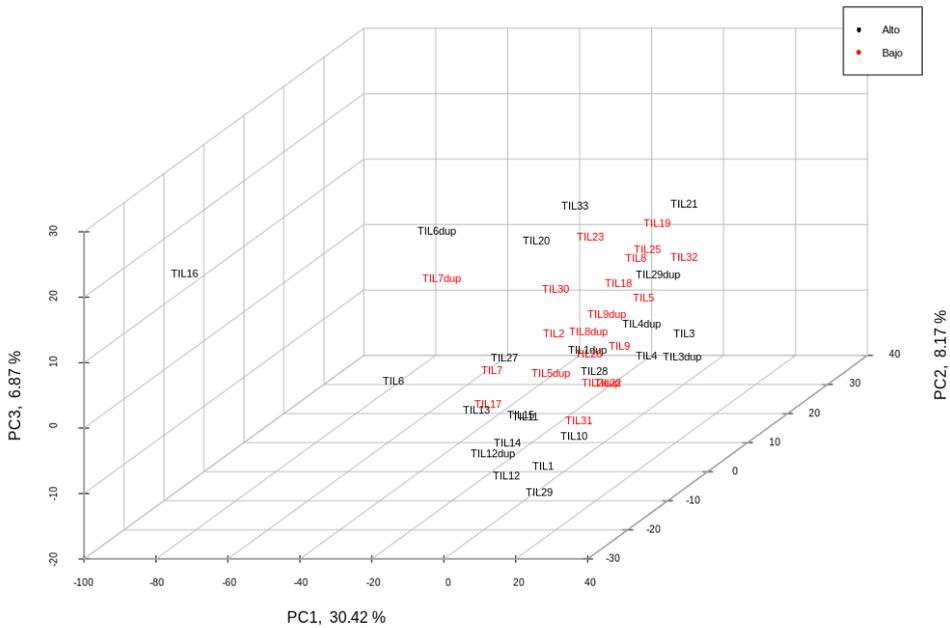


Figura 51 Análisis de componentes principales tridimensional (PCA) realizado entre el grupo de pacientes con alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza frente a pacientes con bajo infiltrado linfocitario tumoral.

Posteriormente, se aplicó un algoritmo de agrupamiento jerárquico estándar (*clustering*) a los datos de expresión de los 32 casos analizados con el objetivo de buscar patrones de expresión génica compartidos, para permitir la subclasificación de las pacientes y que se puedan correlacionar con factores pronósticos.

Como se objetiva existe una clasificación en dos clusters en función de la expresión de los 549 inmunogenes. El cluster 1 (n= 13) presentaba una menor expresión de genes ligados al microambiente tumoral en comparación al cluster 2 (n= 19). Sin embargo, hay que destacar dentro del cluster 1, el caso TIL 16 podemos observar que su patrón de expresión es distinto al de ambos clusters.

Para facilitar la posterior interpretación de resultados, sólo se tuvieron en cuenta los 104 genes que mayor expresión diferencial presentaban entre los pacientes analizados como se muestra a continuación a través de un heat map.

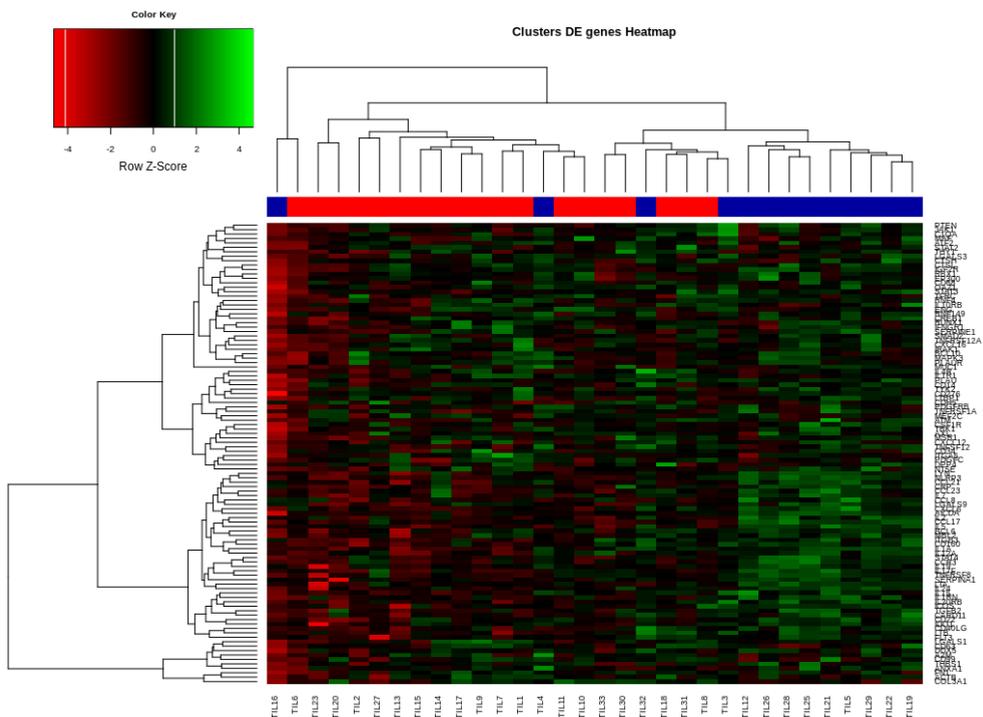


Figura 53 Heat map que refleja los datos de expresión de 104 genes en los 32 casos analizados en cluster; cluster 1 en azul (n= 13) y cluster 2 en rojo (n= 19).

Para ello, se realiza un análisis de expresión diferencial mediante DESeq2, ajustando el p-valor con Benjamini y Hochberg. Se toma una confianza del 90%, es decir, el p-valor ha de ser menor 0.1 para que el gen se considere significativo (columna “padj”). Los genes que destacan por expresarse diferencialmente de forma significativa entre ambos grupos se recogen a continuación.

Cluster 2 vs 1						
	baseMean	log2FoldCl	lfcSE	stat	pvalue	padj
COL3A1	372390,5	1,911408	0,428254	4,463258	8,07E-06	0,001448
MUC1	37855,2	1,766348	0,558424	3,163095	0,001561	0,02637
LGALS1	73126,58	1,630152	0,329159	4,952479	7,33E-07	0,000394
FN1	234720,6	1,556667	0,433257	3,592944	0,000327	0,009258
SERPINE1	19588,63	1,4128	0,356173	3,966607	7,29E-05	0,003566
LTBP1	8385,262	1,296541	0,339929	3,81415	0,000137	0,004901
PDGFC	5250,95	1,258366	0,297857	4,224734	2,39E-05	0,002536
CD99	40111,67	1,2277	0,293226	4,186872	2,83E-05	0,002536
CD276	8288,67	1,197763	0,348346	3,43843	0,000585	0,013686
TFRC	30315,37	1,150719	0,420281	2,737972	0,006182	0,052077
IRAK1	21061,63	1,1338	0,454336	2,495507	0,012578	0,079129
TNFRSF12	11703,09	1,121247	0,302579	3,705637	0,000211	0,006673
CDH5	6676,358	1,113554	0,396643	2,807447	0,004994	0,047132
ITGA5	6432,755	1,11007	0,288521	3,847444	0,000119	0,004587
TNFRSF1A	10408,33	1,108698	0,378247	2,931147	0,003377	0,037852
CXCL12	7770,645	1,085837	0,359064	3,024079	0,002494	0,036228
RUNX1	17153,66	1,07997	0,251367	4,296379	1,74E-05	0,002335
LGALS3	19970,37	1,055801	0,289502	3,646956	0,000265	0,007931
OAZ1	32045,42	1,052692	0,257738	4,084344	4,42E-05	0,003081
IL1R1	9631,483	1,028392	0,252304	4,076003	4,58E-05	0,003081
PDGFRB	12290,54	1,019357	0,259728	3,924707	8,68E-05	0,003594
CD68	20278,16	1,018637	0,334875	3,041844	0,002351	0,035313
THY1	13266,94	0,967117	0,287841	3,359905	0,00078	0,016779
RBX1	18934,99	0,966909	0,28041	3,4482	0,000564	0,013686
CD63	44626,01	0,953661	0,238728	3,994766	6,48E-05	0,003484
IFNGR1	15728,44	0,941508	0,202986	4,638303	3,51E-06	0,000945
MSR1	5342,161	0,915512	0,309647	2,956631	0,00311	0,037184
NT5E	6573,65	0,914553	0,359306	2,545329	0,010917	0,072514
CXCL16	9532,743	0,900132	0,315194	2,855804	0,004293	0,042769
MAF	17312,46	0,885123	0,233305	3,793841	0,000148	0,004988
C1QA	17954,49	0,884707	0,339976	2,602261	0,009261	0,069993
ENG	11105,55	0,876994	0,26672	3,288075	0,001009	0,020873
DPP4	7704,775	0,875582	0,305143	2,86942	0,004112	0,042769
PLAUR	10965,74	0,870724	0,303737	2,866707	0,004148	0,042769
CTSH	15501,48	0,828876	0,283556	2,92315	0,003465	0,038045
CTSL	20714,37	0,82068	0,327384	2,506779	0,012184	0,079129
STAT2	15333,37	0,820472	0,204793	4,006346	6,17E-05	0,003484
CD34	3701,403	0,809539	0,317127	2,552728	0,010688	0,072514
A2M	43678,57	0,808916	0,314722	2,570252	0,010162	0,071939
CD14	8974,24	0,796562	0,245595	3,243399	0,001181	0,022694
ACTB	142596,8	0,768317	0,275021	2,793665	0,005211	0,047521
AXL	4751,238	0,765047	0,276999	2,761908	0,005746	0,051197
STAT3	27257,18	0,752897	0,272927	2,758606	0,005805	0,051197
EP300	13350,53	0,744508	0,210677	3,533889	0,000409	0,011015
THBS1	46344,5	0,742385	0,265189	2,799461	0,005119	0,047481
ANXA1	33952,59	0,710821	0,274821	2,586487	0,009696	0,069993

IGF2R	15979,34	0,599302	0,253792	2,361394	0,018206	0,09795
DDX5	79063,82	0,580685	0,181493	3,199491	0,001377	0,024946
TYK2	10643,36	0,565307	0,231758	2,439211	0,014719	0,085151
IL4R	9907,738	0,557508	0,215291	2,589552	0,00961	0,069993
BCL10	9440,167	0,548279	0,204122	2,686037	0,007231	0,05806
ATF2	12815,1	0,543242	0,180575	3,008406	0,002626	0,036228
RNF4	12508,23	0,537955	0,180874	2,974201	0,002938	0,037184
PTEN	22144,59	0,537882	0,215162	2,499894	0,012423	0,079129
CSF1R	5666,294	0,535669	0,200674	2,669348	0,0076	0,060128
TBK1	4566,515	0,533034	0,216529	2,461718	0,013827	0,083585
ATM	6336,09	0,526231	0,181171	2,904614	0,003677	0,039565
JAK1	14642,63	0,513509	0,209685	2,448955	0,014327	0,083783
RNF149	14649,05	0,46477	0,198014	2,347151	0,018918	0,098826
TNFSF12	3576,322	0,462407	0,181441	2,548528	0,010818	0,072514
CREB1	9433,098	0,394693	0,152727	2,584313	0,009757	0,069993
CD22	2449,415	-0,46378	0,193265	-2,39972	0,016408	0,091702
IL20RB	1798,513	-0,49303	0,198377	-2,48533	0,012943	0,079129
IL15	2811,784	-0,54422	0,218614	-2,48941	0,012796	0,079129
LYN	1949,944	-0,58563	0,249364	-2,34849	0,01885	0,098826
CD160	1199,689	-0,62259	0,211267	-2,94691	0,00321	0,037496
CARD11	2646,288	-0,63116	0,22455	-2,81079	0,004942	0,047132
CCL23	1647,485	-0,63188	0,263622	-2,39692	0,016534	0,091702
STAT4	1562,556	-0,6428	0,258618	-2,4855	0,012937	0,079129
CCL8	1672,32	-0,64791	0,2642	-2,45235	0,014192	0,083783
ITGB3	1531,696	-0,66891	0,284995	-2,3471	0,01892	0,098826
ICOS	1818,438	-0,67617	0,282873	-2,39036	0,016832	0,092403
TGFB2	3045,929	-0,69502	0,262662	-2,64608	0,008143	0,062585
NLRP3	1818,323	-0,6983	0,177018	-3,94482	7,99E-05	0,00358
LGALS9	1450,603	-0,72882	0,241972	-3,01202	0,002595	0,036228
IL1RN	2532,337	-0,73428	0,305694	-2,40202	0,016305	0,091702
CCR3	1464,226	-0,74161	0,232008	-3,1965	0,001391	0,024946
CCL17	937,5336	-0,749	0,245181	-3,0549	0,002251	0,035313
MBL2	1063,768	-0,75467	0,248217	-3,04036	0,002363	0,035313
CD40LG	2062,401	-0,76866	0,26877	-2,8599	0,004238	0,042769
TNFRSF8	1561,802	-0,76986	0,301076	-2,55702	0,010557	0,072514
IDO1	1598,101	-0,77064	0,318673	-2,41827	0,015594	0,089253
BCL6	1974,876	-0,79339	0,268033	-2,96006	0,003076	0,037184
IL7	1635,514	-0,80311	0,259535	-3,09444	0,001972	0,032147
IL1A	1290,396	-0,80598	0,274085	-2,94061	0,003276	0,037496
IL5	1848,778	-0,83149	0,303767	-2,73727	0,006195	0,052077
CCL21	2623,784	-0,83959	0,342616	-2,45053	0,014265	0,083783
CRP	1543,734	-0,86355	0,273127	-3,16171	0,001568	0,02637
FLT3	932,551	-0,86544	0,365226	-2,3696	0,017807	0,096771
IL2	1568,571	-0,89031	0,262106	-3,39675	0,000682	0,015286
IL17F	1944,859	-0,89139	0,272961	-3,26562	0,001092	0,021764
IL12A	1114,833	-0,92037	0,265136	-3,47131	0,000518	0,013269
LTA	1012,16	-0,92792	0,358341	-2,5895	0,009612	0,069993
IL24	821,8061	-0,94544	0,351788	-2,68753	0,007198	0,05806
CXCL6	1943,329	-0,95808	0,320748	-2,987	0,002817	0,037184

Tabla 17 Lista de los 104 genes diferencialmente expresados entre los dos clusters.

Como se objetiva en la figura, el cluster 2 presentaba una mediana de supervivencia libre de evento de 75 meses versus 37 meses en el cluster 1. Sin embargo, no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.436$).

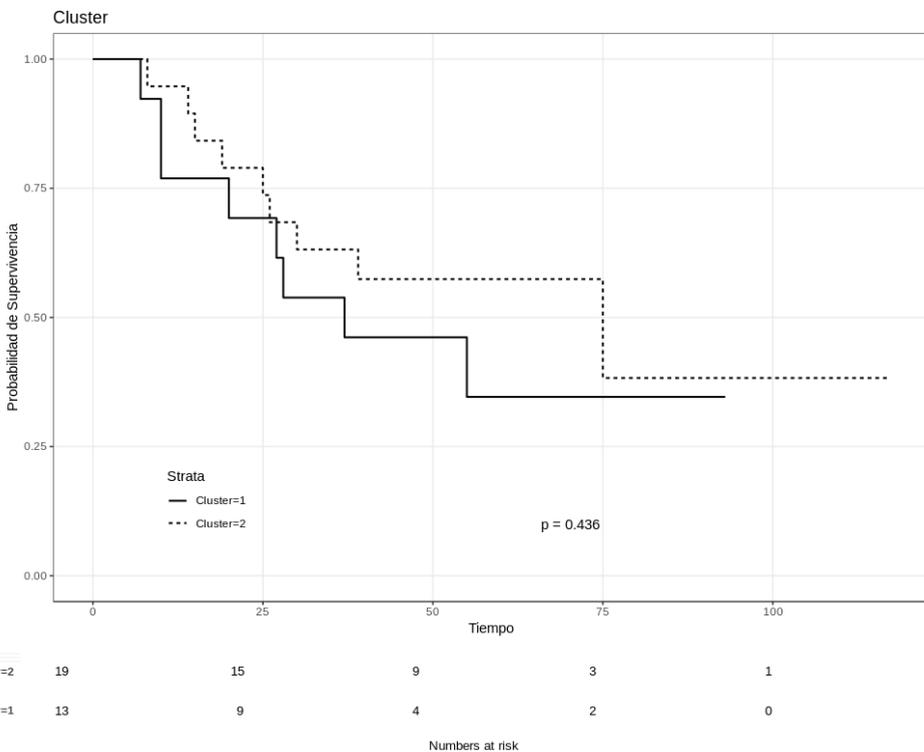


Figura 54 Curva Kaplan Meyer de supervivencia libre de evento entre el cluster 1 y el cluster 2.

