







ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Integración y modulación de señales en biomedicina

**NUEVOS FACTORES PRONÓSTICOS Y  
PREDICTORES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO  
NEOADYUVANTE EN CÁNCER DE MAMA**

ESTUDIO DEL PAPEL DEL SISTEMA INMUNE CON  
BIOMARCADORES LOCALES Y SISTÉMICOS

**ESMERALDA GARCÍA TORRALBA**  
**DNI: 48636700-A**

**DIRECTOR Y TUTOR: FRANCISCO AYALA DE LA PEÑA**  
**CO-DIRECTOR: MARÍA ELENA GARCÍA MARTÍNEZ**



## Directores

Dr. Francisco de Asís Ayala de la Peña

Jefe de Sección de Oncología Médica. Servicio de Hematología y Oncología Médica.  
Hospital Universitario Morales Meseguer

Doctor en Medicina y Cirugía. Universidad de Medicina de Murcia

Profesor Titular de Oncología Médica. Departamento de Medicina, Facultad de Medicina  
de Murcia

Dra. María Elena García Martínez

Facultativo Sanitario Especialista en Oncología Médica. Hospital Universitario Morales  
Meseguer

Doctora en Medicina y Cirugía. Universidad de Medicina de Murcia

Profesor Asociado Universidad Católica San Antonio de Murcia

Profesor Colaborador Departamento de Medicina, Facultad de Medicina de Murcia



## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores, los Dres. Elena García-Martínez y Francisco Ayala de la Peña, por su paciencia y apoyo diario, y por ser un ejemplo a seguir.

Al equipo de investigación de la Unidad de Cáncer de Mama del Hospital Morales Meseguer, con especial mención al Dr. Miguel Pérez, del Servicio de Anatomía Patológica. Sin su colaboración, este trabajo no habría sido posible.

Al resto de mis compañeros del servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Universitario Morales Meseguer.

A mi familia, por su apoyo, cariño y por entenderlo todo, incondicionalmente.

Y, por último, a los pacientes y sus familiares, razón fundamental de este trabajo, y motor que nos hace seguir adelante.



# ÍNDICE

---

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>1.1. CÁNCER DE MAMA .....</b>	<b>24</b>
1.1.1. Epidemiología y factores de riesgo .....	24
1.1.2. Clasificación del cáncer de mama.....	25
1.1.2.1. Clasificación histológica .....	25
1.1.2.2. Clasificación molecular .....	26
1.1.3. Estadificación .....	28
1.1.4. Factores pronósticos clásicos .....	29
1.1.5. Tratamiento del cáncer de mama precoz .....	30
1.1.5.1. <i>Enfoque general del tratamiento del cáncer de mama precoz .....</i>	<b>30</b>
1.1.5.2. <i>Tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama .....</i>	<b>32</b>
1.1.5.2.1. <i>Selección de pacientes y esquemas de tratamiento en el entorno neoadyuvante .....</i>	<b>33</b>
1.1.5.2.2. <i>La terapia neoadyuvante como modelo para el desarrollo de nuevos fármacos .....</i>	<b>35</b>
1.1.5.2.3. <i>La terapia neoadyuvante como modelo para investigación .....</i>	<b>36</b>
<b>1.2. INTRODUCCIÓN DE LA INMUNOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE DEL CÁNCER DE MAMA .....</b>	<b>37</b>
1.2.1. Entornos clínicos para el desarrollo de la inmunoterapia en cáncer de mama precoz .....	38
1.2.2. Estrategias de combinación de inmunoterapia .....	41
1.2.2.1. <i>Estrategia de combinación: quimio-inmunoterapia .....</i>	41
1.2.2.2. <i>Estrategia de combinación: antiHer2- inmunoterapia .....</i>	43
1.2.3. Beneficio potencial de añadir inmunoterapia en la fase inicial .....	44
<b>1.3. MICROAMBIENTE INMUNE EN CÁNCER DE MAMA .....</b>	<b>45</b>
1.3.1. Componentes del microambiente tumoral y sus interacciones .....	46
1.3.2. Microambiente local .....	46
1.3.3. Microambiente regional .....	50
1.3.4. Microambiente metastásico .....	50

<b>1.4. BIOMARCADORES DE RESPUESTA INMUNE EN CÁNCER DE MAMA .....</b>	<b>51</b>
1.4.1. Biomarcadores inmunes del microambiente tumoral .....	52
1.4.1.1. <i>Linfocitos infiltrantes de tumor</i> .....	52
1.4.1.2. <i>PD-L1</i> .....	55
1.4.1.3. <i>Biomarcadores agnósticos</i> .....	56
1.4.1.4. <i>Firmas genómicas</i> .....	57
1.4.1.5. <i>MicroRNA</i> .....	57
1.4.2. Biomarcadores circulantes .....	58
1.4.2.1. <i>Determinaciones de células inmunes circulantes</i> .....	59
1.4.2.2. <i>Ratio neutrófilo-linfocito</i> .....	61
1.4.2.3. <i>Ratio plaqueta-linfocito</i> .....	63
1.4.2.4. <i>Citoquinas</i> .....	64
1.4.2.5. <i>Micropartículas</i> .....	65
<b>1.5. CORRELACIÓN ENTRE BIOMARCADORES INMUNES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL Y CIRCULANTES EN CÁNCER DE MAMA NEOADYUVANTE .....</b>	<b>65</b>
<b>1.6. MODELOS PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS EN CÁNCER DE MAMA NEOADYUVANTE .....</b>	<b>69</b>
1.6.1. Factores y modelos predictivos .....	70
1.6.2. Factores y modelos pronósticos dependientes de la respuesta al tratamiento .....	71
1.6.2.1. <i>Respuesta completa patológica</i> .....	72
1.6.2.2. <i>Carga de cáncer residual</i> .....	74
1.6.3. Modelos predictivos y pronósticos con integración de parámetros inmunes .....	75
<b>1.7. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>78</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>80</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>86</b>
<b>3.1. TIPO DE ESTUDIO .....</b>	<b>88</b>
<b>3.2. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO .....</b>	<b>88</b>
<b>3.3. VARIABLES DEL ESTUDIO .....</b>	<b>91</b>
3.3.1. Variables demográficas y clínicas .....	92
3.3.2. Variables anatomopatológicas .....	93
3.3.3. Variables relacionadas con el tratamiento .....	94
3.3.4. Variables de resultado .....	95
3.3.5. Evaluación de los linfocitos infiltrantes de tumor .....	97

3.3.6. Variables hematimétricas y estimación de la ratio neutrófilo-linfocito .....	98
<b>3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>98</b>
3.4.1. Análisis descriptivo y de correlación .....	98
3.4.2. Variables de supervivencia y desarrollo de modelos pronósticos .....	99
3.4.3. Validación interna mediante técnicas de muestreo aleatorio .....	100
3.4.4. Base de datos y paquetes estadísticos .....	101
<b>3.5. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES .....</b>	<b>101</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>102</b>
<b>4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA .....</b>	<b>104</b>
<b>4.2. VALOR PREDICTIVO Y PRONÓSTICO DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS .....</b>	<b>110</b>
4.2.1. Valor predictivo de respuesta a quimioterapia neoadyuvante de los factores clásicos .....	110
4.2.2. Valor pronóstico de la respuesta a quimioterapia neoadyuvante .....	112
4.2.3. Valor pronóstico de los factores clínicos clásicos .....	114
<b>4.3. ANÁLISIS DE LA INFILTRACIÓN LINFOCITARIA TUMORAL .....</b>	<b>117</b>
4.3.1. Estudio descriptivo .....	117
4.3.2. Análisis del valor predictivo de respuesta a quimioterapia neoadyuvante de la infiltración linfocitaria tumoral .....	120
4.3.3. Análisis del valor pronóstico de la infiltración linfocitaria tumoral .....	123
<b>4.4. ANÁLISIS DE LA RATIO NEURÓFILO-LINFOCITO .....</b>	<b>125</b>
4.4.1. Estudio descriptivo .....	125
4.4.2. Análisis del valor predictivo de la ratio neutrófilo-linfocito .....	128
4.4.3. Análisis del valor pronóstico de la ratio neutrófilo-linfocito .....	130
<b>4.5. EVALUACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR Y LA RATIO NEURÓFILO-LINFOCITO .....</b>	<b>132</b>
4.5.1. Análisis de la correlación entre los TIL y la ratio neutrófilo-linfocito .....	132
4.5.2. Análisis del valor predictivo combinado de los linfocitos infiltrantes de tumor y la ratio neutrófilo-linfocito .....	134
4.5.3. Análisis del valor pronóstico combinado de los linfocitos infiltrantes de tumor y la ratio neutrófilo-linfocito .....	135
<b>4.6. GENERACIÓN DE UN MODELO PREDICTIVO MULTIVARIABLE DE RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE CON INCLUSIÓN DE BIOMARCADORES INMUNES .....</b>	<b>139</b>
4.6.1. Generación y selección del modelo predictivo .....	139
4.6.2. Análisis de la fiabilidad del modelo .....	143

4.6.2.1. Validación interna mediante técnicas de muestreo aleatorio .....	143
4.6.2.2. Análisis de subgrupos .....	143
4.6.2.2.1. Subgrupo luminal .....	144
4.6.2.2.2. Subgrupo no luminal .....	147
<b>4.7. GENERACIÓN DE UN MODELO PRONÓSTICO MULTIVARIABLE CDE CÁNCER DE MAMA TRATADO CON QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE CON INCLUSIÓN DE BIOMARCADORES INMUNES .....</b>	<b>150</b>
4.7.1. Generación y selección del modelo pronóstico .....	150
4.7.2. Análisis de subgrupos .....	157
4.7.2.1. Subgrupo luminal .....	157
4.7.2.2. Subgrupo no luminal .....	163
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>168</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>194</b>
<b>ANEXO. PUBLICACIONES .....</b>	<b>198</b>
<p>Esmeralda García-Torralba, Francisco Ayala de la Peña, Beatriz Alvarez-Abril, et al.; Abstract PS6-45: Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes and neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. Cancer Res 15 February 2021; 81 (4_Supplement): PS6-45. <a href="https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS20-PS6-45">https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS20-PS6-45</a></p> <p>Esmeralda Garcia-Torralba, Beatriz Álvarez-Abril, Carlos Bravo-Pérez, et al.; Abstract P4-07-03: Development of prognostic models based on clinical, immune-related and proliferation factors in early breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. Cancer Res 15 February 2022; 82 (4_Supplement): P4-07-03. <a href="https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS21-P4-07-03">https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS21-P4-07-03</a></p> <p>Esmeralda Garcia-Torralba, Beatriz Álvarez-Abril, Carlos Bravo-Pérez, et al.; Abstract P4-07-11: Prognostic significance of changes in tumor infiltrating lymphocytes and neutrophil-to-lymphocyte ratio after neoadjuvant chemotherapy in early breast cancer patients. Cancer Res 15 February 2022; 82 (4_Supplement): P4-07-11. <a href="https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS21-P4-07-11">https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS21-P4-07-11</a></p>	
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>204</b>

# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

## A

---

AC: Adriamicina - Ciclofosfamida

AIC: Akaike Information Criterion, criterio de información de Akaike

AJCC: American Joint Committee on Cancer, Comité Americano del Cáncer

APC: Antigen-Presenting Cells, células presentadoras de antígenos

ARNm: ARN mensajero

AURKA: Aurora Kinase A, Aurora quinasa A

## B

---

BAG: Biopsia con Aguja Gruesa

BSGC: Biopsia Selectiva de Ganglio Centinela

## C

---

CAF: Cancer-Associated Fibroblast, fibroblastos asociados al cáncer

CbT: Carboplatino - Taxano

CDIS: Carcinoma Ductal In Situ

Cl: Claudin-Low

CM: Cáncer de Mama

cm: centímetros

CMTN: Cáncer de Mama Triple Negativo

CPS: Combined Positive Score, score positivo combinado

CTLA4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, proteína asociada a los linfocitos T citotóxicos 4

## D

---

D: Docetaxel

DALYs: Disability Adjusted Life Years, años de vida ajustados por discapacidad

DC: Dendritic Cells, células dendríticas

## **E**

---

EC: Epirubicina – Ciclofosfamida

## **F**

---

FAC: Fluorouracilo - Adriamicina - Ciclofosfamida

FDA: Food and Drug Administration, Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

FEC: Fluorouracilo - Epirubicina - Ciclofosfamida

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization, hibridación in Situ fluorescente

FSH: Follicle Stimulating Hormone, hormona foliculoestimulante

## **G**

---

G: Grado

GES: Gene Expression Signature, test génico

GGO: gammagrafía ósea

GRB7: Growth Factor Receptor Bound Protein 7, proteína 7 unida al receptor del factor de crecimiento

## **H**

---

HDN: High Density Neutrophils, neutrófilos de alta densidad

HR: Hazard ratio

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

## **I**

---

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%

ICI: Immune Checkpoint Inhibitors, inhibidores del punto de control inmunitario

IFN: Interferón

IHQ: Inmunohistoquímica

IL: Interleucina

IQR: Interquartile Range, rango intercuartílico

## **L**

---

LAG-3: Lymphocyte-Activation Gene 3, gen de activación de linfocitos 3

LH: Hormona Luteinizante

LDN: Low Density Neutrophils, neutrófilos de baja densidad

LLRT: LikeLihood-Ratio Test, test de la likelihood ratio

## **M**

---

M: Metástasis

MiARN: microARN

MKI67: Marcador de proliferación Ki-67

MMRd: Mismatch-Repair deficiency, deficiencia de reparación del sistema mismatch repair

MP: micropartículas

## **N**

---

N: lymph Nodes, afectación ganglionar

NK: Natural Killer

NST: No Special Type, sin tipo especial

## **O**

---

OMS: Organización Mundial de la Salud

## **P**

---

P: Paclitaxel

PAAF: Punción Aspiración con Aguja Fina

PD-1: Programmed cell Death protein 1, proteína de muerte celular programada 1

PD-L1: Programmed Death-Ligand 1, ligando 1 de muerte programada

PET: Tomografía por Emisión de Positrones

P. ej: por ejemplo

## **Q**

---

QTN: Quimioterapia Neoadyuvante

## **R**

---

RCB: Residual Cancer Burden, carga de cáncer residual

RCp: Respuesta Completa Patológica

RE: Receptor de Estrógeno

RH: Receptor Hormonal

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RNL: Ratio Neutrófilo-Linfocito

ROC: Receiver Operating Characteristic, curva ROC

ROS: Reactive Oxygen Species, especies reactivas de oxígeno

RP: Receptor de Progesterona

RPL: Ratio Plaqueta-Linfocito

## **S**

---

SGCM: Supervivencia Global específica de Cáncer de Mama

SD: Standard Deviation, desviación estándar

SG: Supervivencia Global

SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad

SLR: Supervivencia Libre de Recaída

sTIL: stromal Tumor Infiltrating Lymphocytes, linfocitos infiltrantes de tumor estromales

## **T**

---

T: tamaño del Tumor

TAC: Taxano - Adriamicina - Ciclofosfamida

TAC: Tomografía Axial Computarizada

TAM: Tumor-Associated Macrophages, macrófagos asociada al tumor

TAN: Tumor Associated Neutrophils, neutrófilos asociados a tumor

TCR: T Cell Receptor, receptor de células T

Tfh: T follicular helper cells, células T auxiliares foliculares

TGF- $\beta$ : transforming growth factor- $\beta$ , factor de crecimiento transformante- $\beta$

Th1: linfocitos T Helper de tipo 1

Th2: linfocitos T Helper de tipo 2

TIL: Tumor Infiltrating Lymphocytes, linfocitos infiltrantes de tumor

TIM-3: T cell Immunoglobulin and Mucin protein 3, inmunoglobulina de células T-3

TMB: Tumor Mutational Burden, carga tumoral mutacional

TME: Tumor Microenvironment, microambiente tumoral

TNF: Tumor Necrosis Factor, factor de necrosis tumoral

Treg: células T reguladoras

## **V**

---

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, factor de crecimiento endotelial vascular



## RESUMEN

---



## **INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN**

La respuesta completa patológica (RCp) es el principal factor pronóstico para las pacientes con cáncer de mama (CM) tratadas con quimioterapia neoadyuvante (QTN). De forma exclusiva, resulta insuficiente para la estimación pronóstica de estas pacientes. El microambiente tumoral (TME) juega un papel clave en la respuesta al tratamiento y en el pronóstico de las pacientes con CM, pero la integridad del sistema inmune periférico es también relevante, por lo que ambos compartimentos deberían ser considerados para definir modelos pronósticos y predictivos que integren marcadores inmunes.

## **OBJETIVO**

El objetivo principal de esta tesis doctoral fue determinar si la evaluación combinada de la respuesta inmune tumoral y periférica mediante la infiltración linfocitaria tumoral (sTIL) y la ratio neutrófilo-linfocito (RNL) al diagnóstico, es capaz de mejorar, frente a los factores predictivos y pronósticos clínico-patológicos clásicos, la predicción de la respuesta y la estratificación pronóstica en una serie consecutiva de pacientes con CM precoz tratadas con QTN.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Estudio observacional, unicéntrico y retrospectivo de una cohorte de pacientes diagnosticadas de CM y tratadas con QTN entre 2008 y 2019. La cuantificación de los sTIL se realizó mediante un método estandarizado. Se desarrolló un modelo predictivo y pronóstico, incluyendo los biomarcadores sTIL y RNL. Se procedió a la validación interna de los modelos mediante técnicas de muestreo aleatorio (validación cruzada y remuestreo Bootstrap) y análisis de subgrupos.

## **RESULTADOS**

Tras analizar un total de 466 pacientes con CM tratadas con QTN, se encontraron diferencias en la infiltración, según subtipo inmunohistoquímico (mayor en CM HER2+ y triple negativo). Los sTIL como variable continua, se asociaron significativamente con la RCp, pero no fueron un factor pronóstico significativo para la supervivencia libre de enfermedad (SLE), supervivencia global (SG) ni supervivencia global específica de CM (SGM) en la serie global, pero sí en el subtipo triple negativo. Los valores de RNL no

difirieron según subtipo. La RNL como variable continua, no se asoció con la RCp y tampoco fue un factor pronóstico significativo para SLE, SG y SGCM. No se encontró correlación entre los niveles de sTIL y RNL al diagnóstico. En el análisis conjunto de ambos biomarcadores, solo los sTIL permanecieron como factor predictivo independiente de respuesta a QTN. No se encontraron diferencias significativas en el análisis de la capacidad pronóstica para SLE, SG y SGCM de los biomarcadores sTIL y RNL, de forma conjunta.

La generación de un modelo predictivo que incluía variables clínicas (tamaño tumoral y afectación ganglionar al diagnóstico) y patológicas (subtipo molecular y grado 3), junto a la cuantificación de sTIL, se mostró como el modelo óptimo para la predicción de RCp a la QTN. La validación interna del modelo mediante técnicas de muestreo aleatorio y *bootstrapping* mostró la robustez del modelo conjunto. En el análisis por subgrupos, en el CM no luminal, el modelo predictivo óptimo incluyó, además la RNL, si bien la diferencia con el modelo de referencia no alcanzó la significación estadística.

Para los tres eventos de supervivencia, el modelo óptimo para la predicción pronóstica fue aquel que incluía variables exclusivamente clínicas (tamaño tumoral y afectación ganglionar al diagnóstico) y patológicas (subtipo molecular, consecución de RCp e invasión nodal extracapsular post-tratamiento). La inclusión de biomarcadores inmunes (sTIL y RNL) no demostró mejorar la capacidad de discriminación del modelo clínico-patológico.

## **CONCLUSIONES**

El hallazgo más relevante de esta tesis doctoral ha sido la generación de un modelo predictivo con variables clínicas y patológicas, junto a la cuantificación de sTIL, que se mostró como el modelo óptimo para la predicción de RCp, manteniéndose dicha predicción en el análisis exploratorio según subtipo molecular. Aunque este hallazgo no se ha confirmado en el análisis de la supervivencia, el limitado número de eventos y la capacidad predictiva de la RCp no permite descartar totalmente su impacto a más largo plazo.

**PALABRAS CLAVE:** cáncer de mama. Quimioterapia neoadyuvante. Linfocitos infiltrantes de tumor. Ratio neutrófilo-linfocito. Factores predictivos. Factores pronósticos.