Además no se objetivó correlación entre los clusters descritos y los niveles de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica ($p= 0.260$) y tampoco con los niveles de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia basal ($p= 0.240$)

Análogamente al proceso seguido previamente, en este caso se enfrentaron los datos de expresión correspondientes a los pacientes con alto infiltrado linfocitario contra los datos de expresión de los pacientes con bajo infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica. El heat map correspondiente a dichos datos se muestra a continuación en la figura siguiente. Las muestras con alto infiltrado linfocitario tumoral en pieza aparecen en rojo.

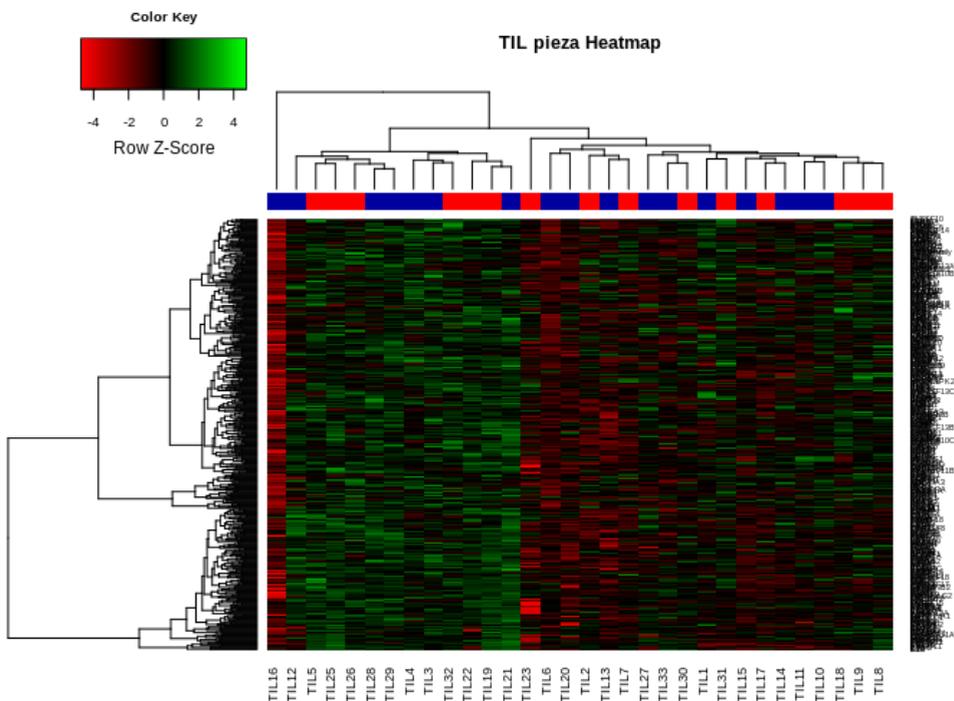


Figura 55 Heat map que refleja los datos de expresión de pacientes alto infiltrado linfocitario tumoral (n=14) bajo infiltrado linfocitario (n=17) en la pieza quirúrgica.

Tan sólo 1 gen destaca por expresarse diferencialmente de forma significativa entre ambos grupos, el de bajo infiltrado linfocitario y alto infiltrado linfocitario en la pieza, se recogen a continuación en la Tabla.

Bajo vs Alto						
	baseMean	log2FoldCl	lfcSE	stat	pvalue	padj
CCL18	5629,832	-1,8761	0,389915	-4,81157	1,5E-06	0,000822

Tabla 18 Gen que destaca por expresarse diferencialmente de forma significativa entre ambos grupos de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica.

Por otro lado al proceso seguido previamente, se enfrentaron los datos de expresión según el infiltrado tumoral en la biopsia diagnóstica. Se analizaron dos grupos de pacientes con cáncer de mama triple negativas distintos; por un lado un grupo de pacientes con alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia (n=4), y por otro lado un grupo de pacientes con un bajo infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia basal (n= 28).

La visualización de la información obtenida tras aplicar un algoritmo de agrupamiento jerárquico se muestra a continuación a través de un *heat map*. Las muestras con alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica aparecen en rojo.

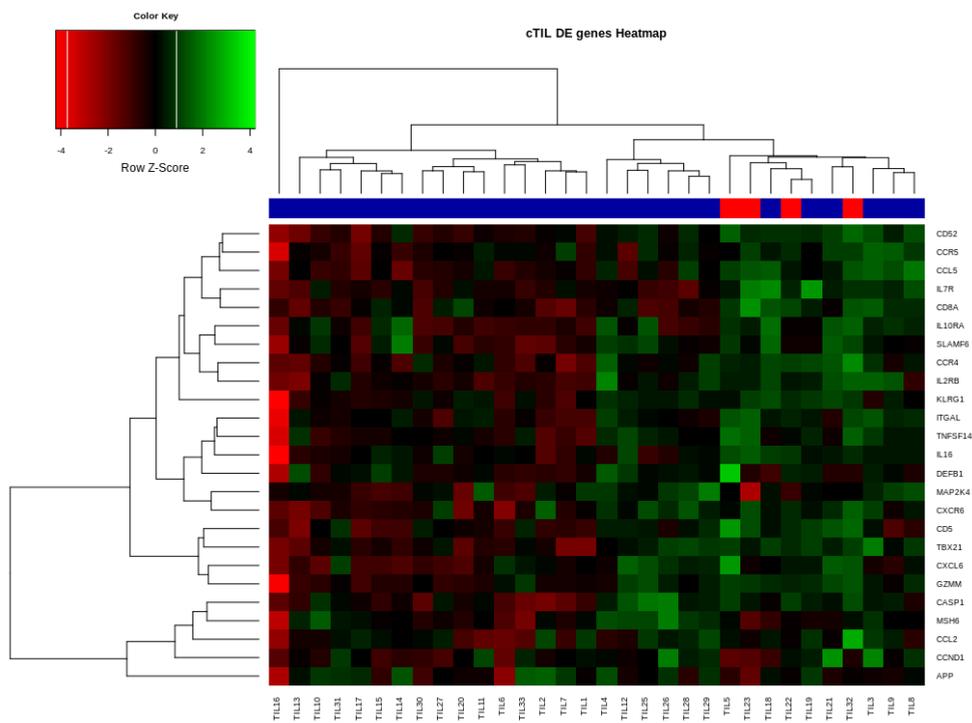


Figura 56 Heat map que refleja los datos de expresión de pacientes alto infiltrado linfocitario tumoral (n=4) bajo infiltrado linfocitario (n=28) en la biopsia basal.

Los 25 genes que destacan por expresarse diferencialmente de forma significativa entre ambos grupos, bajo infiltrado linfocitario y alto infiltrado linfocitario en la biopsia, se recogen a continuación en la Tabla.

cTIL Bajo vs Alto						
	baseMean	log2FoldCl	lfcSE	stat	pvalue	padj
CCND1	27565,5	2,079913	0,638242	3,258818	0,001119	0,068788
APP	80314,33	1,86836	0,595582	3,137032	0,001707	0,073529
MSH6	8044,133	1,595553	0,541869	2,944536	0,003234	0,091617
MAP2K4	3739,012	1,038277	0,353682	2,935627	0,003329	0,091617
CASP1	7668,29	-0,67585	0,232026	-2,91284	0,003582	0,091617
CCR5	3989,278	-0,95358	0,338298	-2,81877	0,004821	0,099696
SLAMF6	3873,119	-1,10753	0,349733	-3,16678	0,001541	0,072443
TBX21	1243,058	-1,13838	0,381282	-2,98566	0,00283	0,091617
CCR4	4208,176	-1,16783	0,409368	-2,85275	0,004334	0,093619
IL10RA	7727,286	-1,3693	0,464528	-2,94772	0,003201	0,091617
CD52	6496,436	-1,37257	0,469774	-2,92178	0,00348	0,091617
TNFSF14	2095,553	-1,37778	0,375987	-3,66443	0,000248	0,026972
IL16	3313,461	-1,40551	0,488154	-2,87922	0,003987	0,093619
IL2RB	3234,142	-1,40754	0,425731	-3,30618	0,000946	0,068788
CD5	1916,666	-1,44856	0,440585	-3,28781	0,00101	0,068788
CCL2	14538,64	-1,45407	0,451113	-3,22329	0,001267	0,068788
CXCL6	1943,329	-1,46885	0,457685	-3,20931	0,001331	0,068788
CXCR6	2694,01	-1,54296	0,376512	-4,09804	4,17E-05	0,010771
ITGAL	4422,668	-1,5656	0,506406	-3,0916	0,001991	0,079174
GZMM	1450,939	-1,59277	0,558495	-2,8519	0,004346	0,093619
CCL5	9034,193	-1,63775	0,541867	-3,02242	0,002508	0,091617
KLRG1	4147,533	-1,64163	0,565911	-2,90086	0,003721	0,091617
CD8A	7289,734	-1,94573	0,532878	-3,65136	0,000261	0,026972
IL7R	8631,797	-2,00012	0,460122	-4,34694	1,38E-05	0,007137
DEFB1	3705,659	-2,25531	0,607675	-3,71138	0,000206	0,026972

Tabla 19 Lista de los genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes con bajo versus alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia basal.

Dado que disponíamos del seguimiento de las pacientes, se valoró en aquellas pacientes que presentaron una recaída tumoral locorregional o a distancia. De los 32 casos analizados, 17 casos presentaron una recaída tumoral frente a los 15 casos que no presentaron recaída posterior. En rojo los casos que presentan una recaída tumoral y en azul los que no la presentan.

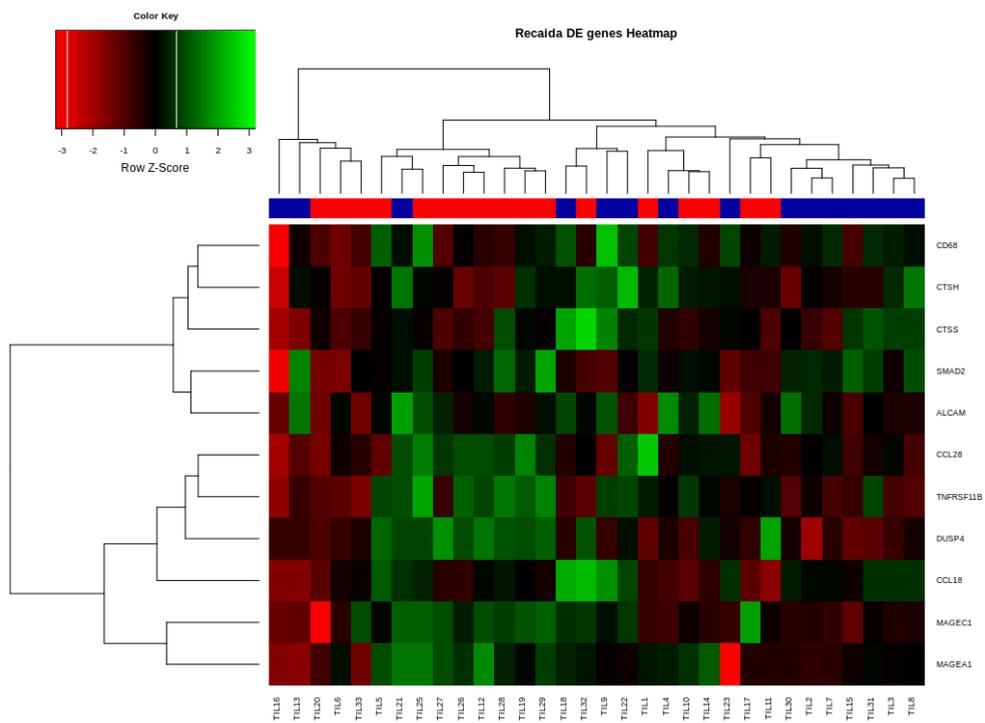


Figura 57 Heat map de los genes que mayor expresión diferencial presentaban entre los pacientes que presentan una recaída tumoral (n= 17) frente los casos que no la presentan (n=15).

Los 11 genes que destacan por expresarse diferencialmente de forma significativa entre ambos grupos (recaída tumoral frente no recaída) se recogen a continuación en la Tabla.

	baseMean	log2FoldCl	lfcSE	stat	pvalue	padj
MAGEC1	1652,983	1,496217	0,421349	3,551012	0,000384	0,065273
DUSP4	2556,975	1,405927	0,390063	3,604362	0,000313	0,065273
MAGEA1	796,4347	1,385939	0,423635	3,271537	0,00107	0,075188
TNFRSF11	3516,057	1,101594	0,315268	3,494148	0,000476	0,065273
CCL28	3435,8	0,918803	0,293108	3,134693	0,00172	0,085861
SMAD2	12270,69	-0,83762	0,260269	-3,21827	0,00129	0,075188
CTSS	10998,76	-0,9261	0,28838	-3,21139	0,001321	0,075188
CTSH	15501,48	-1,01171	0,260808	-3,87915	0,000105	0,057547
CD68	20278,16	-1,07267	0,322082	-3,33042	0,000867	0,075188
ALCAM	10668,58	-1,09553	0,336529	-3,25539	0,001132	0,075188
CCL18	5629,832	-1,37938	0,430922	-3,20099	0,00137	0,075188

Tabla 20 Lista de los genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes con recaída vs no recaída tumoral.

Los genes que se sobreexpresan en las pacientes que presentan posteriormente una recaída tumoral son MAGEC1, MAGEA1 (antígenos cáncer específicos y posibles dianas terapéuticas), DUSP4 (proteína dual específica de la fosfatasa 4, como regulador extracelular de la actividad de las kinasas), TNFRSF1 (receptor del factor de necrosis tumoral 1) y CCL28.

En la búsqueda de posibles dianas terapéuticas como PDL1 en el infiltrado linfocitario tumoral se ha valorado la expresión de las pacientes que no han presentado la respuesta completa patológica. Se objetiva en la siguiente figura que no hay diferencias de expresión entre las pacientes que presentarán una recaída tumoral posterior o no ($p=0.466$)

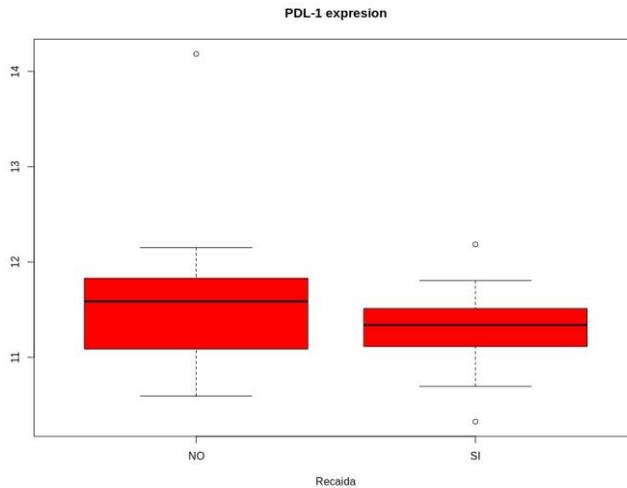


Figura 58 Boxplot de expresión diferencial en PDL1 en las pacientes que presentan una recaída tumoral y las que no la presentan.

4.6 Conclusiones de la segunda fase del estudio.

La conclusión principal de este trabajo es que el ensayo HTG EdgeSeq constituye un sistema con gran potencial para la determinación del perfil molecular de muestras de tumores de mama triple negativas incluidas en parafina (FFPE).

Existe una buena correlación de Pearson entre las muestras y sus duplicados con coeficientes de Pearson entre 0.84- 0.86, de forma que se apoya la robustez de los resultados obtenidos.