# INTRODUCCIÓN

---



## **1.1. CÁNCER DE MAMA**

### **1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO**

#### Epidemiología

El cáncer de mama (CM) es el tumor maligno de mayor incidencia, con 2,3 millones de casos nuevos en 2020, lo que representa el 11,7 % de todos los diagnósticos de cáncer. Es la quinta causa de mortalidad por cáncer en todo el mundo, con 685.000 muertes anuales. Entre las mujeres, el CM supone uno de cada cuatro diagnósticos y una de cada seis muertes por cáncer.(1) En España, se diagnosticaron 32.953 mujeres con CM en 2020, siendo su prevalencia a 5 años de 144.233 casos.(2) Además, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el CM es responsable de la pérdida de 19,6 millones de años de vida ajustados por discapacidad (Disability Adjusted Life Years, DALYs).(3)

Específicamente para el CM, las tasas de incidencia son un 88% más altas en los países desarrollados que en aquellos en vías de desarrollo. Sin embargo, las mujeres que viven en países en desarrollo tienen tasas de mortalidad un 17 % más altas (15,0 y 12,8 por 100000, respectivamente).(1)

La incidencia y las tasas de mortalidad por CM han aumentado en las últimas tres décadas. Estudios recientes estiman que para 2030, el número de nuevos casos diagnosticados a nivel mundial alcancen los 2,7 millones anuales y el número de muertes los 0,87 millones.(4) En los países de bajos y medianos ingresos se espera que la incidencia del CM aumente aún más debido a la occidentalización de los estilos de vida, mejor registro y detección del cáncer.(5)

#### Factores de riesgo

La carcinogénesis es un proceso multifactorial, consecuencia de una predisposición genética y factores ambientales.(6) El número de factores de riesgo para el CM es significativo e incluye tanto factores modificables como no modificables (tabla 1).

La instauración de conductas preventivas y la optimización de los programas de cribado son cruciales para minimizar las tasas de incidencia, así como para la detección temprana del CM.(6)

Tabla 1. Factores de riesgo no modificables y modificables para cáncer de mama

Factores no modificables	Factores modificables
Sexo femenino	Terapia hormonal sustitutiva
Edad (> 50 años)	Dietilestilbestrol
Historia familiar (CM o cáncer de ovario)	Actividad física (factor protector)
Mutaciones genéticas (alto riesgo: <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>TP53</i> , <i>CDH1</i> , <i>PTEN</i> , <i>STK11</i> )	Sobrepeso / obesidad
Raza / etnicidad (> incidencia: blanca no-hispana, > mortalidad: raza negra)	Consumo de alcohol
Embarazo y lactancia (edad avanzada en el primer parto, menor número de hijos y tiempo de lactancia)	Hábito tabáquico
Período menstrual y menopausia (edad temprana en la menarquia y tardía en la menopausia)	Déficit vitamínico (25-hydroxyvitamin D, aún en estudio)
Densidad del tejido mamario	Exposición excesiva a la luz artificial (en estudio)
Historia previa de CM	Ingesta de alimentos procesados
Enfermedad mamaria no-cancerosa (hiperplasia atípica, carcinoma in situ)	Exposición a productos químicos (diclorodifeniltricloroetano, bifenilo policlorado)
Radioterapia previa	Otras drogas (paroxetina, antidepresivos tricíclicos e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina)

CM: cáncer de mama.

Adaptado de: Łukasiewicz S, et al. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies. *Cancers*, 2021.

## 1.1.2. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

### 1.1.2.1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

El carcinoma infiltrante de mama incluye un amplio espectro de tumores que difieren significativamente en cuanto a su presentación, comportamiento biológico y clínico.(7) Según la última edición de la clasificación de la OMS, los CM se dividen en, al menos 21 subtipos diferentes.(8) El carcinoma infiltrante sin tipo especial (no special type, NST) es el subtipo más frecuente (70-75%), seguido del carcinoma lobulillar (10-14%) y otros carcinomas de tipo especial (p.ej., carcinoma tubular, mucinoso o neuroendocrino).(9)

### 1.1.2.2. CLASIFICACIÓN MOLECULAR

Independientemente de la clasificación histológica, el CM se puede dividir en subtipos moleculares basados en los niveles de expresión génica del ARN mensajero (ARNm). Las características histológicas y moleculares tienen importantes implicaciones, tanto para la decisión terapéutica como en la estimación del pronóstico.(10)

Los subtipos intrínsecos descritos por Perou y Sorlie se basan en una firma de expresión de 50 genes (PAM50).(11) La clasificación subrogada de los subtipos intrínsecos, que generalmente se usa en la práctica clínica habitual, se basa en la histología y expresión inmunohistoquímica (IHQ) de proteínas clave: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y el marcador de proliferación Ki67.(11) Por tanto, en la práctica diaria, distinguimos cuatro subtipos fundamentales: luminal A, luminal B, HER2 positivo/enriquecido (HER2+) y triple negativo/basal-like (CMTN).(11–13) Posteriormente, en 2007, se describió el quinto subtipo molecular, que se refiere al CM “*claudin-low*”.(14)

Sin embargo, aunque se acepta la clasificación subrogada para la toma de decisiones en la práctica clínica, estos marcadores basados en IHQ son sólo un sustituto y no pueden establecer el subtipo intrínseco de ningún cáncer dado, con tasas de discordancia entre los marcadores por IHQ y los ensayos basados en genes de hasta el 30% (figura 1).(10,15)

#### Cáncer de mama subtipo luminal

Los CM de este subgrupo son los más frecuentes (70-75%). Se presentan habitualmente como CM NST y presentan expresión positiva para el RE.(16) A su vez, se divide en los subtipos Luminal A y B, con implicaciones pronósticas.

Los tumores luminales A se caracterizan por la expresión de RE y/o RP y ausencia de HER2. A nivel molecular, presentan una baja expresión de genes relacionados con proliferación celular. Clínicamente son de bajo grado, crecimiento lento y tienden a tener mejor pronóstico.(17)

A diferencia del subtipo A, los tumores luminal B son de mayor grado y peor pronóstico. Tienen expresión positiva para RE y pueden ser RP negativos y/o HER2 positivos.(18)

Adicionalmente, tiene una alta expresión de genes relacionados con la proliferación (p. ej., *MKI67* y *AURKA*). (18,19)

#### Cáncer de mama HER2-positivo

El CM HER2+ constituye del 10 al 15 % de los CM. Se caracteriza por una alta expresión de HER2 con ausencia de RE y RP. A nivel molecular, este subtipo expresa principalmente genes y proteínas relacionados con la proliferación (p. ej., *ERBB2/HER2* y *GRB7*). (20) Las terapias dirigidas antiHER2 han cambiado el pronóstico de estos tumores de forma radical, mejorando la evolución infausta que solían presentar previo a su desarrollo.

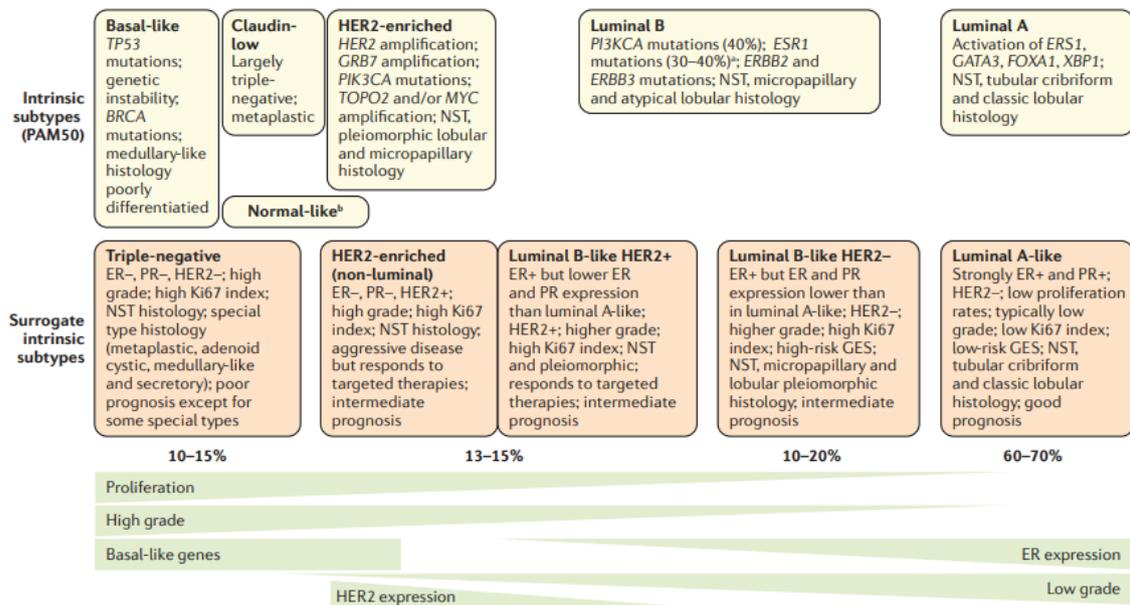
#### Cáncer de mama triple negativo

El CMTN supone un 20% de todos los CM e incluye un espectro heterogéneo de neoplasias caracterizadas por una expresión negativa de RE, RP y HER2. Su diagnóstico es más común en las mujeres menores de 40 años, afroamericanas y en aquellas con variantes patogénicas en línea germinal de *BRCA1*. (21) Este subtipo tiende a ser biológicamente agresivo y a menudo se asocia con un peor pronóstico. (22)

#### Cáncer de mama "claudin-low"

Los CM claudin-low (CL) representan el 7-14 % de todos los CM. La mayoría son RE, RP y HER2 negativos, con un pronóstico similar al CMTN. (14,23) Se caracterizan por la baja expresión de genes implicados en la adhesión célula-célula, incluyendo claudinas, ocludina y e-cadherina. Además, estos tumores muestran una alta expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima y se ha descrito una marcada infiltración de células inmunitarias y del estroma. (24,25) Este subtipo intrínseco no tiene biomarcador subrogado y, en consecuencia, no se utiliza actualmente en la práctica clínica.

Figura 1. Subtipos intrínsecos y subrogados en la clasificación molecular del cáncer de mama



NST: no special type. PAM50: a 50-gene expression signature. ER: estrogen receptor. PR: progesterone receptor. HER2: human epidermal growth factor receptor 2. GES: gene expression signature.

Adaptado de: Harbeck N, et al. Breast cancer. Nature Reviews, 2019.

### 1.1.3. ESTADIFICACIÓN

El sistema de referencia para la estadificación de las pacientes afectas por CM es el propuesto por la American Joint Committee on Cancer (AJCC), que tradicionalmente incluía un sistema de estadificación basado en los hallazgos anatómicos: tamaño del tumor (T), estado de los ganglios (N) y metástasis (M). Sin embargo, la octava edición del manual de estadificación del AJCC (2018) esboza un nuevo sistema pronóstico que, además de las características anatómicas, reconoce factores biológicos (RE, RP, HER2 y grado).(26)

Aunque no es obligatoria la realización de ensayos multigénicos para definir las categorías, se recomiendan para completar la predicción pronóstica en los contextos en que esté indicado.(26) En este sentido, el test de 21 genes Oncotype DX® es el único con evidencia suficiente en la actualidad.(27) Se emplea en pacientes intervenidas por tumores inferiores a 5 cm, con receptores hormonales (RH) positivos, HER2 negativo y ganglios negativos (o máximo 3 positivos, en pacientes postmenopáusicas).(27)

#### **1.1.4. FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS**

Los factores pronósticos clásicos del CM incluyen la edad, el estadio, el subtipo tumoral y grado, y la infiltración linfovascular.