Con las muestras duplicadas en diferentes áreas determinadas por el Patólogo dentro de la misma muestra, se presentan una buena correlación en 6 de las 8 muestras con coeficiente de Pearson > 0.78 . Mientras que las dos restantes se

presenta un menor coeficiente de correlación de Pearson lo que apoya el concepto de heterogeneidad intratumoral.

Tras el análisis de expresión de los 549 inmunogenes en los 32 casos, se objetiva una expresión diferencial de 104 genes, que divide a las pacientes en dos clusters. El cluster 2 presentaba una mediana de supervivencia libre de evento de 75 meses frente a los 37 meses en el cluster 1 ($p=0.436$).

Al enfrentar los datos de expresión entre el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica frente a los de bajo infiltrado linfocitario tumoral se han identificado una expresión diferencial de 25 inmunogenes. Los genes que destacan por estar sobreexpresados en los pacientes con alto infiltrado linfocitario tumoral se relacionan con los linfocitos citotóxicos como CD8A, con células natural killer como KLRG1 o CD5 y la actividad citotóxica como los genes GZMA y DEFB. Así como genes relacionados con la función del linfocito B como CASP1, SLAMF6, y con quimoquinas como CCR4, CCR5, TNFSF14, CCL2, CCL5, CXCL6, CXCR6 o interleukinas como IL10RA, IL1, IL2RB, IL7R.

Análogamente, se han identificado 11 genes (MAGEA1, MAGEC1, DUSP4, TNFRS11, CCL28, SMAD2, CTSS, CTSH, CD68, ALCAM, CCL18) que se expresan de forma diferencial entre las pacientes con cáncer de mama triple negativo que presentan una recaída tumoral o siguen libres de eventos.

DISCUSIÓN

5 Discusión.

5.1 *Controversias en la definición del infiltrado linfocitario tumoral.*

En los estudios publicados la determinación de los niveles de infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama ha sido heterogénea como se ha recogido en la Tabla 2. Esto ha dificultado la interpretación y comparación de los resultados entre los diferentes estudios.

Hasta la publicación en 2015 de las recomendaciones según el Grupo de Trabajo Internacional en Infiltrado linfocitario tumoral no se ha seguido un abordaje estandarizado y uniforme. Gracias a estas recomendaciones, se ha podido simplificar su determinación para que sea reproducible y con una interpretación más objetiva. En éstas se detalla qué se ha de valorar, dónde debe localizarse y la justificación según los expertos (97).

En la determinación se debe considerar la presencia de la heterogeneidad intratumoral, por lo que se recomienda la valoración de toda la sección de la muestra disponible. Se realiza manualmente por un especialista en Anatomía Patológica mediante un análisis inmunohistopatológico con hematoxilina-eosina. No se recomienda el estudio del infiltrado linfocitario tumoral mediante *microarrays* de tejido (TMA), porque según refieren no es representativo. Es decir, no refleja la heterogeneidad del infiltrado linfocitario tumoral, tampoco se ha definido cuál es el diámetro a valorar ni el número de cilindros (*cores*) que se

requieren. Los estudios con TMA se han utilizado en varios estudios experimentales para determinar los subtipos celulares presentes en el infiltrado linfocitario, pero no presentan una metodología estandarizada (98) (91) (99).

Por otro lado, Nawas et al., propusieron el procesamiento de imágenes para la detección automatizada del infiltrado linfocitario tumoral para describir la heterogeneidad espacial del mismo (71). Sin embargo, en comparación con el procesamiento de imágenes para la detección automatizada, la determinación del infiltrado linfocitario tumoral manualmente según Salgado et al., presenta la ventaja de ser una técnica factible como parte del estudio anatomopatológico rutinario en la práctica diaria. Se considera un abordaje rápido, seguro, reproducible y no supone un sobrecoste económico.

Según las recomendaciones, en la valoración del infiltrado linfocitario tumoral se tienen en cuenta las células mononucleares linfoplasmocitarias. Sin embargo la localización para determinar el infiltrado linfocitario tumoral ha sido diferente en los estudios publicados. Algunos de ellos tenían en cuenta las células linfoplasmocitarias intratumorales (en contacto con células tumorales), otros los estromales o incluso ambos (100) (101).

Actualmente se recomienda la valoración del infiltrado linfocitario estromal, es decir, el área de estroma que está ocupado por linfocitos, ya que es un parámetro más reproducible que el infiltrado intratumoral como se ha indicado en la Figura 7. El infiltrado linfocitario intratumoral presenta desventajas ya que según la densidad de células tumorales y el patrón de crecimiento pueden afectar al conteo del infiltrado linfocitario tumoral.

Sin embargo, en los primeros estudios publicados hace diez años, como por ejemplo el publicado por Sheu et al., no se determinaba exactamente la localización del infiltrado linfocitario (74). En el estudio de Ladoire et al., evaluaron al menos 10 campos con un aumento de alta potencia (x 200) pero sin especificar la localización para evaluar la extensión del infiltrado linfocitario ya que se basaba en el sistema establecido por Black en 1965 (75).

Posteriormente Denkert et al., consideraron cuantificar de forma digitalizada mediante *Mscope slide explorer* los linfocitos tanto del estroma tumoral como los linfocitos intratumorales (77). Un abordaje parecido siguió el grupo de Loi et al., que también valoraron ambas localizaciones de infiltrado linfocitario tumoral pero manualmente determinándolo mediante un análisis histopatológico con hematoxilina-eosina (76). García-Martínez et al., valoró también ambas localizaciones (estromal e intratumoral) pero mediante un análisis morfométrico automatizado tras un escaneado a alta resolución de portas y un programa de análisis de imagen (102).

Ante la ausencia de un abordaje estandarizado, otros grupos como el liderado por Liu et al., decidieron valorar las diez áreas con mayor densidad de infiltrado linfocitario, 5 del lecho tumoral y 5 áreas periféricas (73). Mientras que Mahmoud et al., valoraban con un recuento manual el infiltrado linfocitario tumoral combinando tres zonas: intratumoral (nidios celulares), estromal a distancia (alejado >1 diámetro de célula tumoral) y estromal adyacente (dentro de un diámetro celular del tumor) (72).

La metodología de cuantificación mediante el porcentaje del infiltrado linfocitario tumoral estromal fue descrito originalmente en 2010 por Denkert et al. Sin

embargo posteriormente se actualizó la metodología, aunque estos abordajes alternativos utilizados previamente puede que no invaliden los resultados obtenidos. En estas recomendaciones actualizadas se ha especificado que se han de excluir las áreas artefactadas, áreas pequeñas con una densa infiltración de linfocitos (*hot spots*), las áreas con necrosis, el área de inflamación alrededor de la biopsia, zonas con regresión hialina o en las que hay presentes carcinoma ductal in situ o lobulillos normales de la mama (97).

En este trabajo el análisis de los niveles de infiltrado linfocitario tumoral ha sido valorado por un Médico de Anatomía Patológica especializado en cáncer de mama (F.G.) siguiendo el abordaje estandarizado. Inicialmente se seleccionaron las pacientes con muestra histológica suficiente tumoral pre y post-tratamiento. De las 181 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativas incluidas en la base de neoadyuvancia, 164 pacientes (90.6%) fueron seleccionadas porque tenían suficiente material disponibles como se ha visto en la Figura 6. Las muestras tumorales estaban fijadas en parafina, presentaban un grosor de 4-5micras y estaban teñidas con hematoxilina-eosina. Se valoró con un aumento microscópico de 40x para localizar el área tumoral y definir el estroma tumoral, el área fibrosa de estroma adyacente a las células tumorales como se objetivó en la Figura 7. Se valoró el porcentaje de estroma tumoral que estaba infiltrado por células inflamatorias mononucleares y se describió como una variable continua como se reflejó en la Figura 8.

En nuestra serie, de las 164 muestras valoradas, el 67.1% de las muestras obtenidas en la biopsia diagnóstica presentaron un infiltrado linfocitario tumoral entre 1-40% y el 32.9% de las muestras restantes, presentaron un infiltrado linfocitario tumoral entre 40-90% como se objetiva en la Figura 19. Es similar, comparado con otras

series, como la de Hida et al., donde el 88% de las muestras presentaban un infiltrado linfocitario tumoral entre 1% y 50% y el 12% restante >50% (103).

En este trabajo, a diferencia de los anteriores comentados, se sigue la metodología estandarizada recomendada por el Grupo de Trabajo Internacional de infiltrado linfocitario tumoral en cáncer de mama. Esto ofrece un punto de partida pragmático, mejorando la consistencia de la determinación del “grado inmunológico” tumoral mediante un abordaje reproducible.

5.2 *Controversias en la determinación del punto de corte del infiltrado linfocitario tumoral.*

El punto de corte para diferenciar los grupos de pacientes con alto o bajo infiltrado linfocitario tumoral ha sido variable en función del estudio, generando controversia a la hora de interpretar los resultados. Como vemos el punto de corte en algunos estudios no se define de forma clara y en otros estudios varía entre el 20% y 60%, como se ha reflejado en la Tabla 2.

Yamaguchi et al., por ejemplo definieron el infiltrado linfocitario tumoral y peritumoral entre ausente, débil (si se objetivan linfocitos ocasionales), moderado (si es intermedio) o denso (si el infiltrado se encuentra en márgenes y estroma), sin presentar un punto de corte claro (79).

Otros estudios como el de Ono et al., valoraban la proporción de área estromal con infiltrado linfocitario alrededor de los nidos celulares mediante un score de 0 a 3 considerando tres puntos de corte; <10%, entre 10-50% y >50%. Además,

consideraron un score de intensidad de 0-3 definiendo como ausencia, intensidad moderada o intensidad marcada. La suma de los dos scores comentados clasificaba al infiltrado linfocitario tumoral en bajo si el score era de 0-2 o alto infiltrado linfocitario entre 3-5 (78).

Posteriormente, otros trabajos determinaron sólo un punto de corte. Por ejemplo Loi et al., consideraron que el punto de corte para diferenciar entre alto infiltrado y bajo infiltrado linfocitario fuera de 50% (76). García-Martínez et al., estableció el punto de corte entre alto y bajo infiltrado linfocitario fuera de 20% (102). Y Denkert et al., fijaron el punto de corte en 60% para poder clasificar los tumores con alta y baja infiltración de linfocitos tumorales (77).

El punto de corte según las recomendaciones del Grupo de Trabajo Internacional liderado por Salgado et al., para diferenciar tumores con un alto y bajo infiltrado linfocitario tumoral no ha sido definido (97).

En nuestro estudio para determinar el punto de corte óptimo, se realizó una curva ROC para definir el punto más sensible y específico según la respuesta completa patológica y así clasificar en alto o bajo infiltrado linfocitario tumoral, siendo el punto de corte 40% ($p=0.001$). Por lo que 58 pacientes (35.4%) presentaron niveles altos de linfocitario tumoral, mientras que las 106 pacientes (64.6%) restantes presentaban niveles bajos de linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica como se ha reflejado en la Figura 25.

Comparado con los estudios publicados con una metodología diferente para la determinación del infiltrado linfocitario tumoral, se objetiva una distribución dispar. En otras series como por ejemplo la de Ono et al., 67 de las 97 muestras valoradas

(73%) presentaron un alto infiltrado linfocitario. Aunque para su clasificación valoraban la proporción de área estromal con score de 0 a 3 (según tres puntos de corte; <10%, entre 10-50% y >50%) y un score de intensidad de 0-3 (ausencia, intensidad moderada o intensidad marcada) y clasificaba al infiltrado linfocitario tumoral en bajo si el score era de 0-2 o alto infiltrado linfocitario entre 3-5 (78).

Sin embargo, si comparamos nuestros resultados con otros estudios que siguen las recomendaciones del grupo de Salgado et al., los resultados son similares y pocas muestras presentan un alto infiltrado linfocitario tumoral. Hida et al., definieron tres puntos de corte en lugar de dos puntos de corte justificando que era un método más rápido, práctico y simple para Anatomía Patológica (104). Siguiendo estas directrices, el 21% de las pacientes tenían un infiltrado <10%, el 67% entre 10-50% y el 12% >50% clasificando así a las pacientes en bajo, intermedio o alto infiltrado linfocitario tumoral, respectivamente (103). En nuestro trabajo tomando sus puntos de corte, el 56.7% de las pacientes tenían un infiltrado <10%, 11.6 % entre 10-50% y 31.7% >50%.

Definir el punto de corte según las recomendaciones del Grupo de Trabajo Internacional liderado por Salgado et al., para diferenciar tumores con un alto y bajo infiltrado linfocitario tumoral es prioritario porque presenta una implicación clínica (97).

5.3 Población incluida en el estudio y diferencias entre los dos grupos según el infiltrado linfocitario tumoral basal.

Desde el punto de vista metodológico, a pesar del pequeño tamaño muestral (n=164), la serie estudiada en este trabajo era muy homogénea en cuanto al subtipo tumoral, el tratamiento quimioterápico con intención neoadyuvante y la valoración de la respuesta.

Comparado con otros estudios con mayor tamaño muestral, en la mayoría se incluían varios subtipos tumorales en contexto de neoadyuvancia (77) (81). Si nos centramos en el cáncer de mama triple negativo tratado con quimioterapia neoadyuvante, el tamaño muestral en nuestra serie fue mayor que en la serie de Hida et al., o que en la serie de Ono et al. El estudio de Hida valoraba 48 pacientes con cáncer de mama triple negativas estadios I-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante (104). Mientras que el de Ono incluía 92 pacientes con cáncer de mama triple negativas estadios II-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante (78) .

Como se refleja en la Tabla 5, las pacientes incluidas en este estudio, en general tenían un perfil similar a nivel clínico y anatomopatológico a las incluidas en otras series en tratamiento neoadyuvante (103) (102) (78).

En cuanto al esquema recibido el 59% de las pacientes recibieron quimioterapia neoadyuvante con el esquema AC (Adriamicina $60\text{mg}/\text{m}^2$ –Ciclofosfamida $600\text{mg}/\text{m}^2$) cada 21 días x 4 ciclos seguido de Paclitaxel $80\text{mg}/\text{m}^2$ régimen semanal x 12ciclos. En el 20% de las pacientes tras las antraciclinas se utilizó Docetaxel trisemanal. Tan sólo en el 3% de las pacientes se administraron esquemas sin antraciclinas y el 5% de las pacientes recibieron esquemas sin taxanos. A partir de los resultados del ensayo Geparsixto, las pacientes asociaron Carboplatino al tratamiento con taxanos, pero dado que este estudio recoge pacientes desde 1998

a 2015, el número de pacientes con Carboplatino es sólo de 12 pacientes. Por lo que el esquema recibido en neoadyuvancia en este estudio concuerda con otras series (78) (103) (102).

Por otro lado, en cuanto al tipo de cirugía realizada; la tasa de cirugía conservadora fue del 50%, si bien se realizó ampliación de márgenes en el 5,4% de las pacientes consiguiendo en el 99% márgenes negativos. La tasa de cirugía conservadora es similar a los sólidos estudios publicados en neoadyuvancia. En éstos se aumenta la tasa de cirugías conservadoras en pacientes en los tumores operables de entrada pero no candidatas a cirugía conservadora al diagnóstico comparados con el tratamiento adyuvante (50). Rouzier et al., analizaron de forma retrospectiva a 594 pacientes con cáncer de mama T2-T3 incluyendo todos los subtipos tumorales tratados con quimioterapia neoadyuvante y el 48% de las pacientes fueron susceptible de cirugía conservadora tras el tratamiento (14). En la serie de García-Martínez et al., la tasa de cirugías conservadoras conseguida fue de 41% (102).

La tasa de respuestas completas patológicas que se alcanzó en este estudio fue de un 37.2%, definida como ypT0/ypTis ypN0. En concordancia con la literatura publicada, la presencia de carcinoma ductal in situ, no modifica significativamente los resultados en los análisis de respuesta completa patológica como factor pronóstico. Comparado con las series comentadas previamente y tras el tratamiento con antraciclinas y taxanos con intención neoadyuvante los resultados fueron similares: García-Martínez et al., presentaron una tasa de respuesta completas patológicas en cáncer de mama triple negativo del 27%, mientras que en el estudio de Ono et al., la tasa de respuestas completas patológicas fue de 32% y en el estudio de Rouzier et al., ascendió hasta el 45%. Por lo que estos datos son congruentes con los publicados, como se observa en Tabla 3.