##### Edad

El CM antes de los 35 años es una entidad infrecuente (<5% de los pacientes), potencialmente más agresiva y frecuentemente asociado a factores hereditarios.(28)

##### Estadio

El establecimiento del screening mediante mamografía, y el consiguiente diagnóstico en estadios más precoces, han cambiado la historia natural del CM. El pronóstico en estadios iniciales, por tanto, se basa en la biología del tumor (subtipo histológico, grado, invasión linfovascular y perfil inmunohistoquímico).(26)

##### Subtipo histológico

El CM NST es un carcinoma no clasificable en un subtipo histológico específico. Algunos de los tipos especiales (como el tubular, cribiforme y mucinoso), si presentan histología pura de al menos el 90% (es decir, sin histología mixta o <10 % de otro subtipo) tienen muy buen pronóstico. Sin embargo, algunos otros tipos especiales (como el carcinoma lobulillar pleomórfico, el carcinoma metaplásico de alto grado y el carcinoma micropapilar) se asocian a peor evolución. Merece especial mención el CM inflamatorio, una forma rara y agresiva caracterizada por células malignas que bloquean los vasos linfáticos en la piel de la mama.(10)

##### Grado tumoral

La evaluación del grado histológico se realiza de acuerdo al sistema de Scarff-Bloom-Richardson y se basa en tres características tumorales: formación tubular, anisocariosis y el número de mitosis. La clasificación final en Grado 1 (G1), G2 o G3 es reflejo de la potencial agresividad y un importante factor pronóstico.(29)

##### Invasión linfovascular y estado de los márgenes quirúrgicos

Se ha correlacionado la presencia de invasión linfovascular con afectación ganglionar, una mayor probabilidad de recurrencia local e impacto en supervivencia.(30) A su vez,

un margen de resección positivo tiene un impacto significativo en tasas de recurrencia local tras cirugía conservadora, recomendando la mayoría de guías clínicas reintervención para ampliación, si es posible.(31–34)

#### Perfil inmunohistoquímico

Los subtipos subrogados de CM (figura 1) constituyen el factor más relevante que condiciona la decisión terapéutica. Los tumores luminales A suelen presentar características de baja agresividad como G1, alta expresión de RE y RP, baja proliferación y firmas de expresión génica de bajo riesgo. Por el contrario, el CM luminal B expresa RE, pero no (o en menor grado) RP y muestra un alto grado o índice proliferación y firmas génicas riesgo significativo.(10) Los subtipos CMTN y no luminal tienden a presentar características agresivas como grado dediferenciado, ausencia de expresión de RE, RP y HER2, y alta proliferación. Los tumores HER2+ muestran con mayor frecuencia G2 o G3, expresión baja o ausente de RE y RP e índice de proliferación medio-alto.(10)

#### Marcador de proliferación Ki67

El biomarcador Ki67 es un marcador ampliamente utilizado para determinar la proliferación y predecir quimiosensibilidad, especialmente en las pacientes con CM RE+/HER2 negativo.(35) Aunque no es una práctica estandarizada ni recomendada, el punto de corte más ampliamente utilizado es 20% de núcleos teñidos en células tumorales invasivas; una fracción de <15% de núcleos teñidos, sea cual sea la intensidad, se considera baja proliferación, y >30% es considerada alta proliferación.(35)

### **1.1.5. TRATAMIENTO DEL CM PRECOZ (ENFERMEDAD LOCALIZADA O LOCALMENTE AVANZADA)**

#### **1.1.5.1. ENFOQUE GENERAL DEL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA PRECOZ**

La terapia locorregional en el CM precoz, independientemente del subtipo molecular, comprende la cirugía para extirpar el tumor y para estadificar la carga axilar tumoral o extirpar los ganglios linfáticos afectados.(10) Sin embargo, la mayoría de las pacientes requerirán tratamiento sistémico complementario.

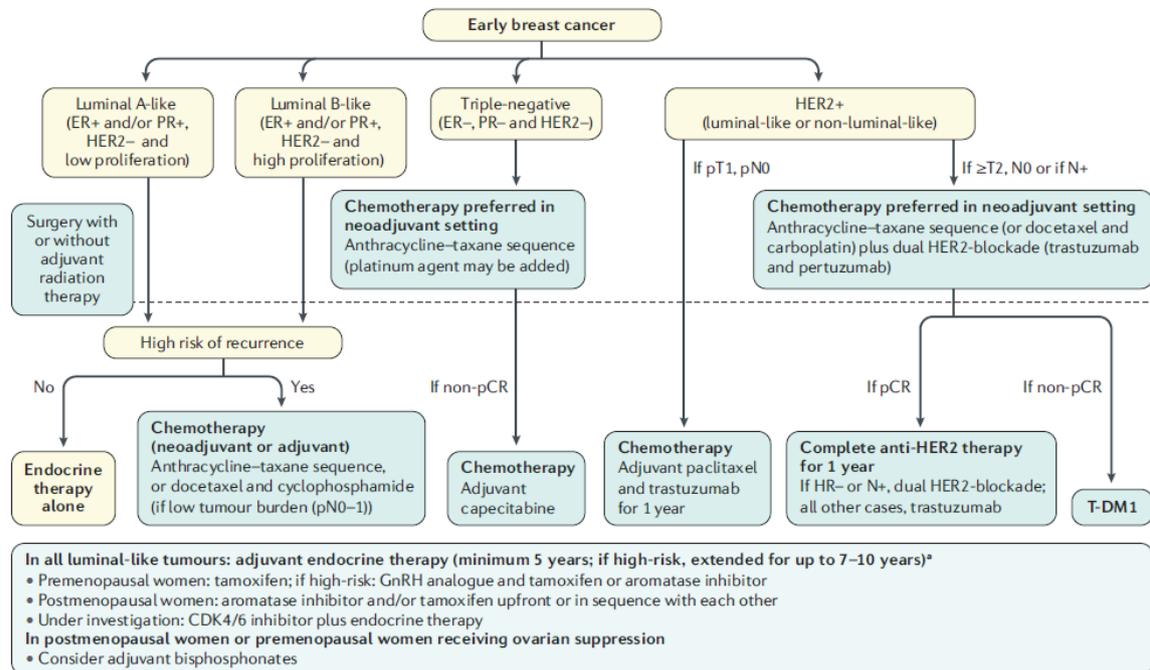
El tratamiento sistémico se puede administrar antes de la cirugía (neoadyuvante) en mujeres con tumores grandes en quienes se prefiere reducir la carga tumoral o si la información de la respuesta completa patológica completa (RCp), que se refiere a la ausencia de células malignas en la pieza quirúrgica tras tratamiento prequirúrgico, tiene valor pronóstico (como en el CM HER2+ o CMTN).(36,37) Otra opción es la pauta del tratamiento sistémico después de la cirugía (adyuvante) si el resultado quirúrgico o los biomarcadores indican un mayor riesgo de recurrencia.(10)

La radioterapia postoperatoria y/o terapias sistémicas (que puede comprender quimioterapia, terapia dirigida, terapia endocrina y agentes modificadores óseos), generalmente, se administran según la carga tumoral inicial y el patrón de expresión molecular del tumor.(33,34,38,39) La figura 2 resume las estrategias de tratamiento para el CM precoz.

En este contexto, uno de los aspectos más sometidos a debate en los últimos años es el que se refiere al manejo terapéutico de las pacientes con CM precoz luminal. Todas las pacientes con RE+ y/o RP+, independientemente del estado de HER2, debe recibir terapia endocrina. Sin embargo, la pregunta clave en el CM precoz luminal (RH+/HER2 negativo) es qué pacientes requieren quimioterapia (neoadyuvante o adyuvante), además de la terapia endocrina.(40) En general, la recomendación de quimioterapia en tumores RE+/HER2- puede estar influida por la proliferación (expresión de Ki67), existencia de afectación linfovascular y, si están disponibles, los resultados de un test de expresión génica.

Además de los marcadores inmunohistoquímicos tradicionales, los paneles genéticos predictivos ayudan en la decisión sobre quimioterapia en este subgrupo de pacientes (RH+/HER2-).(41) En tumores con 0-3 ganglios linfáticos afectados clasificados como de bajo riesgo por un test génico (Gene Expression Signatures, GES), se puede evitar la quimioterapia, mientras que las pacientes de alto riesgo deben recibir quimioterapia. Actualmente, el valor pronóstico del test génico OncotypeDx® está respaldado por un nivel de evidencia IA.(34,39) Además del riesgo de recaída temprana, estos ensayos predicen recurrencias tardías, información que puede emplearse para indicar terapia endocrina adyuvante extendida.(27,42)

Figura 2. Resumen de la estrategia terapéutica en cáncer de mama precoz, según subtipo molecular



ER: estrogen receptor. GnRH: gonadotropin-releasing hormone. HER2: human epidermal growth factor receptor 2. HR: hormone receptor. N: node status. p: pathological. pCR: pathological complete response. PR: progesterone receptor. T: tumour grade. T-DM1: trastuzumab emtansine.

Adaptado de: Harbeck N, et al. Breast cancer. Nature Reviews, 2019.

### 1.1.5.2. TRATAMIENTO NEOADYUVANTE DEL CÁNCER DE MAMA

Como se ha expuesto previamente, el tratamiento de las pacientes con CM precoz implica tres modalidades principales: la cirugía, el tratamiento sistémico y la radioterapia.(10) Tradicionalmente, la indicación de tratamiento sistémico se establecía después de la cirugía. Sin embargo, se ha comprobado que la terapia neoadyuvante es una alternativa igualmente efectiva.(43,44) Si bien la hormonoterapia neoadyuvante se recomienda principalmente en pacientes posmenopáusicas con RH+, la indicación de quimioterapia neoadyuvante (QTN) está cada vez más establecida para todos los subtipos de CM.