Tras la clasificación de las pacientes en dos grupos según el punto de corte de 40% de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia, las características clínicas y anatomopatológicas entre el grupo con alto infiltrado linfocitario tumoral versus bajo infiltrado linfocitario tumoral los brazos estaban bien balanceados, como se refleja en la Tabla 9.

No hubo diferencias entre ambos grupos en cuanto a la distribución por edad de las pacientes ($p= 0.345$), estadio clínico al diagnóstico, ($p= 0.205$) tipo histológico ($p= 0.060$), presencia de componente de carcinoma in situ ($p= 0.486$), infiltración linfovascular asociada ($p=0.106$) ni en el ki67 ($p= 0.270$).

Sin embargo, se objetivó en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral una mayor proporción de carcinomas grado III en el 64% versus 34% en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral ($p= 0.005$). Los datos publicados respecto a la relación existente entre los niveles de infiltrado linfocitario tumoral y las características clínico-patológicas como el grado histológico son heterogéneos e incluso contradictorios entre los diferentes estudios. Hay estudios que sugieren que la presencia de afectación ganglionar a nivel axilar y el alto grado histológico se asocian con más frecuencia a altos niveles de infiltrado linfocitario tumoral (100). Mientras que otros estudios niegan la asociación entre el grado tumoral grado III y niveles altos de infiltrado linfocitario tumoral (105).

Entre ambos grupos de pacientes no hubo diferencias en el tipo de esquema recibido con intención neoadyuvante. La mayoría de los pacientes recibieron un esquema con antraciclinas y taxanos ($p= 0.570$) y tampoco diferencias en la asociación de Carboplatino semanal ($p= 0.660$).

Sin embargo, en cuanto al tipo de cirugía realizada tras la quimioterapia neoadyuvante, se objetivó en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral, una mayor tasa de cirugías conservadoras 67% versus 40% en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral ($p=0.001$). Este aumento en la tasa cirugías conservadoras en el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral se podría explicar por la mayor tasa de respuestas clínicas y radiológicas presentadas. Ya que al diagnóstico no se presentaron diferencias en la distribución del estadio clínico inicial entre los dos grupos ($p= 0.205$) como se refleja en Tabla 9.

En un metaanálisis con datos de 17 estudios, que incluían 12.968 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama y publicado por Yu et al., se demostró que el nivel de infiltrado linfocitario tumoral no se correlacionaba con las características clínicas ni anatomopatológicas del tumor. En éste se incluían estudios con infiltrado linfocitario estromal e intratumoral (105). Este hecho, sugiere que el tipo de respuesta inmune del microambiente tumoral no se explica por las características del tumor y apoyan el valor pronóstico y predictivo independiente del infiltrado linfocitario tumoral.

5.4 Factores predictivos de respuesta y pronóstico dependientes del microambiente tumoral.

La determinación del infiltrado linfocitario tumoral según las recomendaciones del Grupo de Trabajo Internacional en Infiltrado linfocitario tumoral (97) es un abordaje que puede fácilmente ser integrable en el estudio inmunohistoquímico rutinario del cáncer de mama. Y se convierte en un valor añadido como potencial marcador

predictivo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas y taxanos, así como un factor pronóstico.

El cáncer de mama en estadios II-III tratados con quimioterapia neoadyuvante es el escenario idóneo para estudiar los posible cambios y variaciones en los niveles de infiltrado linfocitario tumoral dado que disponemos de muestra histológica previa al tratamiento y posteriormente a la neoadyuvancia (52).

5.4.1 Factor predictivo de respuesta en el cáncer de mama triple negativo estadio II-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante.

La quimioterapia actúa principalmente por efecto citotóxico en las células tumorales, pero la muerte de las células tumorales también tiene la capacidad de aprovechar el sistema inmunitario del huésped para luchar contra su tumor (75). Los cambios en la respuesta inmune inducidos por la quimioterapia están parcialmente caracterizados. Hay una evidencia creciente de mecanismos de cooperación entre ambos, sin embargo los resultado de estos estudios son dispares (82) (106) (107).

Los niveles elevados de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica han demostrado ser un marcador predictivo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama triple negativo en otros estudios recogidos en la Tabla 3. Como se ha comentado previamente, en estos estudios no se ha seguido una metodología estandarizada para extrapolar los resultados, aunque siguiendo estos abordajes alternativos no se podrían invalidar los resultados obtenidos.

Una hipótesis que se ha planteado en la cooperación entre la respuesta inmune y los efectos de la quimioterapia neoadyuvante, es que podría ser mayor en aquellos tumores con niveles altos de infiltrado linfocitario tumoral basal. Y se podría explicar por mecanismos de liberación antigénica y de modulación inmune.

Hay publicaciones que apoyan esta hipótesis, como se demostró en un estudio retrospectivo con 1.058 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama e incluidas en los ensayos multicéntricos GeparDuo y GeparTrio. Las pacientes independientemente del subtipo de cáncer de mama se trataron con doxorubicina, ciclofosfamida y docetaxel o con doxorubicina, ciclofosfamida, docetaxel, vinorelbina y capecitabina, respectivamente. Las pacientes con niveles de infiltrado linfocitario tumoral estromal e intratumoral (>60%), presentaban tasas de respuestas completas patológicas 40% versus 7.2% que presentaban las pacientes con niveles bajos de infiltrado linfocitario tumoral (77).

Otro estudio en la misma línea, fue el de Ono et al., en el que se incluían 92 pacientes con cáncer de mama triples negativas estadios II-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas (adriamicina y ciclofosfamida o epirubicina, 5-fluoracilo y ciclofosfamida) seguido de taxanos (paclitaxel semanal o docetaxel trisemanal). Para la evaluación del infiltrado tumoral consideraron un score de proporción de estroma infiltrado con tres puntos de corte <10%, 10-50% y >50% y otro score de intensidad de infiltrado (0, 1, 2), siendo el sumatorio de ambos scores el que clasificaba en alto y bajo infiltrado linfocitario tumoral. Se confirmó que en el subgrupo con altos niveles de infiltrado linfocitario tumoral presentaban una tasa de respuesta completa patológica mayor que las pacientes con niveles bajos de infiltrado linfocitario tumoral (37% versus 16%). La tasa de

respuestas completas patológicas en el grupo triple negativo con alto infiltrado linfocitario ascendía a 47% si además presentaban marcadores de apoptosis.(78)

Hida et al., valoraron a 48 pacientes con cáncer de mama triple negativo estadios I-III en tratamiento neoadyuvante con antraclinas, taxanos o ambos de forma secuencial. En este estudio se siguieron las recomendaciones del grupo internacional liderado por Salgado, pero definieron tres puntos de corte <10%, 10-50% y >50%, clasificando a las pacientes en bajo, intermedio o alto infiltrado linfocitario tumoral, respectivamente. La tasa de respuestas completas patológicas fue del 17.6% en el grupo de bajo infiltrado linfocitario, 55% en el grupo de riesgo intermedio y 63.6% en el de alto infiltrado linfocitario tumoral (103).

En nuestra serie, las pacientes que presentaron un alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica (>40%) alcanzaron tasas de respuesta completa patológica tras quimioterapia neoadyuvante con antraciclina y taxanos de hasta 87% versus 9.4% en el grupo de bajo de infiltrado linfocitario tumoral como se refleja en la Tabla 10 y la Figura 28 ($p= 0.001$).

Se ha demostrado la interacción entre el infiltrado linfocitario tumoral y el beneficio de la asociación de carboplatino al esquema con antraciclina liposomal y taxanos en el contexto de la neoadyuvancia (108) (109). Sin embargo, en nuestro estudio no ha sido posible reproducirlo por el bajo número de pacientes que recibieron carboplatino ($n=12$) como se ha visto en la Figura 34.

Aunque hoy en día, la determinación del nivel de infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica no supone un cambio en la práctica clínica. En el cáncer de mama triple negativo estadios II-III, el bajo infiltrado linfocitario tumoral en la

biopsia basal no evita la indicación de la quimioterapia, entre otros motivos por las escasas alternativas terapéuticas en este escenario.

5.4.2 Valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama triple negativo.

Se ha sugerido la repercusión a nivel pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral basal en el cáncer de mama triple negativo (52). Existen estudios retrospectivos que evalúan a más de mil pacientes, y relacionan la presencia de infiltrado linfocitario tumoral basal con un buen pronóstico como se ha visto en la Tabla 3.

En el primer estudio que se demostró se revisaron 2.009 cáncer de mama con afectación ganglionar, de las cuales 256 pacientes que presentaban un cáncer de mama triple negativo, incluidas en el estudio BIG-02-98. Se objetivó que ante mayor infiltrado linfocitario tumoral, mejor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global independientemente de la quimioterapia recibida (76). Estos resultados se confirmaron independientemente, con 481 pacientes con cáncer de mama triple negativas tratadas en los ensayos fase III ECOG 2197 y 1199(90). De hecho, según Simon et al., se considera que el infiltrado linfocitario tumoral basal presenta un valor pronóstico con un nivel I de evidencia en el cáncer de mama triple negativo (92).

En nuestra serie tras la determinación del punto de corte, y clasificación en dos grupos se ha confirmado el valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica. Como se objetiva en la Figura 38, a los 72 meses (6 años), el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia basal presenta una recaída

en el 14.2% de las pacientes versus 42.1% de las pacientes en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia ($p=0.010$).

En el análisis univariante, las variables asociadas a un incremento del riesgo de recaída tumoral fueron las siguientes: el estadio clínico al diagnóstico (cTNM) III frente al estadio II con una HR 2.22 (IC 95% 1.51-4.21), el tamaño del tumor en la mama al diagnóstico >2 cm frente a <2 cm con una HR 1.76 (IC 95% 0.24-12.77), la afectación ganglionar al diagnóstico frente a su ausencia con una HR 2.50 (IC 95% 1.39-4.49), no conseguir una respuesta completa patológica frente a alcanzarla con una HR 2.89 (IC 95% 1.56-5.36), presentar un bajo infiltrado linfocitario tumoral basal en la biopsia frente a un alto infiltrado con una HR 3.44 (IC 95% 1.78-6.65), el descenso o no presentar cambios en el infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia y la pieza versus el aumento de infiltrado con una HR 4.01 (IC 95% 1.69-9.59), presentar enfermedad residual en la pieza quirúrgica estadio II-III frente a I HR 4.28 (IC 95% 1.91-9.59), el tamaño del tumor residual en la mama ypT >2 cm versus <2 cm HR 3.01 (IC 95% 1.66-5.44), la afectación ganglionar en la pieza quirúrgica ypN+ versus la ausencia de afectación ganglionar HR 3.66 (IC 95% 2.19-6.12) y presentar un bajo infiltrado linfocitario tumoral en la pieza frente a un alto infiltrado con una HR 4.27 (IC 95% 2.29-7.98) como se refleja en la Tabla 13.

En el análisis multivariante para la supervivencia libre de enfermedad conservaron su valor pronóstico independiente; la afectación ganglionar al diagnóstico (cN+) vs la no afectación HR 2.76 (IC 1.17-6.50), el tamaño residual en la pieza quirúrgica >2 cm (ypT2) versus <2 cm HR 2.84 (IC 1.52-5.30), y el descenso o la ausencia de cambio entre el infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia y la pieza quirúrgica frente al ascenso de infiltrado con una HR 2.94 (IC 1.10-8.67).

En otras series publicadas como la de Hida et al, los factores que se asociaban en el análisis univariante eran similares a nuestro estudio; la afectación ganglionar, el tamaño tumoral >2 cm, el bajo nivel de infiltración linfocitaria tumoral <10%, mediana de edad <50 años, grado histológico 3 e invasión linfovascular. Aunque en el análisis multivariante sólo el bajo nivel de infiltración linfocitaria tumoral <10% y la afectación ganglionar fueron estadísticamente significativos (103).

Recientemente Park et al., presentaron una comunicación oral en el Congreso de Inmunología de la Sociedad Europea de Oncología Médica, en la que valoraba 78 pacientes con cáncer de mama triple negativas estadio I que no recibieron tratamiento quimioterápico, y demostraron el valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza. El autor concluye que presentar un porcentaje de infiltrado linfocitario tumoral <10%, se correlaciona con un peor pronóstico, por lo que en este subgrupo de pacientes recomendaría la administración de quimioterapia adyuvante (97).

5.4.3 Valor del infiltrado linfocitario tumoral en la enfermedad residual en la pieza quirúrgica

Tras la quimioterapia neoadyuvante no conseguir una respuesta completa patológica en el cáncer de mama triple negativo, se correlaciona con un peor pronóstico comparado con el subtipo de cáncer de mama luminal. Sin embargo, algunas pacientes que no consiguen una respuesta completa patológica presentan una larga supervivencia, mientras que otras pacientes que sí consiguen una respuesta completa patológica presentan una recaída tumoral. De hecho, la simplificación de la respuesta patológica alcanzada en una variable dicotómica,

implica limitaciones como factor pronóstico (110). Por esta razón, se buscan nuevos biomarcadores que redefinan el riesgo de recaída (111).

El análisis del microambiente tumoral en el tumor residual, es un punto de partida para el estudio de la quimiorresistencia. Además es un marco para diseñar nuevas estrategias terapéuticas en las pacientes con cáncer de mama triple negativas. Según las recomendaciones del Grupo Internacional de Trabajo en infiltrado linfocitario tumoral liderado por Salgado et al., la heterogenidad intratumoral es menor cuando evaluamos la pieza quirúrgica en lugar de la biopsia diagnóstica (97).

A diferencia de otros subtipos de cáncer de mama, en el subtipo triple negativo el infiltrado linfocitario tumoral en la pieza residual ha demostrado un valor pronóstico. Antes de la publicación de las recomendaciones de Salgado et al, Dieci et al., publicaron un estudio con 278 pacientes con cáncer de mama triple negativas en el que demostró el valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral residual. Este valor se mantenía independientemente de los ciclos de quimioterapia neoadyuvante recibidos. La determinación del infiltrado linfocitario se realizó tanto a nivel intratumoral como estromal siguiendo la metodología de Denkert y el punto de corte en este estudio fue del 60%. En el estudio 27 pacientes (9.7%) fueron clasificados en el grupo de alto infiltrado y 251 pacientes (90.3%) en el grupo de bajo infiltrado linfocitario tumoral residual. La tasa de supervivencia libre de enfermedad a 5 años, fue del 91% en el grupo con alto infiltrado linfocitario tumoral residual y del 55% para el de bajo infiltrado linfocitario tumoral residual ($p=0.001$). En el análisis univariante y multivariante tanto el infiltrado estromal como el intratumoral en la pieza residual mantenían el valor pronóstico con HR 0.85 y HR 0.86, respectivamente. Sin embargo, una crítica que se hacen los mismos

autores es la heterogeneidad en los esquemas utilizados. Además hasta un 32% recibía también tratamiento adyuvante (112).

Posteriormente Hida et al., publicaron un estudio con 28 pacientes con cáncer de mama triple negativas con enfermedad residual, en el que se demostró que un alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica no presentaba ningún valor pronóstico. La determinación del infiltrado linfocitario fue sólo estromal según la metodología de Salgado. En este estudio se dividió en tres bloques; infiltración linfocitaria baja con punto de corte <10%, intermedio entre 10% -50% y niveles altos de infiltrado linfocitario considerado >50%. El grupo de bajo e intermedio infiltrado linfocitario tumoral presentó un peor pronóstico que el grupo de alto infiltrado tumoral en la pieza quirúrgica, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p= 0.24$). La explicación de los autores fue la falta de poder estadístico con sólo 28 pacientes y la ausencia de eventos en el grupo del alto infiltrado linfocitario tras una mediana de seguimiento de 45 meses (103).