En comparación con el tratamiento adyuvante, la QTN ofrece algunas ventajas. En primer lugar, reduce el tamaño tumoral, lo que facilita la reseccabilidad quirúrgica y aumenta la tasa de cirugía conservadora de la mama.(43,45) A su vez, puede eliminar metástasis ganglionares axilares que se detectan mediante biopsia selectiva de ganglio

centinela (BSGC) o disección axilar dirigida tras neoadyuvancia.(46) En segundo lugar, permite una evaluación objetiva de la eficacia del tratamiento, lo que ofrece una prueba *in vivo* de la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento. Si no se produce respuesta, la terapia puede modificarse, evitando así los efectos secundarios de un tratamiento ineficaz.(47) En este sentido, la RCp se asocia con supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG) más prolongadas, especialmente para el CM HER2+ o CMTN.(36) Un atractivo adicional del tratamiento neoadyuvante es que permite el diseño de ensayos clínicos con enfoques de investigación novedosos para el tratamiento adyuvante, especialmente en pacientes con enfermedad residual después de la terapia neoadyuvante.(48) Asimismo, los ensayos clínicos que involucran el tratamiento neoadyuvante ofrecen ventajas en comparación con el entorno adyuvante, por ejemplo, en la limitación del tamaño muestral, la respuesta patológica temprana es un criterio de valoración fiable relacionado con el pronóstico a largo plazo.(48) Por último, proporciona información sobre la biología del tumor, permitiendo la búsqueda de biomarcadores predictivos y pronósticos antes, durante y después del tratamiento neoadyuvante.(44)

#### **1.1.5.2.1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y ESQUEMAS DE TRATAMIENTO EN EL ENTORNO NEOADYUVANTE**

##### Selección de pacientes candidatos a terapia neoadyuvante

Inicialmente, la QTN se recomendaba únicamente para pacientes con tumores grandes, con cirugías previsiblemente mutilantes, o enfermedad inflamatoria. Sin embargo, actualmente la QTN se emplea de forma habitual para el tratamiento de pacientes con CM, dependiendo de aspectos tales como el tamaño del tumor y afectación ganglionar, características moleculares, estado funcional de la paciente y comorbilidades, recomendaciones basadas en las directrices de guías clínicas.(33,34,39) En general, cualquier paciente que sea candidato a terapia sistémica adyuvante se puede considerar para tratamiento neoadyuvante.(48)

En pacientes con CM operable, no existe una definición única del tamaño tumoral o característica clínica que pueda establecer si la paciente se beneficiará de la terapia neoadyuvante. Aunque algunos centros valoran su indicación en aquellos casos con tamaño tumoral mayor de 2 centímetros (cm) o afectación ganglionar, si al evaluar el

riesgo y beneficio, las opciones quirúrgicas y/o los resultados a largo plazo son mejores para el planteamiento neoadyuvante, entonces la indicación es clara.(48)

Según el subtipo molecular, los CM que más se benefician de la terapia neoadyuvante son el CMTN y HER2+, que son los que presentan mayores tasas de respuesta. Hasta el 45% de los CMTN muestran RCp tras QTN. Esto es fundamental, dado que el CMTN con RCp tienen un pronóstico similar al de otros subtipos que también alcanzan RCp. Por el contrario, el CMTN con enfermedad residual tienen una alta probabilidad de recurrencia. Para los tumores HER2+, las tasas de RCp puede alcanzar hasta un 60%, tras QTN y tratamiento anti-HER2. Existe también asociación entre RCp y aumento de la SLE y SG en este subtipo. En cuanto al CM luminal, la QTN consigue alrededor del 10-25% de RCp, inferior a otros subtipos.(49) En el CM RH+/HER2-, las plataformas genómicas pueden ser útiles para definir las pacientes con potencial beneficio de añadir quimioterapia al tratamiento hormonal.(41)

En cualquier caso, la decisión final siempre debe tomarse en el seno de un comité multidisciplinar, sin olvidar las preferencias del paciente.

#### Selección del fármaco para la terapia neoadyuvante

El tratamiento médico neoadyuvante del CM puede incluir quimioterapia, tratamientos dirigidos como anti-HER2 y terapia hormonal.

La elección del régimen de quimioterapia dependerá del estado clínico de la paciente y del subtipo tumoral. Algunas terapias con eficacia comprobada incluyen la doxorubicina y ciclofosfamida (AC); epirubicina y ciclofosfamida (EC); fluorouracilo, epirubicina y ciclofosfamida (FEC) o fluorouracilo, doxorubicina y ciclofosfamida (FAC); AC seguido de paclitaxel semanal (AC → P); AC seguido de docetaxel (AC → D); taxano, doxorubicina y ciclofosfamida (TAC); o carboplatino y taxano (CbT) en CMTN.(48) En cualquier caso y aunque pueda resultar difícil establecer un esquema óptimo de QTN, el uso de antraciclinas y taxanos parece obtener mayor porcentaje de respuestas, impactando en la indicación de cirugía conservadora.(50)

En pacientes con CM HER2+, la adición de trastuzumab a la QTN demostró inducir una tasa de RCp del 30%.(51) Posteriormente, los ensayos NeoSphere y TRYPHAENA

exploraron el bloqueo dual de anticuerpos HER2 utilizando trastuzumab más pertuzumab combinado con quimioterapia, logrando tasas de RCp del 50-60%.(52,53)

La terapia hormonal neoadyuvante está indicada para reducir la extensión del tumor y facilitar la cirugía en pacientes que son elegibles para tratamiento neoadyuvante, pero no con quimioterapia. Se ha utilizado tradicionalmente en pacientes de edad avanzada cuando cumplían estos requisitos, si bien hay cada vez más datos para plantear su uso en pacientes postmenopáusicas de bajo riesgo seleccionadas mediante test genómicos predictivos o bien, mediante biomarcadores dinámicos de respuesta al tratamiento como el stop proliferativo determinado mediante Ki67.(54–56)

#### Implicaciones en el manejo quirúrgico

Al reducir el tamaño tumoral tras tratamiento neoadyuvante, existe la posibilidad de mejorar los resultados estéticos, incluso para pacientes que eran candidatas a cirugía conservadora al diagnóstico.(44) La terapia neoadyuvante también reduce el compromiso de los ganglios linfáticos, en aproximadamente el 40% cuando el tratamiento incluye una antraciclina más un taxano, y en más de la mitad de las pacientes con CM HER2+ que reciben QTN más terapia anti-HER2. Este hecho disminuye la necesidad de linfadenectomía axilar que es la principal causa de secuelas a largo plazo y de morbilidad relacionada con linfedema.(50,52,53) En aquellas pacientes sin afectación ganglionar al diagnóstico, la BSGC ha demostrado ser precisa y tener alta sensibilidad, evitando la linfadenectomía en caso de resultado negativo.(57) Todavía es controvertido si las pacientes con afectación ganglionar al diagnóstico, y respuesta clínica completa pueden evitar de manera segura la linfadenectomía.(58,59) Sin embargo, en los centros en los que se hayan validado, tanto la estadificación axilar precisa como la disección axilar dirigida se consideran en la actualidad técnicas seguras y de utilización estándar.(60,61)

#### **1.1.5.2.2. LA TERAPIA NEOADYUVANTE COMO MODELO PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS**

En 2014 y, tras analizar datos de casi 12.000 pacientes, Cortázar et al. demostraron el valor pronóstico de alcanzar RCp tras tratamiento neoadyuvante para los diferentes subtipos de CM.(36) Aquellas pacientes con RCp tras cirugía, presentaron una

supervivencia libre de recaída (SLR) y una SG más prolongadas, especialmente para el CMTN tratado con QTN y en tumores RH-/HER2+, tratados con QTN y trastuzumab. Para el resto de subtipos, se observó la misma tendencia, aunque sin alcanzar la significación estadística.(36)

Con base en la asociación entre la RCp y los resultados a largo plazo para pacientes con CM, la agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) publicó ese mismo año pautas que proponían el uso de la RCp como una medida de resultado válida para obtener la aprobación acelerada de nuevos medicamentos en desarrollo.(62) Por tanto, se fijaba el contexto neoadyuvante como plataforma para el ensayo de nuevos medicamentos que pudieran mejorar la supervivencia de las pacientes, especialmente en el caso de tumores más agresivos. Los resultados de los ensayos NeoSphere y TRYPHAENA son un claro ejemplo de esta medida, llevando a la aprobación de la combinación de pertuzumab más trastuzumab, en base a la tasa de RCp obtenidas y a los datos de beneficio en el contexto avanzado y adyuvante, para el tratamiento neoadyuvante del CM HER2+.(52,53)

#### **1.1.5.2.3. LA TERAPIA NEOADYUVANTE COMO MODELO PARA INVESTIGACIÓN**

El uso del modelo neoadyuvante en investigación ha provocado un cambio de paradigma en la aprobación de nuevos fármacos para el tratamiento del CM. Tradicionalmente, los medicamentos se desarrollaban para el tratamiento de la enfermedad metastásica y llevó años que se usaran en el tratamiento de la enfermedad precoz. El objetivo actual es permitir que los pacientes se beneficien lo antes posible de tratamientos más eficaces sin perder de vista el equilibrio entre seguridad y eficacia, cuando la enfermedad es curable.(48)

##### Ventajas del modelo neoadyuvante

Utilizar el modelo neoadyuvante en investigación tiene tres ventajas fundamentales: la obtención de resultados clínicamente objetivos en unos pocos meses, el potencial para obtener evidencia sobre eficacia al tratar a menos pacientes de los requeridos en estudios de adyuvancia y la posibilidad de realizar estudios *in vivo* de biomarcadores que pueden utilizarse como factores pronósticos o predictivos de respuesta a un tratamiento neoadyuvante estándar o en “estudios de ventana”.(48) La identificación de

biomarcadores predictivos de respuesta es una estrategia especialmente interesante, dado que permitiría modular la decisión terapéutica, ya desde un momento inicial.

#### Limitaciones del modelo neoadyuvante

A pesar de las grandes ventajas del uso del modelo neoadyuvante para la investigación, también existen algunas limitaciones. Aunque el aumento de la RCp obtenido por un fármaco, generalmente se traduce en un beneficio en el entorno adyuvante o metastásico del CM, existen algunas excepciones. En este sentido, es conocido el ejemplo de bevacizumab, que a pesar de lograr aumentar la tasa de RCp en CMTN tratado con intención neoadyuvante, no ha demostrado beneficio en el entorno adyuvante. Por lo tanto, los resultados obtenidos en una determinada indicación no siempre pueden extenderse a otras indicaciones dentro de la misma enfermedad.(63,64)

El desarrollo de biomarcadores tempranos de respuesta farmacodinámicos o metabólicos, como se ha sugerido para Ki67, puede ayudar a abordar algunas de estas limitaciones.(56,65)

### **1.2. LA INTRODUCCIÓN DE LA INMUNOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE DEL CÁNCER DE MAMA**

En el CM, al igual que en muchos otros tumores, el desarrollo de la inmunoterapia no siempre ha ido paralelo al conocimiento del microambiente tumoral inmune y su interacción bidireccional con las células tumorales. De hecho, esta limitación es más notoria en los llamados tumores inmunológicamente “fríos” que en los “calientes”. Por este motivo, en la introducción de esta tesis doctoral, se hablará inicialmente de la inmunoterapia para después revisar el papel del microambiente y biomarcadores inmunes en el CM.

Como se ha introducido previamente, el CM es una enfermedad heterogénea, tanto a nivel histológico como molecular. Además de las diferencias en la expresión de RH y HER2, los subtipos difieren en su perfil inmune, más concretamente en la cantidad y composición de los linfocitos infiltrantes de tumor (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TIL), expresión del ligando 1 de muerte programada (PD-L1), antígenos asociados a tumor y en la carga tumoral mutacional (Tumor Mutational Burden, TMB), entre otros.(66,67)

Aunque se ha catalogado el CM como un tumor inmunológicamente “frío”, el análisis con perfiles de poblaciones linfocitarias o con firmas de expresión inmune muestra una importante heterogeneidad y permite identificar una proporción relevante de perfiles con activación inmune alta e intermedia que tienen diferente pronóstico y respuesta al tratamiento.(68–70)

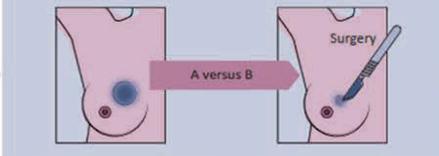
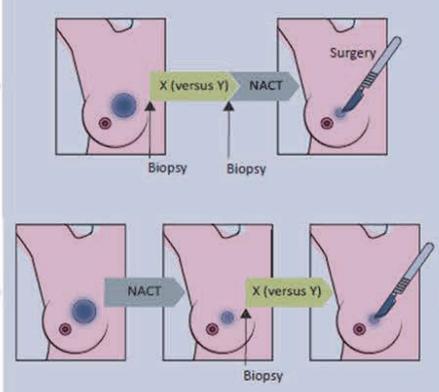
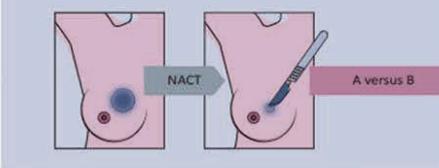
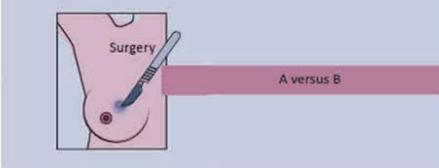
Inicialmente, el desarrollo de la inmunoterapia fue más lento para el CM que para otros tumores sólidos, sin embargo, los ensayos que investigan agentes inmunoterapéuticos para el CM han crecido exponencialmente en los últimos años.(71) Cabe destacar que estos ensayos se están desarrollando en paralelo en el contexto metastásico y para la enfermedad precoz. Este aspecto resulta especialmente interesante, dado que como se ha expuesto previamente, la actividad de los nuevos fármacos tradicionalmente se ha explorado en el entorno avanzado de la enfermedad y actualmente, estamos asistiendo a un cambio de paradigma en este sentido. Otra justificación adicional para este enfoque es la noción de que los CM se vuelven menos inmunológicamente sensibles a lo largo del tiempo, lo que se traduce en una disminución de TIL y la baja expresión de firmas inmunes en muestras de pacientes metastásicas en comparación con tumores primarios.(72,73)

Para la enfermedad precoz, los escenarios más evaluados están siendo los subtipos CMTN y luminal B, en el contexto neoadyuvante (incluyendo ensayos tipo “ventana de oportunidad”) y en combinación con otras modalidades terapéuticas, como la quimioterapia, inmunoterapia, terapias dirigidas, virus oncolíticos, tratamientos locales (radioterapia y crioterapia) y vacunas.(74)

### **1.2.1. ENTORNOS CLÍNICOS PARA EL DESARROLLO DE LA INMUNOTERAPIA EN CÁNCER DE MAMA PRECOZ**

Actualmente, el escenario más frecuente para el desarrollo de inhibidores del punto de control inmunitario (Immune Checkpoint Inhibitors, ICI) en CM es el neoadyuvante, con la RCp como el variable de eficacia principal. Dado que la RCp es un sustituto más débil de beneficio a largo plazo en CM luminal que en HER2+ o CMTN, a veces se reemplaza por la carga de cáncer residual (Residual Cancer Burden, RCB) 0 y 1 en este subtipo.(37) La figura 3 ilustra distintos escenarios clínicos para ensayar ICI en CM precoz.

Figura 3. Representación de distintos escenarios clínicos para ensayar inhibidores del punto de control inmune en cáncer de mama precoz

TYPE OF SCENARIO	TIMING IN RELATION TO SURGERY	PRIMARY TRIAL ENDPOINTS	(DIS)ADVANTAGES
<b>A Neoadjuvant therapy</b> (usually 3–6 months)		pCR RCB 0-1 EFS	No improvement allows for early discontinuation after ~100–200 patients  More definitive endpoint but needs a fully powered trial (several hundred patients or ≥1000 patients)
<b>B Window of opportunity</b> (usually 3–6 weeks) • Before neoadjuvant therapy  • After neoadjuvant therapy (but before surgery!)		Biomarkers (e.g. ↑CD8+ T cells)  Biomarkers (e.g. ↑CD8+ T cells)	Allows testing novel agents over a short period of time and in untreated patients  Expose untreated patients to combinations with limited safety data  If the target biomarker change is not seen, allows for early discontinuation (<100 patients)  Tumor heterogeneity might interfere with the results
<b>C Post-neoadjuvant therapy</b> (usually 6–12 months)		(i) DFS	The target population being at high risk of relapse (residual disease after NACT) the size of the trial is smaller than for an adjuvant trial, but prior drug exposure might have made the tumor more 'resistant'
<b>D Adjuvant therapy</b> (usually 12 months)		(i) DFS	The classical and most definitive trial, but will expose many patients to unnecessary treatment escalation (it very seldom happens that these patients can be identified 'a posteriori')

A versus B: immunotherapy intervention versus standard of care; DFS: disease-free survival; EFS: event-free survival; NACT: neoadjuvant chemotherapy; pCR: pathological complete response; RCB: residual cancer burden; X (versus Y): short immunotherapy intervention (versus placebo).

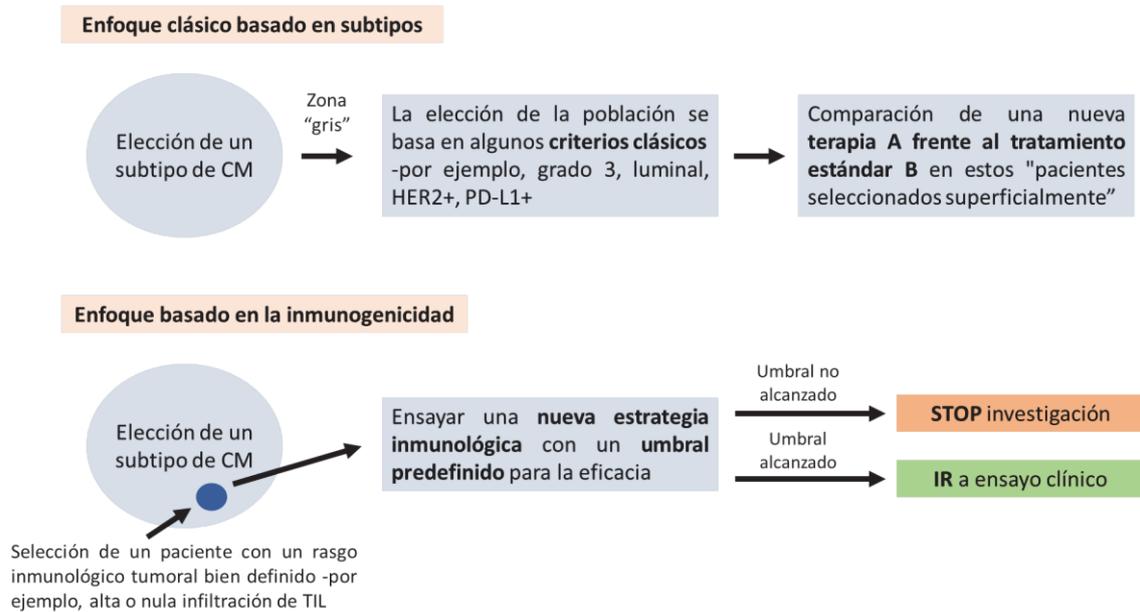
Adaptado de: Franzoi M, et al. Immunotherapy for early breast cancer. *Annals of Oncology*, 2020

Tras la cirugía, los ensayos pueden realizarse en el entorno adyuvante o post-neoadyuvante. Aunque el entorno adyuvante permite endpoints más definitivos, generalmente la SLE expone a muchas pacientes a una escalada de tratamiento innecesaria, siendo compleja la identificación de aquellas que realmente se benefician de estrategias adicionales.(74) Cuando el ensayo se realiza en el entorno post-neoadyuvante, la población requerida es menor y la exposición farmacológica previa puede condicionar resistencia tumoral a los enfoques más novedosos.(74)

En el contexto neoadyuvante, los ensayos tipo “ventana de oportunidad” realizados antes o después de un tratamiento neoadyuvante completo, utilizando los cambios de biomarcadores como criterio principal de valoración están ganando popularidad. Estos ensayos tienen como ventajas, el poder probar nuevos agentes durante un período corto, en pacientes que no han recibido tratamiento previamente (en terapias de inducción), permitiendo una evaluación rápida de la eficacia farmacológica (sobre un criterio de valoración biológico) y, en última instancia, contribuyendo a mejorar el conocimiento biológico.(74) Sin embargo, esta estrategia no está exenta de limitaciones como son la exposición de pacientes que no han recibido tratamiento previo a agentes o combinaciones con beneficio desconocido y datos de seguridad limitados, y el hecho de que la heterogeneidad tumoral podría interferir en investigaciones sucesivas. Además, la ausencia de biomarcadores sustitutivos validados para los resultados a largo plazo limita la predicción del beneficio terapéutico.(74)

En cuanto a la selección de la población de estudio, los ensayos clínicos basados en inmunoterapia en CM precoz pueden seguir dos enfoques (Figura 4): A) un enfoque clásico basado en subtipos, en el que el investigador elige un subtipo de CM para testar un tratamiento novedoso y selecciona los sujetos utilizando criterios clínicos clásicos, o B) un enfoque inmunogénico más sofisticado, a través del cual la selección de pacientes se realiza por características tumorales e inmunes, más allá de los subtipos de CM estándar. En este último caso, el nuevo tratamiento se basa en una hipótesis preclínica o clínica y se ensaya con un umbral predefinido de eficacia, que guiará pasos adicionales (continuar con un ensayo clínico aleatorizado o interrupción temprana).(74) El enfoque basado en la inmunogenicidad es en el que tiene especial interés el entorno académico, ya que su desarrollo podría facilitar la identificación temprana de combinaciones activas, así como la eliminación de regímenes ineficaces. Este enfoque, más transversal y acorde al conocimiento real del microambiente y biomarcadores inmunes, es de menor interés para las compañías farmacéuticas dado que el diseño basado en subtipos es más adecuado para la aprobación rápida de medicamentos e intereses comerciales.