En nuestro estudio, 103 pacientes de las 164 presentaron enfermedad residual tras la quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas y taxanos. En la pieza quirúrgica se analizó el infiltrado linfocitario tumoral residual y se objetivó que presentaba un valor pronóstico. A los 6 años, el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica presentaba una recaída tumoral del 23 % mientras que en el grupo de bajo infiltrado fue del 66.2% ($p=0.001$). El valor pronóstico independiente del infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica, se valoró en el análisis univariante como se ha reflejado en la Tabla 13. Las pacientes con niveles bajos de infiltrado linfocitario tumoral comparado con las que presentan niveles altos de infiltrado linfocitario tumoral en la pieza quirúrgica, presentan un mayor riesgo de recaída tumoral con una HR 4.27; IC95% 2.29-7.98 ($p=0.001$).

El análisis del infiltrado linfocitario tumoral en el carcinoma residual ha sido abordado sólo en unos pocos trabajos. Por lo que consideramos interesante en este trabajo, que se confirme el valor pronóstico que presenta el infiltrado linfocitario en la pieza residual.

El Grupo Internacional de Trabajo de infiltrado linfocitario en cáncer de mama trabaja para la integración del infiltrado linfocitario tumoral residual en la enfermedad residual tumoral (*residual cancer burden*). Y así conseguir un mejor indicador para estratificar el riesgo tras el tratamiento neoadyuvante, ya que podría identificar a un subgrupo de pacientes con excelente pronóstico, aunque no hayan conseguido una respuesta completa patológica completa (112). Del mismo modo, se puede identificar a un grupo de pacientes con bajo infiltrado tumoral residual y con alta carga tumoral en la pieza quirúrgica que serían candidatos a ensayos clínicos en adyuvancia con terapias alternativas a la quimioterapia.

5.4.4 Valor de los cambios de infiltrado linfocitario tumor entre la biopsia y la pieza.

En este trabajo se han identificado factores pronósticos en íntima relación con el microambiente tumoral. Estos factores son independientes de los factores predictivos y pronósticos clásicos dependientes del tumor. En aquellas pacientes que no consiguen una respuesta completa patológica, se ha valorado el cambio que se presenta antes y después de la quimioterapia neoadyuvante. Ya que el cambio infiltrado linfocitario tumoral entre el tumor basal y la enfermedad residual podría ofrecer información sobre la reacción del microambiente tumoral a la exposición a la quimioterapia (111).

El aumento del infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia diagnóstica y la pieza quirúrgica también identifica a pacientes que podría presentar un mejor pronóstico comparado con aquellos que disminuye o en los que no se presentan cambios. Es una hipótesis que apoya los mecanismos de cooperación entre la quimioterapia y el sistema inmune.

En nuestro estudio se valoró la correlación entre el infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica y en la pieza quirúrgica en las 103 pacientes que no conseguían respuesta completa patológica. Como se refleja en la Figura 24, se ha objetivado que existe una correlación entre ambas variables. En nuestro estudio, 50 pacientes (48.5%) no presentaron cambios, 26 pacientes (25.3%) el porcentaje de infiltrado linfocitario disminuía y en 27 pacientes (26.2%) aumentaba el infiltrado, como se refleja en la Figura 42.

El cambio del infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia diagnóstica y residual en la pieza quirúrgica también ha demostrado que presenta un valor pronóstico. A los 3 años, en el subgrupo que aumenta el infiltrado linfocitario tumoral se presenta una recaída del 4 % mientras que en el grupo baja el infiltrado linfocitario tumoral es del 39% y en el que no presenta cambios del 48% ($p=0.001$) como se objetiva en la Figura 45.

El valor pronóstico se confirmó en el análisis univariante y multivariante como se ha reflejado en la Tabla 13 y Tabla 14, respectivamente. Las pacientes que no presentan cambios o disminuye el infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia y la pieza quirúrgica comparado con las que aumenta el infiltrado linfocitario tumoral,

presentan un mayor riesgo de recaída tumoral con una HR 4.01; IC 95% 1.69-9.59 (p=0.002) en el análisis univariante. Este valor pronóstico se mantiene en el análisis multivariante, con una HR 2.94; IC 95% 1.10-8.67 (p=0.040).

Comparado con otras series como la de Hida et al., se objetivó que aquellas pacientes que presentaban una disminución del infiltrado linfocitario presentaba un mayor riesgo de recaída. Pero las diferencias no eran significativas por el pequeño tamaño muestral, ya que sólo se valoró el cambio en 26 pacientes con cáncer de mama triple negativas (103).

Dieci et al., valoraron en 19 casos con alto infiltrado linfocitario tumoral residual, los cambios presentados entre la biopsia y la pieza residual. En todos los casos menos uno se presentaba un aumento del infiltrado linfocitario. Los autores sugieren que quizá el descenso en el infiltrado linfocitario tumoral podría explicar por qué las pacientes con alto infiltrado linfocitario en la biopsia no responden a la quimioterapia neoadyuvante (112).

Precisamente lo que consideramos novedoso en este trabajo, es el valor pronóstico que presentan los cambios entre la biopsia diagnóstica y la pieza residual.

5.4.5 Firmas de inmunogenes en el cáncer de mama triple negativo frente al resto de subtipos moleculares en cáncer de mama.

Safonov et al., analizó la expresión de genes, el número de copias de ADN y las mutaciones somáticas y en línea germinal en la base de datos del cáncer de mama

del Atlas del Genoma Humano. Encontró que el cáncer de mama triple negativo presenta una alta expresión de inmunogenes y una menor heterogeneidad clonal que el resto de subtipos de cáncer de mama (113).

Estos resultados se confirmaron posteriormente en un estudio liderado por Liu et al., que valoró si la expresión de inmunogenes es diferente entre el cáncer de mama triple negativo y el resto de subtipos de cáncer de mama o el tejido de mama normal. Para ello, realizó un minucioso análisis de las firmas inmunogénicas basándose en la base de datos genómicos: TGCA y METABRIC (Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium) (114).

En el cáncer de mama triple negativo se demostró una mayor expresión de genes asociados a las células inmunes así como marcadores funcionales de éstas, en comparación a otros subtipos tumorales y el tejido mamario normal. Tras valorar la expresión de 10 genes marcadores del linfocito B (CD79A, CD79B, BTLA, BANK1, BLK, RALGPS2, FCRL1, FCRL3, HVCN1 y BACH) se demostró que 9 de ellos presentaban una expresión mayor en el cáncer de mama triple negativo que en el resto de subtipos de cáncer de mama. Entre los 7 genes relacionados con el linfocito T regulador CD4+, 5 de ellos (CTLA-4, IL32, FOXP3, C15orf53 y GPR15) también presentaban una alta expresión en el cáncer de mama triple negativo. Mientras que entre los genes relacionados con el linfocito T citotóxico CD8+, el gen CD8A presentó una elevada expresión en el cáncer de mama triple negativo. También se presentó una expresión mayor de los genes relacionados con las células *natural killer* (KLRF1 y KLRC1), genes relacionados con la actividad citotóxica (GZMA y PRF1), así como genes relacionados con macrófagos, con el complejo mayor de

histocompatibilidad tipo I, y la coestimulación/coinhibición de las células T en el cáncer de mama triple negativo. Por lo que los autores concluyen, que estos resultados sugieren que el cáncer de mama triple negativo presenta una actividad inmunogénica mayor que el resto de subtipos moleculares (114).

Otro dato que apoya esta hipótesis, es que además se demostró que el cáncer de mama triple negativo, se relacionaba con un mayor número de mutaciones somáticas, una mayor expresión en los genes HLA y de genes relacionados con antígenos cáncer específicos (como MAGEA, PRAME y NY-ESO-1). Estos resultados también sugieren una actividad inmunogénica mayor en el cáncer triple negativo comparado con otros subtipos de cáncer de mama y con el tejido mamario normal (114).

En cuanto a la relación con los genes implicados en el infiltrado linfocitario tumoral, 91 genes relacionados con los diferentes subpoblaciones de células inmunes, presentaban una expresión mayor en el cáncer de mama triple negativo. Pero en el estudio también se demostró que el tejido normal mamario presentaba una mayor expresión CD57 (marcador de las células *natural killer* activados) o IL3RA (marcador de las células dendríticas) que en el cáncer de mama independientemente del subtipo. Los autores refieren que esto sugiere la posibilidad del mecanismo de escape presente en el cáncer de mama (114).

Estas diferencias de expresión de genes relacionado con el infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama triple negativo frente a los diferentes subtipos de cáncer de mama o el tejido mamario normal, no se modificaban según el grado

histológico tumoral. Sin embargo, se objetivó que la mutación de TP53 se asociaba con una atenuación de la respuesta inmune, disminuyendo los niveles de infiltrado linfocitario tumoral, mediante la expresión de genes supresores como CTLA4, LAG3, IDO1/2, PD1, PDL1 y TIGIT así como de genes relacionados con los linfocitos T reguladores (114).

Según Liu et al., el cáncer de mama triple negativo presenta una mayor expresión de genes relacionados con la inflamación comparado con los otros subtipos tumorales o con el tejido mamario normal, como por ejemplo, los genes STAT1 (activador 1 de la señal de transcripción y transducción) y GZMB (granzima B) que se correlacionan con la actividad citotóxica. Según el grado histológico en el cáncer de mama triple también se presentan diferencias en la expresión de inmunogenes. En el cáncer de mama triple negativo de alto grado, se presenta una mayor expresión de genes relacionados con la inflamación comparado con el bajo grado histológico.

Por otro lado, también se valoró la parainflamación que se define como una baja reacción inflamatoria, que favorece a la carcinogénesis y a la progresión. Se ha descrito que los genes relacionados con la parainflamación presentan una expresión mayor en el cáncer de mama triple negativo comparado con otros subtipos moleculares y con el tejido mamario normal. Y aún es mayor la expresión dentro del cáncer de mama triple negativo si se presenta TP53 mutado. Por lo que se concluye, que la presencia de genes relacionados con la parainflamación y la mutación de TP53, contribuyen al desarrollo de metástasis en el cáncer de mama triple negativo (114).

Finalmente, se valora la asociación entre la actividad de los inmunogenes y la implicación en las vías de señalización. Las cinco vías de señalización valoradas fueron la vía del p53, MMR/BRCA1, PI3K/AKT, MAPK y RE. La implicación fue diferente entre el cáncer de mama triple negativo y el resto de subtipos moleculares. En el cáncer de mama triple negativo se presentó una alta tasa de mutaciones en las vías p53, MMR/BRCA1 mientras que en los subtipos no triple negativos presentaron mayores tasas de mutación en el resto de vías. La hiperactivación de las vías p53, PI3K/AKT y MAPK favorecía la actividad inmunogénica y por el contrario la hiperactivación de las vías de MMR/BRCA y RE, inhibía la actividad inmunogénica en el cáncer de mama. Estos resultados confirmaron los datos publicados previamente por otros autores (115) (116) (117).

5.5 Secuenciación de nueva generación de la enfermedad residual tras quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo.

Gracias a la labor de investigación llevada a cabo por grandes instituciones como el Atlas del Genoma Humano y colaboradoras, actualmente nuestro conocimiento a nivel molecular sobre el cáncer de mama triple negativo ha permitido mejorar en gran medida la comprensión de la biología subyacente a esta enfermedad tan compleja y heterogénea. La información genómica publicada por este tipo de instituciones y entidades ha permitido a la comunidad científica avanzar en el entendimiento de esta patología.

A pesar de ello, el cáncer de mama triple negativo continúa siendo un tumor con un comportamiento agresivo tal y como reflejan los altos ratios de mortalidad registrados, apuntando a la falta de tratamientos efectivos en este tipo de pacientes y dejando ver la necesidad de desarrollar nuevas terapias terapéuticas que aumenten los ratios de supervivencia.

En este sentido, la promesa de la inmunoterapia para el tratamiento de pacientes con cáncer de triple negativo ha aumentado considerablemente en los últimos años, tal y como reflejan numerosos ensayos clínicos. Las diferentes opciones de inmunoterapia han sido evaluados en este tipo de pacientes con resultados muy prometedores como agentes de tratamiento en combinación en el escenario neoadyuvante y adyuvante.

Dada la importancia de lo expuesto anteriormente a nivel clínico, en este trabajo se ha abordado la secuenciación de 549 inmunogenes en aquellas pacientes con enfermedad residual tras la quimioterapia neoadyuvante. Esta aproximación se ha basado en el uso de la tecnología genómica HTG Edge Seq, una herramienta con el potencial de determinar el perfil molecular de tumores mediante el análisis de muestras de tejido muy reducidas y con la capacidad de ser trasladado al ámbito clínico de forma efectiva y sin dificultades.

Inicialmente en nuestro estudio, se valoró la robustez de los datos obtenidos, realizando duplicados de las mismas muestras, y se demostró una buena correlación de Pearson entre las mismas como se objetiva en la figura 48.

5.5.1 Firmas de inmunogenes y la heterogeneidad tumoral en el cáncer de mama triple negativo.

Como se ha comentado previamente, el cáncer de mama triple negativo engloba a diferentes subtipos clínicos y moleculares distintos. Por lo que, la investigación se centra en entender mejor la heterogeneidad tumoral dentro de este subtipo (118).

En cuanto a los diferentes subtipos moleculares dentro del cáncer triple negativo según Lehmann, se han publicado estudios que valoran la expresión diferencial de inmunogenes. Lehmann et al., demostraron que la presencia de un alto infiltrado linfocitario tumoral se correlacionaba con el subtipo molecular inmunomodulador, caracterizado por la expresión genes que codifican antígenos inmunes y citoquinas. Sin embargo, posteriormente se ha sugerido que la presencia de la firma de inmunogenes podría ser un modificador de los otros subtipos moleculares, más que un subtipo por separado. En base a esto, se podría explicar que el subtipo de Lehmann BL1 se correlacione con una tasa de respuesta completas patológicas superior al subtipo BCL2 o LAR. De hecho, Harano et al., valoraron en 88 pacientes con cáncer de mama triple negativo, la expresión de inmunogenes según la clasificación según Lehmann. Los autores confirman esta hipótesis, ya que la expresión de la firma de inmunogenes fue diferente según el subtipo molecular ($P=0.00036$), siendo superior en el subtipo molecular BCL1 comparado con el resto de subtipos. Por lo que, la presencia de una firma inmunogénica se considera un modificador de los subtipos moleculares de Lehmann (119).

En nuestro estudio, se realizó una determinación del perfil inmunogénico en un set de 33 casos con el objetivo de determinar diferencias significativas en la expresión génica. Aunque tras la normalización de los datos, se excluyó por motivos estadísticos 1 caso, por lo que en el análisis disponíamos de 32 casos.

Inicialmente se valoró de forma exploratoria, en un análisis de componentes principales tridimensional entre los casos con alto y bajo infiltrado linfocitario tumoral, y no se objetivó una separación espacial completa. El agrupamiento podría no resultar ser exacto totalmente ya que podrían estar influyendo otra serie de factores.

Sin embargo, en el heat map de la Figura 56 correspondiente a los pacientes de alto y bajo infiltrado linfocitario en la biopsia diagnóstica, es posible observar una expresión diferencial en 25 de los 549 genes. Los genes diferencialmente expresados entre ambos grupos incluyen CCND1, APP, MSH6, MAP2K2, CASP1, CCR5, SLAMF6, TBX21, CCR4, IL10RA, CD52, TNFSF14, IL16 IL2RB, CD5, CCL2, CXCL6, CXCR6, ITGAL, GZMA, CCL5, KLRG1, CD8A IL7R y DEFB1 como se ha reflejado en la Tabla 19. De estos genes, sólo CCND1, APP, MSH6, MAP2K2 se caracterizan por estar infraexpresados en el grupo de alto infiltrado linfocitario. Mientras que el resto de los genes nombrados se encuentran sobreexpresados en el grupo de alto infiltrado linfocitario.

Los genes sobreexpresados en los pacientes con alto infiltrado linfocitario tumoral incluyen: genes relacionados con los linfocitos citotóxicos como CD8A, genes

relacionados con células *natural killer* como KLRG1 o CD5 y con la actividad citotóxica como los genes GZMA y DEFB. También se sobreexpresan genes relacionados con la función del linfocito B como CASP1, SLAMF6, genes relacionados la función del linfocito T como las interleukinas IL10RA, IL1, IL2RB, IL7R así como otros genes que se relacionan con el ciclo celular TBX21 y la adhesión como el gen TGAL.

Estos genes destacan por presentar un importante papel en la respuesta inmune mediada por células inmunológicas. En este sentido, coincidiendo con los datos publicados, en el cáncer de mama triple negativo se demostró una mayor expresión de genes asociados a las células inmunes así como marcadores funcionales de éstas, en comparación a otros subtipos tumorales y el tejido mamario normal. Se presentó una sobreexpresión en los genes relacionados con el linfocito T citotóxico CD8+, como el gen CD8A, los genes relacionados con las células natural killer (KLRF1 y KLRC1), genes relacionados con la actividad citotóxica (GZMA y PRF1) y genes marcadores del linfocito B (CD79A, CD79B, BTLA, BANK1, BLK, RALGPS2, FCRL1, FCRL3, HVCN1 y BACH) (114).

Por otro lado, los 4 genes que se encuentran sobreexpresados en el grupo de bajo infiltrado linfocitario son: CCND1 que se asocia al ciclo celular, el gen APP que se correlaciona con la función inmune y MSH6, MAP2K2 que se relacionan con la señalización celular.

Aunque se ha avanzado mucho en los últimos años en el conocimiento del subtipo de mama triple negativo, hay otras cuestiones que aún están por resolver, como por ejemplo, la asociación entre la presencia del infiltrado linfocitario tumoral y el cáncer de mama inflamatorio triple negativo. Hay estudios que apoyan la correlación entre el carcinoma inflamatorio con las vías de señalización de la inflamación, en las que están implicadas el NF- κ B, COX2, JAK/STAT, IL-6, interferón gamma y el factor de necrosis tumoral (120). Además en cuanto a la inflamación asociada al cáncer de mama, la expresión génica de STAT1, también se correlaciona con un mejor pronóstico en el cáncer de mama triple negativo (121).

Por otro lado, Harano et al., valoraron si la expresión de la firma de inmunogenes se correlacionaba con el cáncer de mama inflamatorio en 39 pacientes. Sólo 9 de las 39 pacientes (23%) presentaban una expresión de la firma de inmunogenes frente a las 30 pacientes (77%) que no lo presentaban ($p=0.350$). Según refieren los autores, debido a la limitación del tamaño muestral, no se presentó esta correlación. Pero sugieren que una explicación plausible, sería que en los fenotipos agresivos como el cáncer de mama inflamatorio triple negativo existen otros mecanismos no relacionados con la inmunidad, como una mayor presencia de células madre, que se modulan por vías de señalización como IL-6/STAT3, vía hedgehog, WNT o Notch (122).

5.5.2 Firmas de inmunogenes y su valor pronóstico en cáncer de mama triple negativo.

En el cáncer de mama localmente avanzado, se ha publicado en dos series independientes una correlación entre una firma de inmunogenes con un mejor pronóstico (77) (80). Se ha demostrado que la expresión de genes relacionados con las células inmunosupresoras como los linfocitos T reguladores CD4+ y los macrófagos asociados al tumor se asocian con un peor pronóstico, mientras que los genes relacionados con los linfocitos T citotóxicos CD8+ y los linfocitos B se relaciona con mejor pronóstico (118).

También en relación con el linfocito B, Rody et al., identificaron en 394 muestras con cáncer de mama triple negativo un subgrupo de pacientes con excelente pronóstico en base a la expresión génica. Determinan 16 genes relacionados con diferentes procesos biológicos y entre ellos, 5 genes se relacionan con el microambiente tumoral. Se identificaba un subgrupo (32% de las muestras) que presentaba un ratio con una elevada expresión de linfocitos B y baja de expresión de interleukina IL-8. Este ratio se correlacionaba con un mejor pronóstico y una supervivencia libre de enfermedad a cinco años del 83%. Estos datos apoyan que la expresión de genes relacionados con los linfocitos B se correlaciona con un mejor pronóstico. Mientras que la interleukina IL-8 se ha relacionado con un incremento de células madre después de la quimioterapia, lo que justificaría los resultados obtenidos (123). Por tanto, los autores sugieren que estos resultados podrían ser el punto de partida para crear un score pronóstico en base a las características clínicas

como la afectación ganglionar o el tamaño tumoral y características moleculares como la expresión de genes de interleukina IL-8 y linfocitos B por RT-PCR (124).

Todos estos resultados coinciden con nuestro estudio, ya que las pacientes con mejor pronóstico son aquellas con un alto infiltrado linfocitario tumoral y éstas sobreexpresan genes relacionados con los linfocitos citotóxicos como CD8A, y genes relacionados con la función del linfocito B como CASP1, SLAMF6.

En relación al linfocito T citotóxico, de Nardo et al., demuestran en un metaanálisis con 4000 casos de cáncer de mama, que la expresión génica de macrófagos CD68 y linfocitos T citotóxicos CD8 tenían un valor pronóstico. Un ratio entre una elevada expresión de CD68 y baja expresión de CD8 se asociaba a una disminución de la supervivencia global en el cáncer de mama triple negativo (125).

Por otro lado, Martínez-Canales et al., encontraron una correlación entre la expresión de una firma inmunogénica y el pronóstico en cáncer de mama triple negativo. En esta firma, se demostró que una elevada expresión de antígenos leucocitarios humanos HLA-C, HLA-F, HLA-G y el receptor inmune presente en las células *natural killer* como TIGIT, se asociaban con un aumento de la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (126).

Coincidiendo con estos resultados, en nuestro estudio entre los genes que destacan por estar sobreexpresados en los pacientes con alto infiltrado linfocitario tumoral y que por tanto presentan un mejor pronóstico, se incluyen genes relacionados con las células *natural killer* como KLRG1 o CD5.

Además en cuanto a la inflamación asociado al cáncer de mama, la expresión génica de STAT1 entre otros genes, también se correlaciona con un mejor pronóstico en el cáncer de mama triple negativo (120). En nuestro estudio, los genes ligados a la inflamación como CCR4, CCR5, TNFSF14, CCL2, CCL5, CXCL6 y CXCR se encontraron sobreexpresados en el subgrupo con alto infiltrado linfocitario tumoral, con mejor pronóstico.

Por lo que coincidiendo con Liu et al., la expresión de inmunogenes se correlaciona con un mejor pronóstico en el cáncer de mama triple negativo. Ejemplo de ellos es la expresión de los genes asociados a los centros de control inmune como CTLA4, IDO1, BTLA, PD1 y PDL1, la elevada expresión del gen del linfocito citotóxico CD8A, el gen relacionado con de las células *natural killer* KLRC1 o el gen CXCR5 como marcador de la respuesta inmune del linfocito T (114).

De hecho en nuestro estudio tras enfrentar los datos de expresión de los 32 casos se observa un patrón de expresión génica diferente clasificándolos en dos *clusters* como refleja la Figura 52. En la Tabla 18 se describen los 104 genes responsables de la expresión diferencial entre ambos *clusters*. Como se objetiva en la Figura 54 el *cluster* 2 (n=19) presentaba una mediana de supervivencia libre de evento de 75 meses versus 37 meses en el *cluster* 1 (n=13). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas como se ha reflejado en la Figura 41, aunque una posible explicación plausible sería el pequeño tamaño muestral (n=32).

Por otro lado, según la bibliografía, Weyden et al., identificaron 15 genes relacionados con la diseminación metastásica tumoral. En el estudio de Liu et al., se confirmó que el cáncer de mama triple negativo presentó una menor expresión de genes relacionados con la inhibición de los mecanismos de diseminación metastásica

tumoral (IRF1, RNF10, PI3KCG, IRF7, SLC9A3R2 y DPH6) y con una mayor expresión de los genes que favorecen la diseminación tumoral (114).

En nuestro estudio análogamente, también se valoró la expresión diferencial entre las pacientes que presentaron una recaída tumoral y las que no la presentaron, como se refleja en la Tabla 20. Los genes que destacan por estar expresados de forma diferencial entre las pacientes que presentan una recaída tumoral y las que no presentan recaída incluyen: MAGEA1, MAGEC1, DUSP4, TNFRS11, CCL28, SMAD2, CTSS, CTSH, CD68, ALCAM, CCL18 como se refleja en la Tabla 20.

En las pacientes que se mantienen libres de enfermedad, presentan sobreexpresión en genes relacionados con la señalización celular como SMAD2, genes relacionados con el proteosoma como CTSS, CTSH, genes relacionados con los macrófagos como CD68 y con la adhesión celular como el gen ALCAM. Mientras que en las pacientes que recaen se encuentran sobreexpresados genes relacionados con antígenos cáncer específicos como DUSP4, MAGEA1 o MAGEC1, genes relacionados con interleukinas como TNFRS11 o el gen relacionado con citoquinas CCL28.

En un estudio publicado por Balko et al., demostraron que la expresión de DUSP4 en la enfermedad residual tras el tratamiento neoadyuvante en las pacientes con cáncer de mama triple negativo se asocia a resistencia al tratamiento así como a índices de proliferación elevados y cortas supervivencia libre de enfermedad.

Otro de los genes sobreexpresados en las pacientes que presentan una recaída tumoral es el gen TNFRSF1A, que pertenece a una superfamilia de receptores para el factor de necrosis tumoral. Se ha descrito que TNFRSF1A puede activar NF-KappaB, mediar la apoptosis y regular la inflamación.

Los genes relacionados con antígenos cáncer-específicos MAGEA1 y MAGEC1, se asocian al cáncer de mama de alto grado y a una baja supervivencia libre de enfermedad en el cáncer de mama triple negativo. Los datos publicados demuestran que el cáncer de mama triple negativo comparado con otros subtipos tumorales o con el tejido mamario normal, se relacionaba con un mayor número de mutaciones somáticas, una mayor expresión en los genes HLA y de genes relacionados con antígenos cáncer específicos como MAGEA, PRAME y NY-ESO-1 (114).

Los antígenos cánceres específicos comentados previamente en las pacientes que presentan una recaída tumoral, podrían ser un objetivo potencial para la inmunoterapia y se han postulado como posibles dianas terapéuticas. Los resultados de este trabajo plantean la posibilidad de nuevas dianas terapéuticas inmunes, en aquellas pacientes que no alcanzan la respuesta completa patológica y que por tanto tiene un peor pronóstico y mayor riesgo de recaída tumoral, dado que hoy en día no está claro si el tratamiento con quimioterapia adyuvante adicional proporciona una ventaja añadida.

PERSPECTIVAS DE FUTURO.
IMPLICACIONES CLÍNICAS Y
TERAPÉUTICAS

6 Perspectivas de futuro. Implicaciones clínicas y terapéuticas.

En el cáncer de mama triple negativo, donde las opciones terapéuticas son escasas, la investigación se centra en entender mejor la heterogeneidad tumoral dentro de este subtipo, con el objetivo de identificar factores pronósticos (113).

Como previamente se ha comentado, hasta ahora los estudios sobre firmas génicas relacionadas con el sistema inmune en el cáncer de mama triple negativo han aportado resultados complementarios, pero sin duda presentan mayor relevancia clínica la identificación de posibles dianas terapéuticas.

Además dado el auge que está experimentando la lucha contra el cáncer por la vía inmunogénica, la evaluación de estos marcadores podría tener importantes implicaciones en la identificación de dianas moleculares útiles en la inmunoterapia contra el cáncer de mama triple negativo, dejando paso a nuevas y potenciales terapias.

6.1 *Alternativas terapéuticas en el cáncer de mama triple negativo: la inmunoterapia.*

La identificación en el cáncer de mama triple negativo de una elevada expresión de genes relacionados con el sistema inmune, sugiere que algunos pacientes podrían beneficiarse de inmunoterapia. Sin embargo, hoy en día están en desarrollo

biomarcadores predictivos de respuesta a la inmunoterapia en cáncer de mama triple negativo en el contexto de la neoadyuvancia y adyuvancia.

6.1.1 Dianas terapéuticas en cáncer de mama triple negativo.

Las potenciales dianas terapéuticas en el cáncer de mama triple negativo se basan en las alteraciones genéticas y epigenéticas que proporcionan antígenos asociados al tumor. Por lo que el sistema inmune podría diferenciar entre las células tumorales y las células normales del tejido mamario. Las dianas terapéuticas descritas según la expresión de antígenos relacionados con el tumor han sido NY-ESO-1 y MAGEA3 en el cáncer de mama triple negativo. Además ambas, se correlacionan con la expresión de linfocitos T citotóxicos CD8. Según Stagg et al., se han publicado estudios que valoran la eficacia de vacunas contra antígenos asociados al tumor como la expresión de MAGEA3, MUC-1 aberrante o NY-ESO-1 (113).

Otras dianas terapéuticas que se han valorado en estudios preclínicos han sido los correceptores CD137 y OX40 (CD134), que se expresan en los linfocitos T activados. Éstos promueven la expansión clonal de los linfocitos T citotóxicos CD8 y previenen la diferenciación de los linfocitos CD4 a los T reguladores inmunosupresores. Se han publicado estudios con anticuerpos monoclonales agonistas de estos dos correceptores, que han demostrado una disminución del crecimiento tumoral y del desarrollo de metástasis en modelos murinos de cáncer de mama (127) (128).

- Otras dianas como los centros de control inmune

En el cáncer de mama la expresión de marcadores de inmunosupresión incrementa con el infiltrado linfocitario tumoral. La presencia de éstos no indica que la inmunidad antitumoral sea inactiva y que se presente un peor pronóstico, sino más bien lo contrario (129).

En base a otros tumores, se conoce que estos centros de control inmune se pueden inhibir con anticuerpos monoclonales. El primer anticuerpo monoclonal descrito fue contra el antígeno 4 del linfocito T (CTLA-4). Posteriormente se describieron otros centros de control como la proteína 1 asociada la muerte celular y su ligando (PD-1 y PD-L1). La presencia de PDL-1 se asocia a un incremento de infiltrado linfocitario tumoral y un mejor pronóstico en cáncer de mama. En un estudio con 45 casos con cáncer de mama que presentaron un infiltrado linfocitario tumoral moderado, el 89% fueron PDL-1 positivos y el 24% PDL-1 negativos. Entre las pacientes con PDL-1 positivas, no hubo ninguna recaída tumoral a distancia mientras que el 15 % de las pacientes PDL-1 negativas presentaron una recaída tumoral (130).

La expresión de PDL-1 > 5% se ha relacionado con la infiltración de linfocitos T citotóxicos CD8 en cáncer de mama triple negativo (131). Los estudios sugieren que la expresión de PDL-1 es un marcador de un cáncer de mama inmunológicamente activo. Pero aunque el infiltrado linfocitario tumoral se asocia a un incremento del infiltrado de PDL-1, la correlación entre un incremento de infiltrado linfocitario tumoral y la respuesta al tratamiento que inhibe los centros de control inmunes aún no se ha establecido (132). De hecho en el contexto de la neoadyuvancia, se ha sugerido la acción sinérgica de la quimioterapia con la inmunoterapia para aumentar la tasa de respuesta completas patológicas. Se está valorando la adición de inmunoterapia como inhibidores del ligando del receptor de muerte celular al tratamiento quimioterápico estándar. En el ensayo clínico fase III NeoTRIPaPDL1 se valora en pacientes con cáncer de mama triple negativo estadios iniciales el

tratamiento con carboplatino y nab-paclitaxel con la adición o no de atezolizumab. Otro ejemplo es el ensayo clínico fase II GeparNuevo que compara el tratamiento con epirrubicina, ciclofosfamida seguida de nab-paclitaxel con o sin durvalumab. (133).

Otras dianas terapéuticas son la proteína 3 que contiene al dominio de mucina (TIM-3), el gen 3 de activación del linfocito (LAG-3) o la enzima indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO). TIM-3 es un inhibidor del receptor del linfocito T citotóxico CD8 y linfocitos T CD4, que actúa como un inhibidor del centro de control de la respuesta inmune (134). Mientras que IDO es una enzima inmunosupresora que se expresa en las células tumorales, las células *natural killer*, los macrófagos y células dendríticas que evita la expansión clonal de los linfocitos T (135). Aunque los estudios publicados sobre estas dianas terapéuticas aún se encuentran en fase preclínica.

Por otro lado, en el cáncer de mama triple negativo se ha descrito que las células tumorales expresan en su membrana CD73 y confiere un peor pronóstico. Los anticuerpos contra CD73 inhiben el crecimiento tumoral del cáncer de mama y las metástasis en modelos murinos. Se ha demostrado que la eficacia de las antraciclinas es menor en los tumores que expresan CD73, por lo que se ha sugerido que podría ser una diana terapéutica en cáncer de mama triple negativo (136).