Figura 4. Selección de la población para ensayos clínicos basados en inmunoterapia en cáncer de mama precoz



CM: cáncer de mama. HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. PD-L1: ligando 1 de muerte programada. TIL: linfocitos infiltrantes del tumor.

Imagen adaptada de: Franzoi M, et al. Immunotherapy for early breast cancer. *Annals of Oncology*, 2020

## 1.2.2. ESTRATEGIAS DE COMBINACIÓN DE INMUNOTERAPIA

A continuación, se desarrollan las estrategias de combinación con quimio-inmunoterapia y antiHER2-inmunoterapia. Otras combinaciones de la inmunoterapia, en el contexto neoadyuvante, incluyen las terapias dirigidas, virus oncolíticos, radioterapia, crioterapia y vacunas.(74) No se desarrolla este aspecto por no ser objetivo principal de la tesis doctoral.

### 1.2.2.1. ESTRATEGIA DE COMBINACIÓN: QUIMIO-INMUNOTERAPIA

Los estudios preclínicos sugieren que varios agentes quimioterapéuticos pueden ejercer un efecto inmunoestimulante, ya sea inhibiendo las células inmunosupresoras y/o activando las células efectoras o aumentando la infiltración de células T y la inmunogenicidad del tumor.(75,76) Específicamente, las antraciclina activan las células dendríticas y la subsiguiente respuesta específica de las células T.(75,77) Los taxanos son capaces de reducir las células inmunosupresoras, inducir TIL y reprogramar los macrófagos asociados al tumor (Tumor-associated macrophages, TAM).(75,77,78)

La mayoría de estudios que investigan aspectos relacionados con quimio-inmunoterapia en CM se han realizado en el subtipo CMTN. Algunas de las razones son el hecho de que el CMTN se caracteriza por un infiltrado inmunitario más inmunológico, niveles más altos de expresión de PD-L1 y mayor inestabilidad genómica, en comparación con otros subtipos de CM.(66,79,80) También es el subtipo de CM con la mayor necesidad médica, dado el pobre pronóstico, especialmente en enfermedad avanzada. Inicialmente, algunos ensayos investigaron los ICI como monoterapia para este subtipo en el contexto metastásico.(81,82) Aunque las tasas de respuesta fueron modestas en población no seleccionada, éstas fueron más frecuentes en pacientes sin tratamiento previo y en aquellas cuyos tumores contenían alto número de TIL y/o expresión de PD-L1.(82) Para la combinación, cabe destacar los ensayos clínicos IMpassion130 y KEYNOTE-355 que llevaron a la aprobación de atezolizumab y pembrolizumab en combinación con quimioterapia, para el tratamiento de pacientes con CMTN localmente avanzado irsecable o metastásico PD-L1  $\geq$  1% o score positivo combinado (combined positive score, CPS)  $\geq$  10, respectivamente.(83,84) Otros ensayos clínicos como el IMpassion131, han demostrado resultados negativos a pesar de incluir un análisis de subgrupos según expresión de PD-L1.(85) En este sentido, el grado en que la quimioterapia condiciona la eficacia de la inmunoterapia aún no está completamente dilucidado.

Este razonamiento se puede hacer extensivo al contexto neoadyuvante, en el que el ensayo I-SPY2 demostró por primera vez resultados de eficacia prometedores con la combinación de pembrolizumab y paclitaxel.(86) Sin embargo, posteriormente, los ensayos GeparNuevo y NeoTRIPaPD-L1 informaron de resultados negativos.(87,88) La elección de la quimioterapia podría, en parte, explicar algunos de los resultados contradictorios observados en el entorno inicial. Estos resultados refuerzan la idea de que el microambiente tumoral más adecuado para el desarrollo de la inmunoterapia parece corresponder a la fase inicial y, de hecho, éste ha sido el contexto en el que se ha aprobado recientemente la indicación de pembrolizumab neoadyuvante y adyuvante para el CMTN localmente avanzado. El estudio Keynote-522, que exploró el beneficio de pembrolizumab asociado a QTN basada en paclitaxel, carboplatino y antraciclinas, para el tratamiento de las pacientes con CMTN estadio II o III demostró un aumento significativo en la tasa de RCp para la combinación con inmunoterapia (64,8 % vs 51,2;  $p < 0,001$ ). (89) Esta diferencia se ha mantenido significativa para la supervivencia libre de

evento a 36 meses (84,5 % vs 76,8;  $p < 0,001$ ), publicada este mismo año.(90) Sin embargo, es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales para identificar a las pacientes que realmente se benefician de esta estrategia.(74)

El CM luminal se considera un tumor inmunológicamente "frío", asociado a niveles más bajos de TIL, TMB y expresión de PD-L1.(66,79,91) Sin embargo, este subtipo también se caracteriza por un alto grado de heterogeneidad y algunos tumores con RH+ pueden presentar niveles elevados de TIL, así como de TMB.(92) La asociación de la inmunoterapia con la quimioterapia es una de las estrategias en investigación dentro de este subgrupo. En el ámbito metastásico, la combinación de pembrolizumab con eribulina no mostró ningún beneficio adicional en tasa de respuesta global en comparación con la eribulina en monoterapia.(93) En el estudio I-SPY2, la combinación de pembrolizumab con QTN casi triplicó las tasas de RCp en CM RH+, lo que sugiere que al igual que ocurre en el CMTN, la actividad de la inmunoterapia podría ser mayor en la fase inicial.(94)

#### **1.2.2.2 ESTRATEGIA DE COMBINACIÓN: ANTIHER2-INMUNOTERAPIA**

Además de la inhibición de la vía de HER2, trastuzumab tiene varias propiedades inmunoestimulantes. Puede inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, aumentar la liberación de antígenos y la presentación cruzada, y aumentar las células T CD4 y CD8 específicas de HER2.(95,96)

En el entorno metastásico, la combinación de un ICI y trastuzumab tras progresión a un régimen basado en trastuzumab se investigó por primera vez en el estudio PANACEA, que informó de una tasa de respuesta del 15% restringida a los tumores PD-L1 positivos.(97) Actualmente, están en marcha algunos estudios que incluyen estrategias para potenciar la actividad de las células Natural Killer (NK) asociadas a inmunoterapia y agentes anti-HER2 (NCT03414658, NCT04143711).

Aunque aún no se han obtenido datos concluyentes en el escenario metastásico, las combinaciones de ICI con agentes anti-HER2 ya se están probando en la enfermedad inicial. El ensayo fase III IMpassion050 no alcanzó el objetivo de aumentar la tasa de respuestas tras comparar atezolizumab o placebo combinados con QTN y bloqueo dual anti-HER2.(98) El ensayo fase III APTneo (NCT03595592) que valora el beneficio de

añadir atezolizumab a un régimen de QTN sin antraciclinas y bloqueo dual anti-HER2 está pendiente de resultados. Otros ensayos están investigando la desescalada de la quimioterapia en el marco neoadyuvante, con la combinación de inmunoterapia y el bloqueo dual anti-HER2 (NCT03988036, NCT03820141).

### **1.2.3. BENEFICIO POTENCIAL DE AÑADIR INMUNOTERAPIA EN LA FASE INICIAL**

La posibilidad de inducir memoria inmunológica con ICI es una estrategia especialmente atractiva en el CM precoz, ya que en el caso de la enfermedad con RH+, las recidivas pueden aparecer incluso 20 años después del tratamiento del tumor primario.(99) En el caso de tumores agresivos como el CMTN, para el que las opciones terapéuticas eficaces en la enfermedad metastásica son escasas, mejorar las posibilidades de curación con la adición de estos agentes parece un enfoque lógico. Otra estrategia interesante es lograr la desescalada de la quimioterapia con inmunoterapia en pacientes bien seleccionados. De comprobarse eficaz, reduciría la toxicidad de la quimioterapia, incluyendo los efectos a largo plazo como la cardiotoxicidad, la neuropatía y las neoplasias primarias secundarias. Sin embargo, hay que tener en cuenta el riesgo de desarrollar endocrinopatías y toxicidades inmunomediadas irreversibles como hipotiroidismo o hipertiroidismo, diabetes tipo 1, insuficiencia suprarrenal e hipofisitis.(100) Los ensayos que combinan ambas estrategias en fase inicial podrían aumentar el número de supervivientes de CM con secuelas crónicas. Además, una gran proporción de pacientes con CM luminal y HER2+ se curan con los tratamientos estándar y alrededor del 40% de las pacientes con CMNT alcanzan RCp.(101) Los ensayos clínicos deberían, por tanto, incluir un análisis del impacto en la calidad de vida, ya que la necesidad de terapias sistémicas para erradicar micrometástasis no siempre es fácil de determinar y la magnitud del beneficio puede variar en gran medida, lo que hace que el riesgo supere al beneficio en algunos casos.

Por todo lo mencionado, resulta fundamental aunar nuestros esfuerzos para identificar a las pacientes que podrían beneficiarse de una intensificación del tratamiento en la fase inicial y, al mismo tiempo, desarrollar biomarcadores para reconocer a las pacientes con mayor riesgo de recaída y con riesgo alto de desarrollar efectos adversos graves relacionados con el sistema inmunitario.

### **1.3. MICROAMBIENTE INMUNE EN CÁNCER DE MAMA**

La inflamación desempeña un papel fundamental en el reconocimiento y la erradicación del cáncer. Hace más de 60 años, Macfarlane Burnet introdujo el concepto de inmunovigilancia, para describir el proceso por el que el sistema inmunitario reconoce las células transformadas e inhibe su crecimiento.(102) Existe evidencia clínica y experimental creciente, que sugiere que el cáncer provoca una respuesta inmunitaria mediante la expresión de nuevos antígenos o mediante la modificación de su microambiente, lo que acaba desencadenando una interacción compleja y dinámica con el sistema inmunitario (inmunoedición del cáncer). Este proceso está compuesto por tres fases entrelazadas: la eliminación (que coincide con la inmunovigilancia), en la que el reclutamiento de células inmunitarias conduce a la erradicación de las células tumorales; el equilibrio, en el que se establece una comunicación cruzada entre las células cancerosas y las inmunitarias; y el escape, en el que las células tumorales comienzan a expandirse de forma desenfrenada como resultado de la resistencia inmune adquirida.(103) En este proceso complejo y dinámico, el microambiente tumoral (tumor microenvironment, TME) desempeña un papel clave y los avances su conocimiento se traducen en aplicaciones clínicas, terapéuticas y de pronóstico.