También están en estudio las vías de señalización que contribuyen a la supresión del sistema inmune. En este sentido, en el cáncer de mama triple negativo con enfermedad residual tras la quimioterapia neoadyuvante, se ha descrito la correlación entre la actividad de la vía de señalización RAS/MAPK con un bajo infiltrado linfocitario tumoral. En base a estos datos, se ha valorado el efecto inmunosupresor de esta vía en líneas celulares con inhibidores de MEK, que

mostraban un incremento de la expresión de PDL-1 en las células tumorales. Por lo que la combinación de un inhibidor de MEK y un anticuerpo monoclonal contra PDL-1 produce un efecto sinérgico en modelos murinos con cáncer de mama triple negativo. Esta combinación de inmunoterapia y de tratamiento anti-diana se ha sugerido que podría ser útil para promover microambiente tumoral en pacientes con cáncer de mama triple negativo con enfermedad residual tras la quimioterapia neoadyuvante y un bajo infiltrado linfocitario tumoral (137).

Igualmente otro modulador del microambiente tumoral ha sido el fenotipo endotelial anérgico, que es capaz de eliminar a los linfocitos T citotóxicos CD8 antes de que infiltren el tumor mediante la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF, la interleukina IL-10 y la prostaglandina E2 (138). Este mecanismo podría limitar la infiltración de linfocitos en el cáncer de mama triple negativo, por lo que se ha valorado en modelos murinos el efecto del tratamiento antiangiogénico favoreciendo la infiltración del infiltrado linfocitario tumoral (139).

6.1.2 Diseño de ensayos clínicos en cáncer de mama triple negativo.

Un escenario idóneo para el diseño de ensayos clínicos podría ser el cáncer de mama triple negativo con enfermedad residual, ya que estas pacientes presentan un peor pronóstico y no disponen de alternativas terapéuticas en la práctica clínica diaria.

Además, dado que la enfermedad residual se compone de células tumorales resistente a la quimioterapia convencional, se podría realizar un estudio molecular para valorar posibles dianas terapéuticas alternativas. Eso podría suponer una

clasificación de las pacientes para proponer estrategias personalizadas con intención adyuvante (140).

Con todas estas posibles dianas terapéuticas comentadas previamente, Savas et al., proponen un posible algoritmo para el diseño de ensayos clínicos en el cáncer de mama triple negativo estadios II-III tras el tratamiento con quimioterapia neoadyuvante. La combinación del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia y la respuesta patológica alcanzada pueden estratificar en 4 grupos a estas pacientes (52).

En el primer grupo, las pacientes que presentan un alto infiltrado linfocitario tumoral y alcanzan una respuesta completa patológica, presentan en principio un excelente pronóstico, por lo cual serían subsidiarias al tratamiento estándar.

El segundo grupo son las pacientes que presentan un alto infiltrado linfocitario tumoral y no alcanzan una respuesta completa patológica. En estas pacientes se podría sugerir que el infiltrado linfocitario tumoral está presente pero es inefectivo. Una posible explicación podría ser el aumento de los mecanismos de regulación negativa, por la exposición crónica a antígenos. En estas pacientes se podría determinar la expresión de los inhibidores de los centros de control como PD-1/PDL-1, CTLA-4, TIM3, LAG3 así como inmunomoduladores como CD73 o IDO.

El tercer grupo lo formarían las pacientes que presentan un bajo infiltrado linfocitario tumoral y alcanzan una respuesta completa patológica. Este subgrupo que se podría beneficiar de tratamientos adyuvantes que promuevan la infiltración del infiltrado linfocitario tumoral el microambiente tumoral, como los antiangiogénicos o mediante la combinación sinérgica de un inhibidor de MEK y un anticuerpo monoclonal contra PDL-1, comentados previamente.

Y finalmente, el cuarto grupo serían las pacientes que presentan un bajo infiltrado linfocitario tumoral y no alcanzan una respuesta completa patológica, por lo que presentan un peor pronóstico. Estas pacientes podrían beneficiar según Savas et al., de estrategias con vacunas personalizadas.

Podemos concluir que la determinación del perfil molecular de muestras de cáncer de mama podría agrupar a las pacientes según patrones de expresión compartidos en base a la biología subyacente a su enfermedad, posibilitando el descubrimiento de nuevos biomarcadores asociados con el cáncer de mama triple negativo.

CONCLUSIONES

7 Conclusiones.

En esta serie se han analizado 164 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo estadio II-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante y se ha valorado el infiltrado linfocitario tumoral siguiendo las recomendaciones según el Grupo de trabajo Internacional en Infiltrado linfocitario tumoral.

Los resultados confirman el valor predictivo del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica en respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas y taxanos en cáncer de mama triple negativa.

Se confirma además el valor pronóstico del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica y en la pieza quirúrgica.

Existe una correlación entre el infiltrado tumoral linfocitario en la biopsia diagnóstica y en la pieza quirúrgica en las pacientes que no obtienen la respuesta completa patológica. Las pacientes que no presentan cambios o disminuye el infiltrado linfocitario tumoral entre la biopsia y la pieza quirúrgica comparado con las que aumenta el infiltrado linfocitario tumoral, presentan un mayor riesgo de recaída tumoral en el análisis univariante y multivariante.

Tras el análisis de expresión de los 549 inmunogenes en los 32 casos sin respuesta completa patológica se objetiva una expresión diferencial de 104 genes, que divide a las pacientes en dos clusters. El cluster 2 presentaba una mediana de supervivencia libre de evento de 75 meses frente a los 37 meses en el cluster 1. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Al enfrentar los datos de expresión entre el grupo de alto infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia diagnóstica frente a los de bajo infiltrado linfocitario tumoral se han identificado una expresión diferencial de 25 inmunogenes. Los genes que destacan por estar sobreexpresados en los pacientes con alto infiltrado linfocitario tumoral se relacionan con los linfocitos citotóxicos, células natural killer, linfocito B e interleukinas.

Análogamente, se han identificado 11 genes que se expresan de forma diferencial entre las pacientes con cáncer de mama triple negativo que presentan una recaída tumoral o siguen libres de eventos.

**ANEXO.
BECAS, PUBLICACIONES Y
PRESENTACIONES A
CONGRESOS**

8. Anexo: Becas, publicaciones y presentaciones a congresos.

- Becas recibidas para el desarrollo del Proyecto.

I Beca a Jóvenes Médicos para desarrollar el Proyecto de Investigación “Evaluación de los cambios en la respuesta linfocitaria en el microambiente tumoral como factor pronóstico y predictivo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante del cáncer de mama triple negativo estadio II-III.” convocada por la Fundación del Ilustre Colegio de Médicos de Valencia. Noviembre de 2015

Beca a Proyectos de Investigación Mutual Médica 2016 “Secuenciación de nueva generación de la enfermedad residual tras quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo estadios II-II” convocada por la Fundación Mutual Médica. Barcelona Noviembre 2016

- Contribuciones a congresos internacionales.

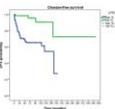
C. Herrero-Vicent, A Guerrero, J Gavilá, F Gozalbo, S Blanch, A Hernández, S Sandiego, A Calatrava, V. Guillem & A. Ruiz. Prognostic and predictive value of Tumor- Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Triple- Negative Breast Cancers treated with Neoadjuvant Chemotherapy (NAC).

Comunicación en poster en el Congreso de la Sociedad Europea de Oncología Médica, Copenhagen del 7-11 Octubre 2016.

Prognostic and predictive impact of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy.

C. Herrero-Vicent, J. Gozalbo, A. Calatrava, A. Hernández, S. Sandiego, M.A. Algarra, V. Guillem-Porta and A. Ruiz-Simón
Escuela Instituto Valenciano de Oncología, Valencia (Spain)



Background	Results	Conclusions
<ul style="list-style-type: none"> Triple-negative breast cancer (TNBC) treated with neoadjuvant chemotherapy (NAC) is the perfect setting to study possible changes in TILs since there are no histological changes after neoadjuvant treatment. NAC induces a pCR in approximately 30% of TNBC. TILs before NAC could act such as a surrogate marker for response to NAC. In patients lacking pCR, NAC needs a combination of chemotherapy-resistant tumors cells. TILs in residual carcinoma after NAC could help in assessing risk and stratifying adjuvant treatment. 	<ul style="list-style-type: none"> 164 TNBC patients treated with NAC and surgery. Main patients' characteristics are listed in Table 1. We identify different pathological complete response (pCR) to anthracycline and taxane-based NAC. LPBC subgroup: 51 from 58 patients (88%) pCR vs. Non-LPBC subgroup: 10 from 106 (9%) pCR, $p=0.001$. At a median follow-up of 78 months LPBC was associated with better DFS; the 3-year Kaplan-Meier estimates for DFS were 2% and 30% for patients with LPBC and non-LPBC, respectively, $p=0.01$. Univariate and multivariate analysis confirmed TIL to be an independent prognostic marker of DFS. 	<ul style="list-style-type: none"> This enabled the identification of different subgroups: LPBC with low high pCR response to NAC. This is a clinically relevant finding as TIL could be useful as adjustment factor in future clinical studies. In patients with non-pCR, new strategies should be considered to improve the outcome of TNBC patients, such as immuncheckpoint inhibitors in low TIL patients.
<p>Materials and Methods</p> <ul style="list-style-type: none"> Using our prospective maintained BC database we identified 164 TNBC patients treated with NAC between 1998 and 2015 with enough samples of diagnostic biopsy and after surgery. Evaluation of TILs before and after NAC was following a standardized methodology for visual assessment on haematoxylin-eosin (HE) sections and the amounts of TILs were quantitated in deciles. We categorised lymphocyte-predominant breast cancer (LPBC) cut-off according to a Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis. We categorized LPBC as the marking > 40% lymphocyte infiltration tumor stroma. The primary and point was predictive value of TILs to NAC and secondary end point was disease-free survival (DFS). DFS was analysed with Kaplan-Meier method and groups were compared with long-rank test. Univariate and multivariate Cox models were used to generate hazard ratios (HR) for determining associations between variables such as TIL after NAC and DFS. 	 	

Carmina Herrero-Vicent, carmenh@ivdoval.com

- Artículo en Revista Internacional.

Predictive and prognostic impact of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy.

C. Herrero-Vicent, F. Gozalbo, A. Guerrero-Zotano, J. Gavilá-Gregori, A. Hernández-Blanquisset, S. Sandiego-Contreras, A. Calatrava, V. Guillem-Porta and A. Ruiz-Simón. *ecancer*. 2017, 11:759

ecancermedalscience

Predictive and prognostic impact of tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy

Carmen Herrero-Vicent¹, Angel Guerrero¹, Joaquin Gavilá¹, Francisco Gozalbo¹, Abraham Hernández¹, Sergio Sandiego¹, Maria Asunción Algarra¹, Ana Calatrava², Vicente Guillem-Porta¹ and Amparo Ruiz-Simón¹

¹Medical Oncology Department, Valencian Institute of Oncology, 46008 Valencia, Spain

²Pathology Department, Valencian Institute of Oncology, 46008 Valencia, Spain

Correspondence to: C Herrero-Vicent. Email: carmendon@ivdoval.com

Abstract

Introduction: In locally and locally advanced triple-negative breast cancer (TNBC), neoadjuvant chemotherapy (NAC) only induces a pCR in 30–35% of patients. Clinical and pathological factors are not enough to distinguish the patients who have no chance of a pCR or not. The tumour microenvironment is critical for cancer and tumour-infiltrating lymphocytes (TIL). Moreover, the NAC scenario is the perfect setting to study possible changes in TIL levels.

Material and methods: Using our prospective maintained breast cancer (BC) database, we identified 164 TNBC patients treated with NAC between 1998 and 2015 with enough samples of diagnostic biopsy and after surgery. Evaluation of TILs before and after NAC followed a standardised methodology for visual assessment on haematoxylin-eosin sections and the amounts of TILs were quantitated in deciles. We categorised lymphocyte-predominant breast cancer cutoff according to a receiver operating characteristic (ROC) analysis. We categorised LPBC as involving > 40% lymphocytic infiltration tumour stroma. The primary end point was predictive value of TILs to NAC, and the secondary end point was disease-free survival (DFS). DFS was analysed with the Kaplan-Meier method and the groups were compared with a long-rank test. Univariate and multivariate Cox models were used to generate hazard ratios for determining associations between variables such as TIL after NAC and DFS.

Results: A total of 164 TNBC patients were treated with NAC and surgery. The main patients' characteristics are listed in Table 1. We identify different pathological complete response to anthracycline and taxane-based NAC; LPBC subgroup 51 from 58 patients (88%) pCR versus non-lymphocyte-predominant breast cancer (LPBC) subgroup 10 from 106 (9%) pCR, $p = 0.001$. At a median follow-up of 78 months, LPBC was associated with better DFS; the three-year Kaplan-Meier estimates for DFS were 2% and 30% for patients with LPBC and non-LPBC, respectively, $p = 0.01$. Univariate and multivariate analysis confirmed TIL to be an independent prognostic marker of DFS.

BIBLIOGRAFIA

9 Bibliografía.

1. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJL, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: A systematic analysis. *Lancet*. 2011;378(9801):1461–84.
2. SEOM LC del C en E 2018.,
http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_2016._ESP_2018.pdf. Acceso octubre 2018.
3. Clarke CA, Purdie DM, Glaser SL. Population attributable risk of breast cancer in white women associated with immediately modifiable risk factors. *BMC Cancer*. 2006;6.
4. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. Nature Publishing Group; 1995 Dec 28 [cited 2018 Oct 22];378(6559):789–92.
5. Osorio A, Barroso A, Martínez B, Cebrián A, San Román JM, Lobo F, et al. Molecular analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in 32 breast and/or ovarian cancer Spanish families. *Br J Cancer*. 2000;82(7):1266–70.
6. Puztai L. Current Status of Prognostic Profiling in Breast Cancer. *Oncologist*. 2008;13(4):350–60.
7. Prat, A. Cortés J. Perfiles de expresión génica en cáncer de mama. 2015. 91 p.
8. LLuch A, Martínez de Dueñas, E. Clasificación molecular del cancer de mama. *Cáncer de mama : Aspectos actuales*. 2012. p. 111–2.

9. Bernard PS, Parker JS, Mullins M, Cheung MCU, Leung S, Voduc D, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160–7.
10. Chung CH, Bernard PS, Perou CM. Molecular portraits and the family tree of cancer. *Nature Genetics*. 2002. p. 533–40.
11. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(14):8418–23.
12. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Smith L V., et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109(1):123–39.
13. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(19):10869–74.
14. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11(16):5678–85.
15. Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(18):10393–8.
16. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *JCO*. 2009;27(8):1160–7.

17. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer - Current status and future directions. *Annals of Oncology*. 2009. p. 1913–27.
18. Viale G, Bottiglieri L. Pathological definition of triple negative breast cancer. *Eur J Cancer*. 2009;45(1):5–10.
19. Ruibal A DB. El cáncer triple negativo. *Cáncer de mama: Aspectos de interés actual*. 2012. p. 156–9.
20. Oakman C, Viale G, Di Leo A. Management of triple negative breast cancer. *Breast*. 2010. p. 312–21.
21. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367–74.
22. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*. 2011. p. 5–23.
23. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1368–76.
24. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295(21):2492.
25. Koboldt D, RS F, MD M, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, JF M, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours TCGA Research Network *Nature* 2012 490 7418 61 70 10.1038/nature11412. *Nature*. 2012;490(7418).

26. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*. 2012;486(7403):395–9.
27. Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, Pendleton CS, Tang L, Johnson KC, et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res*. 2014;16(4).
28. Prat A, Adamo B, Cheang MCU, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist*. 2013;18(2):123–33.
29. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2750–67.
30. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada M V., Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157368.
31. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2013;19(19):5533–40.
32. Wang C, Pan B, Zhu H, Zhou Y, Mao F, Lin Y, et al. Prognostic value of androgen receptor in triple negative breast cancer: A meta-analysis. *Oncotarget* . 2016;7(29):46482–91.

33. Parker JS, Peterson AC, Tudor IC, Hoffman J, Uppal H. A novel biomarker to predict sensitivity to enzalutamide (ENZA) in TNBC. *J Clin Oncol*. 2015;33(15_suppl):1083.
34. Lachapelle J, Foulkes WD. Triple-negative and basal-like breast cancer: Implications for oncologists. *Current Oncology*. 2011;18(4):161–4.
35. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012;30(15):1796–804.
36. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007;13(8):2329–34.
37. Von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): A randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(7):747–56.
38. Alba E, Chacon JI, Lluch A, Garcia EL, Anton A, Cirauqui B, et al. Chemotherapy (CT) with or without carboplatin as neoadjuvant treatment in patients with basal-like breast cancer: GEICAM 2006-03 - A multicenter, randomized phase II study. *J Clin*. 2011;29(15): 1-15.
39. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: The CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*. 2014;384(9938):164–72.

40. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, von Minckwitz G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *The Lancet*. 2017. p. 2430–42.
41. Toi M, Lee S-J, Lee ES, Ohtani S, Im Y-H, Im S-A, et al. Abstract S1-07: A phase III trial of adjuvant capecitabine in breast cancer patients with HER2-negative pathologic residual invasive disease after neoadjuvant chemotherapy (CREATE-X, JBCRG-04). *Cancer Res*. 2016;76(4):S1-07.
42. Colleoni M, Gray KP, Gelber S, Láng I, Thürlimann B, Gianni L, et al. Low-dose oral cyclophosphamide and methotrexate maintenance for hormone receptor-negative early breast cancer: International Breast Cancer Study Group Trial 22-00. *J Clin Oncol*. 2016;34(28):3400–8.
43. Marquard AM, Eklund AC, Joshi T, Krzystanek M, Favero F, Wang ZC, et al. Pan-cancer analysis of genomic scar signatures associated with homologous recombination deficiency suggests novel indications for existing cancer drugs. *Biomark Res*. 2015;3(1):9.
44. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy, and Lumpectomy plus Irradiation for the Treatment of Invasive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(16):1233–41.
45. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman K V., Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: A randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2011;305(6):569–75.
46. Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L, Moliterni A, Terenziani M, et al.

Primary chemotherapy in operable breast cancer: Eight-year experience at the Milan Cancer Institute. *J Clin Oncol*. 1998;16(1):93–100.

47. Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Hortobagyi G. Inflammatory breast cancer: A review. *Journal of Clinical Oncology*. 1992. p. 1014–24.
48. Chollet P, Charrier S, Brain E, Curé H, Van Praagh I, Feillel V, et al. Clinical and pathological response to primary chemotherapy in operable breast cancer. *Eur J Cancer Part A*. 1997;33(6):862–6.
49. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JPA. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: A meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(3):188–94.
50. Chen Y, Shi XE, Tian JH, Yang XJ, Wang YF, Yang KH. Survival benefit of neoadjuvant chemotherapy for resectable breast cancer. *Medicine (United States)*. 2018;32(4):345-9.
51. Bear HD, Anderson S, Brown A, Smith R, Mamounas EP, Fisher B, et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: Preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol*. 2003;21(22):4165–74.
52. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: From TILs to the clinic. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2016. p. 228–41.
53. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and

axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1999;17(2):460–9.

54. Scholl SM, Pierga JY, Asselain B, Beuzeboc P, Dorval T, Garcia-Giralt E, et al. Breast tumour response to primary chemotherapy predicts local and distant control as well as survival. *Eur J Cancer.* 1995;31(12):1969–75.
55. Mazouni C, Peintinger F, Wan-Kau S, Andre F, Gonzalez-Angulo AM, Symmans WF, et al. Residual ductal carcinoma in situ in patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome. *J Clin Oncol.* 2007;25(19):2650–5.
56. Ogston KN, Miller ID, Payne S, Hutcheon AW, Sarkar TK, Smith I, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: Prognostic significance and survival. *Breast.* 2003;12(5):320–7.
57. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2007;25(28):4414–22.
58. Esserman LJ, Berry DA, Cheang MCU, Yau C, Perou CM, Carey L, et al. Chemotherapy response and recurrence-free survival in Neoadjuvant breast cancer depends on biomarker profiles: Results from the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657). *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(3):1049–62.
59. Andre F, Berrada N, Desmedt C. Implication of tumor microenvironment in the resistance to chemotherapy in breast cancer patients. *Current Opinion in Oncology.* 2010. p. 547–51.
60. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011.

p. 646–74.

61. de la Cruz-Merino L, Grande-Pulido E, Albero-Tamarit A, Codes-Manuel de Villena ME. Cancer and immune response: old and new evidence for future challenges. *Oncologist*. 2008;13:1246–54.
62. Tuaille E, Valea D, Becquart P, Al Tabaa Y, Meda N, Bollore K, et al. Human Milk-Derived B Cells: A Highly Activated Switched Memory Cell Population Primed to Secrete Antibodies. *J Immunol*. 2009;182(11):7155–62.
63. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011. p. 1565–70.
64. Wang Y, Waters J, Leung ML, Unruh A, Roh W, Shi X, et al. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature*. 2014;512(7513):155–60.
65. Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Current Opinion in Immunology*. 2007. p. 203–8.
66. Marsigliante S, Biscozzo L, Marra A, Nicolardi G, Leo G, Lobreglio GB, et al. Computerised counting of tumour infiltrating lymphocytes in 90 breast cancer specimens. *Cancer Lett*. 1999;139(1):33–41.
67. Chin Y, Janseens J, Vandepitte J, Vandenbrande J, Opdebeek L, Raus J. Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from human breast cancer. *Anticancer Res*. 1992;12(5):1463–6.
68. Degnim AC, Brahmabhatt RD, Radisky DC, Hoskin TL, Stallings-Mann M, Laudenschlager M, et al. Immune cell quantitation in normal breast tissue lobules

- with and without lobulitis. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;144(3):539–49.
69. Gouon-Evans V, Rothenberg ME, Pollard JW. Postnatal mammary gland development requires macrophages and eosinophils. *Development.* 2000;127(11):2269–82.
70. Willard-Gallo K, Buisseret L, Garaud S, Gu-Trantien C, de Wind A, Duquenne S, et al. Abstract PD1-3: The significance of tumor infiltrating lymphocyte density, subset composition and organization in breast cancer. *Cancer Res.* 2015;75(9):PD1-3-PD1-3.
71. Nawaz S, Heindl A, Koelble K, Yuan Y. Beyond immune density: Critical role of spatial heterogeneity in estrogen receptor-negative breast cancer. *Mod Pathol.* 2015;28(6):766–77.
72. Mahmoud SMA, Lee AHS, Paish EC, MacMillan RD, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(2):545–53.
73. Liu F, Lang R, Zhao J, Zhang X, Pringle GA, Fan Y, et al. CD8+cytotoxic T cell and FOXP3+regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(2):645–55.
74. Sheu BC, Kuo WH, Chen RJ, Huang SC, Chang KJ, Chow SN. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in neoplastic progression and lymph node metastasis of human breast cancer. *Breast.* 2008;17(6):604–10.
75. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating Foxp3+regulatory T cells.

Clin Cancer Res. 2008;14(8):2413–20.

76. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol*. 2013;31(7):860–7.
77. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(1):105–13.
78. Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132(3):793–805.
79. Yamaguchi R, Tanaka M, Yano A, Tse GM, Yamaguchi M, Koura K, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Hum Pathol*. 2012;43(10):1688–94.
80. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AHS, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1949–55.
81. Denkert C, Von Minckwitz G, Brase JC, Sinn B V., Gade S, Kronenwett R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol*. 2015;33(9):983–91.

82. Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, Yee HT, Oratz R, Formenti SC, et al. Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2001;7(10):3025–30.
83. Loi S. Host antitumor immunity plays a role in the survival of patients with newly diagnosed triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2014. p. 2935–7.
84. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2014;26:259–71.
85. Marchingo JM, Kan A, Sutherland RM, Duffy KR, Wellard CJ, Belz GT, et al. Antigen affinity, costimulation, and cytokine inputs sum linearly to amplify T cell expansion. *Science (80-).* 2014;346(6213):1123–7.
86. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Reviews Immunology.* 2008. p. 59–73.
87. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res.* 2011;71(14):4809–20.
88. Clarke C, Smyth MJ. Calreticulin exposure increases cancer immunogenicity. *Nature Biotechnology.* 2007. p. 192–3.
89. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007;13(9):1050–9.

90. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):2959–66.
91. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1536–43.
92. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009. p. 1446–52.
93. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S et al. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*. 2013;123:273–92.
94. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*. 2000;46(8 II):1221–9.
95. Stack EC, Wang C, Roman KA, Hoyt CC. Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: A review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods*. 2014;70(1):46–58.
96. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*. 2015;160(1–2):48–61.
97. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer:

Recommendations by an International TILS Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26(2):259–71.

98. Liu S, Foulkes WD, Leung S, Gao D, Lau S, Kos Z, et al. Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res.* 2014;16(5).
99. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased tils and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20(10):2773–82.
100. Ménard S, Tomasic G, Casalini P, Balsari A, Pilotti S, Cascinelli N, et al. Lymphoid infiltration as a prognostic variable for early-onset breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 1997;3(5):817–9.
101. Lee AHS, Gillett CE, Ryder K, Fentiman IS, Miles DW, Millis RR. Different patterns of inflammation and prognosis in invasive carcinoma of the breast. *Histopathology.* 2006;48(6):692–701.
102. Garcia-Martinez E, Luengo-Gil G, Chaves A, Velazquez L, Gonzalez-Billalabeitia E, Vicente-Conesa MA, et al. Predictive value of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) for response to breast cancer neoadjuvant chemotherapy (NCT). *J Clin Oncol.* 2013;31(15):68.
103. Hida AI, Sagara Y, Yotsumoto D, Kanemitsu S, Kawano J, Baba S, et al. Prognostic and predictive impacts of tumor-infiltrating lymphocytes differ between Triple-negative and HER2-positive breast cancers treated with standard systemic therapies. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;158(1).

104. Hida AI, Ohi Y. Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer; proposal of a simpler method. *Annals of Oncology*. 2015. p. 2351.
105. Yu X, Zhang Z, Wang Z, Wu P, Qiu F, Huang J. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Transl Oncol*. 2016;18(5):497–506.
106. West NR, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2011;13(6).
107. Hornychova H, Melichar B, Tomšova M, Mergancová J, Urminská H, Ryška A. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer Invest*. 2008;26(10):1024–31.
108. Denkert C. Increased tumor-associated lymphocytes predict benefit from addition of carboplatin to neoadjuvant therapy for triple-negative and HER2-positive early breast cancer in the GeparSixto trial (GBG 66). *Sabcs*. 2013;S1-06.
109. Vinayak S, Gray RJ, Adams S, Jensen KC, Manola J, Afghahi A, et al. Association of increased tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) with immunomodulatory (IM) triple-negative breast cancer (TNBC) subtype and response to neoadjuvant platinum-based therapy in PrECOG0105. *J Clin Oncol*. 2014;32(15_suppl):1000.
110. Symmans WF, Wei C, Gould R, Yu X, Zhang Y, Liu M, et al. Long-term prognostic risk after neoadjuvant chemotherapy associated with residual cancer burden and breast cancer subtype. *J Clin Oncol*. 2017; 13(2).
111. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer,

including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Bre. *Seminars in Cancer Biology*. 2018;18(5):497-506.

112. Dieci M V., Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: A retrospective multicenter study. *Ann Oncol*. 2014;25(3):611–8.
113. Safonov, A., Jiang, T., Bianchini, G., Gyorffy, B., Karn, T., Hatzis, C., & Pusztai, L. Immune gene expression is associated with genomic aberrations in breast cancer. *Cancer Research*. 2017; 77(12), 3317–3324.
114. Liu, Z., Li, M., Jiang, Z., & Wang, X. A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-Negative Breast Cancer. *Translational Oncology*. 2018;24(2):522-9.
115. Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., ... Diaz, L. A.. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2015;(5):12-22.
116. Guo, G., Yu, M., Xiao, W., Celis, E., & Cui, Y. Local activation of p53 in the tumor microenvironment overcomes immune suppression and enhances antitumor immunity. *Cancer Research*. 2017;(1):54–67.
117. Svoronos, N., Perales-Puchalt, A., Allegrezza, M. J., Rutkowski, M. R., Payne, K. K., Tesone, A. J., Conejo-Garcia, J. R.. Tumor cell-independent estrogen signaling drives disease progression through mobilization of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Discovery*. 2017;(5):64–69.

118. Stagg, J., & Allard, B. Immunotherapeutic approaches in triple-negative breast cancer: Latest research and clinical prospects. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2013;(4):361–70.
119. Lehmann, B. D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. V., Johnson, K. N., Shyr, Y., ... Pietenpol, J. A. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One*. 2016. 11(6), e0157368.
120. Ignatiadis, M., Singhal, S. K., Desmedt, C., Haibe-Kains, B., Criscitiello, C., Andre, F., Sotiriou, C. Gene modules and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes: A pooled analysis. *Journal of Clinical Oncology*. 2012. 30(16), 1996–2004.
121. Fouad TM, Kogawa T, Reuben JM, Ueno NT. The role of inflammation in inflammatory breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2014;816:53–73.
122. Harano K, Wang Y, Lim B, Seitz RS, Morris SW, Bailey DB, et al. Rates of immune cell infiltration in patients with triple-negative breast cancer by molecular subtype. *PLoS One*. 2018;13(10).
123. Liu S, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *Journal of Clinical Oncology*. 2010. p. 4006–12.
124. Rody A, Karn T, Liedtke C, Pusztai L, Ruckhaeberle E, Hanker L, et al. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2011;13(5).
125. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates

- response to chemotherapy. *Cancer Discov.* 2011;1(1):54–67.
126. Martínez-Canales S, Cifuentes F, De Rodas Gregorio ML, Serrano-Oviedo L, Galan-Moya EM, Amir E, et al. Transcriptomic immunologic signature associated with favorable clinical outcome in basal-like breast tumors. *PLoS One.* 2017;12(5).
 127. Kohrt HE, Houot R, Weiskopf K, Goldstein MJ, Scheeren F, Czerwinski D, et al. Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. *J Clin Invest.* 2012;122(3):1066–75.
 128. Garrison K, Hahn T, Lee WC, Ling LE, Weinberg AD, Akporiaye ET. The small molecule TGF- β signaling inhibitor SM16 synergizes with agonistic OX40 antibody to suppress established mammary tumors and reduce spontaneous metastasis. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(4):511–21.
 129. Schalper K.A. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased tils and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2014;20(10):2773–82.
 130. Cimino-Mathews A, Thompson E, Taube JM, Ye X, Lu Y, Meeker A, et al. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Hum Pathol.* 2016; 47(1):52–63.
 131. Mittendorf EA, Philips A V., Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, et al. PD-L1 Expression in Triple Negative Breast Can. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(4):361–70.
 132. Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, Nixon C, et al. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to

- Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2015;3(4):326–32.
133. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, Minckwitz G Von. Breast cancer 3 Molecular alterations in triple-negative breast cancer. *Lancet*. 2016;6736(16):1–13.
 134. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* [Internet]. 2010;207(10):2187–94.
 135. Mellor AL, Keskin DB, Johnson T, Chandler P, Munn DH. Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibit T Cell Responses. *J Immunol*. 2002;168(8):3771–6.
 136. Buisseret L, Pommey S, Allard B, Garaud S, Bergeron M, Cousineau I, et al. Clinical significance of CD73 in triple-negative breast cancer: Multiplex analysis of a phase III clinical trial. *Ann Oncol*. 2018;29(4):1056–62.
 137. Loi S, Dushyanthen S, Beavis PA, Salgado R, Denkert C, Savas P, et al. RAS/MAPK activation is associated with reduced tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: Therapeutic cooperation between MEK and PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2016;22(6):1499–509.
 138. Motz GT, Santoro SP, Wang LP, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat Med*. 2014;20(6):607–15.
 139. Shrimali RK, Yu Z, Theoret MR, Chinnasamy D, Restifo NP, Rosenberg SA. Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res*.

2010;70(15):6171–80.

140. Balko JM, Giltane JM, Wang K, Schwarz LJ, Young CD, Cook RS, et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov.* 2014;4(2):232–45.