El TME en el CM implica células tumorales e inmunitarias, factores locales y células estromales de los tejidos locales y distantes. La interacción entre las células neoplásicas y su microentorno juega un papel fundamental en la proliferación y evasión tumoral, así como, en la respuesta terapéutica.(104)

Dado que el TME se reconoce cada vez más como diana terapéutica, su evaluación patológica se ha convertido en un componente crítico del tratamiento del CM. La última clasificación de la OMS para el CM reconoce el patrón de respuesta fibrótico como un factor pronóstico e incluye recomendaciones sobre la evaluación de los TIL y la expresión de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1)/PD-L1, con fines terapéuticos.(8)

### **1.3.1. COMPONENTES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL Y SUS INTERACCIONES**

El TME en el CM puede dividirse en componentes celulares, solubles y físicos. Los componentes celulares pueden subdividirse en locales (intratumorales), regionales (mama) y metastásicos.(105) El compartimento local se refiere a las características biológicas de las células tumorales y de las células inflamatorias infiltrantes del tumor, incluyendo linfocitos, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos y neutrófilos.(106) El compartimento regional hace referencia a la interacción entre las células tumorales y las células adyacentes en el estroma, especialmente en el borde de infiltración.(105) El compartimento metastásico expone a las células del huésped en los ganglios linfáticos y órganos distantes, formando nuevos TME.(107,108) Entre los componentes solubles y físicos se incluyen enzimas, citoquinas y factores de crecimiento, con implicaciones en la evasión y progresión tumoral.

### **1.3.2. MICROAMBIENTE LOCAL**

Aunque el CM no se considera un tumor inmunológicamente “caliente”, se puede encontrar un alto número de TIL en CM de alto grado, con RH- o HER2+.(79) Los TIL en el CM son predominantemente células T, con un porcentaje muy inferior de células B.(109) Los diferentes subtipos de células T ejercen efectos únicos en el TME (figura 5). Las células T citotóxicas CD8 eliminan las células tumorales liberando granzima y perforina, mediadas por la secreción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Entre las células T CD4, las helper de tipo 1 (Th1), inducidas por señales de IFN- $\gamma$  e IL-12, autorizan a las células presentadoras de antígenos para la diferenciación efectiva de las células T CD8 y la expansión clonal.(110) Las células T helper de tipo 2 (Th2) tienen funciones más variadas en la progresión del CM. Las células T auxiliares foliculares (Tfh) desempeñan un papel importante en la maduración de las células B específicas de antígeno, promoviendo la diferenciación de las células de memoria locales y apoyando el desarrollo de los órganos linfoides terciarios, mejorando así la respuesta inmunitaria antitumoral local.(111) Las células T reguladoras (Treg) son moduladores básicos de la homeostasis y la tolerancia del sistema inmunitario y su presencia en el TME promueve la inmunosupresión a través de citoquinas como la interleucina-10 (IL-10), factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la supresión directa del contacto célula-célula.(112) En general, la presencia

de una respuesta Th1 se asocia a mejor evolución; mientras que las Treg pueden favorecer la progresión del CM.(110,112)

El papel de las células B que infiltran el tumor sigue siendo difícil de determinar. Se han descrito tanto efectos protumorales como antitumorales dependiendo de la composición del TME. Un análisis reciente en modelo murino, ha demostrado que sus actividades antitumorales están mediadas por el reconocimiento de antígenos específicos del tumor y la producción de anticuerpos o la función de las células presentadoras de antígenos (Antigen-Presenting Cells, APC).(113) Las células B pueden encontrarse en estrecha proximidad con las células T, especialmente en las estructuras linfoides terciarias del TME, y su presencia se considera un factor pronóstico favorable.(114) Tras la exposición al antígeno, las células B se diferencian en células plasmáticas. Las células B pueden ser también un mediador crucial del crecimiento tumoral, incluyendo la promoción de las metástasis del CM al convertir las células T en reposo en Treg, si bien la importancia clínica sigue siendo difícil de establecer por el momento.(115)

Las células dendríticas (Dendritic Cells, DC) son las APC más potentes, responsables de presentar los antígenos derivados de tumores a las células T. Al interactuar con las células T, las DC maduran y se vuelven más potentes en la estimulación inmunológica. Las células tumorales inhiben la maduración de las DC, por lo que las DC infiltradas por el tumor tienden a mostrar un fenotipo inmaduro con una capacidad reducida de presentación de antígenos derivados del tumor y un registro de moléculas coestimuladoras limitado.(116)

Los TAM son las principales células de la inmunidad innatas en el tumor. Presentan dos fenotipos polarizados (M1 y M2) en función de la exposición a las citoquinas. Los macrófagos M1, el fenotipo clásicamente activado, son estimulados por citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral (TNF)) y a su vez ejercen efectos antitumorales mediante la producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (ROS) y la liberación de citoquinas proinflamatorias.(117) Por el contrario, los macrófagos M2, el fenotipo activado alternativamente, son activados por citoquinas Th2 (IL4, IL10 e IL-13) y son de naturaleza protumoral. Suprimen la respuesta antitumoral, inducen la angiogénesis y favorecen el crecimiento tumoral y la metástasis.(118)

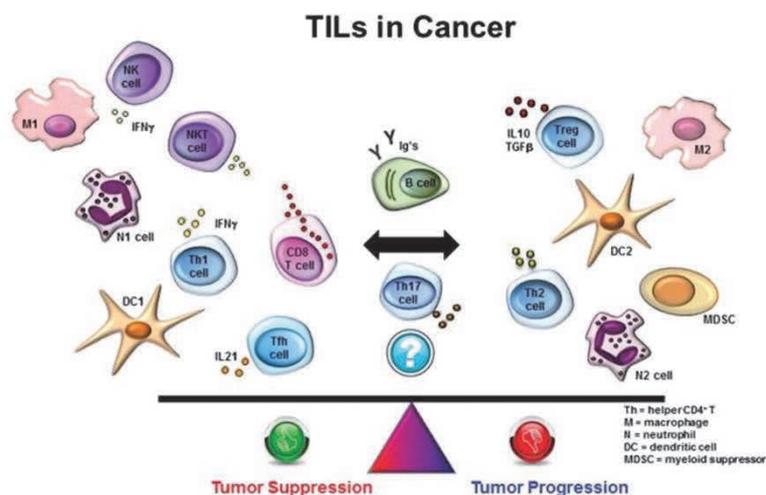
Los neutrófilos son cada vez más reconocidos como células inmunitarias infiltrantes de tumor. Tanto los precursores de neutrófilos en la médula ósea como los neutrófilos maduros periféricos presentan una significativa heterogeneidad.(119) Esta heterogeneidad es aún mayor en el contexto del cáncer, donde dichos progenitores pueden dar lugar a subconjuntos específicos de neutrófilos.(120) Al igual que los TAM, los neutrófilos asociados a tumor (Tumor Associated Neutrophils, TAN) presentan fenotipos polarizados. Los TAN proinflamatorios y antitumorales N1 son generados por la exposición al IFN- $\gamma$  y al IFN- $\beta$ , mientras que los TAN antiinflamatorios y protumorales N2 son inducidos por la exposición a TGF- $\beta$ .(121) En cuanto a sus actividades antitumorales, se ha descrito la expresión del receptor proteína-tirosina quinasa MET por parte de los neutrófilos, que inducen apoptosis de las células tumorales mediante procesos oxidativos. Los neutrófilos también pueden eliminar las células neoplásicas mediante la ingestión de su membrana plasmática (trogocitosis) o la creación de un microambiente rico en IFN- $\gamma$ .(119) Algunos de los mecanismos protumorales de los neutrófilos incluyen el daño oxidativo en el ADN, el estímulo directo de la proliferación tumoral o antagonizando la senescencia, y la promoción de la transición epitelio-mesénquima a través de SNAI1, entre otras vías. A su vez, la activación de *NOTCH1* en las células neoplásicas promueve el TGF- $\beta$  dependiente de los neutrófilos inmunosupresores, interfiriendo con la respuesta inmunitaria antitumoral.(119) Otro mecanismo interesante es el que se refiere a la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos protumorales (Neutrophil Extracellular Traps, NET) por los TAN. Las NET liberadas en el microambiente tumoral pueden proteger a las células tumorales de la interacción con el sistema inmunitario citotóxico.(122) Finalmente, la expresión de PD-L1 por parte de los neutrófilos dificulta la inmunidad antitumoral.(123) Asimismo, se ha relacionado la infiltración tumoral por neutrófilos con resistencia a la inmunoterapia y terapia antiangiogénica.(124) Pese a que el conocimiento sobre las implicaciones de los TAN está en aumento, su rol en humanos aún no está tan completamente definido.

Las células inmunes poseen receptores en su membrana que al hacer sinapsis con sus correceptores en otras células inmunes conllevan acciones activadoras o inhibitoras. En este sentido, PD1 y su ligando PD-L1, que se expresa en las células malignas y en las células inmunitarias (células B, células T, DC y macrófagos), se encuentran entre los más

estudiados.(125) Cuando PD-L1 se une a PD1, se inhibe la activación de las células T, mecanismo conocido por ser uno de los principales responsables de la resistencia inmunitaria en el TME.(126) Sin embargo, la inhibición no es exclusiva de los linfocitos T, dado que también se expresan en otras células neoplásicas e inmunitarias.(125) La sobreexpresión de PD-L1 en las células tumorales del CM se ha relacionado con menor supervivencia en pacientes con CM RH+.(127) Sin embargo, al margen de las implicaciones pronósticas, la principal relevancia de esta vía radica en las terapias que implican el bloqueo de PD-1/PD-L1, especialmente para el CMTN avanzado.(104)(127)

Algunas otras moléculas del punto de control inmunitario, como la proteína asociada a los linfocitos T citotóxicos 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CTLA4), el gen de activación de linfocitos 3 (Lymphocyte-Activation Gene 3, LAG-3) y la inmunoglobulina de células T 3 (T cell immunoglobulin and mucin protein 3, TIM-3), se han identificado como reguladores cruciales de la respuesta inmunitaria, lo que ha motivado la aparición de estrategias terapéuticas dirigidas.(128) Sin embargo, el éxito de la inmunoterapia mediante el bloqueo de los puntos de control inmunitario depende de la liberación de las células T del agotamiento energético y funcional, proceso que exige la cooperación del microambiente tumoral, siendo fundamentales las interacciones entre las células tumorales y, en particular, las células inmunitarias infiltradas.(128)

Figura 5. Interacción entre diferentes subconjuntos de leucocitos y su contribución a las actividades pro- o antitumorales



Adaptado de: Salgado R, et al. The evaluation of TILs in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group. *Annals of Oncology*, 2015

### **1.3.3. MICROAMBIENTE REGIONAL**

Los fibroblastos asociados al cáncer (Cancer-Associated Fibroblast, CAF) son el componente estromal más destacado. En comparación con los fibroblastos normales, los CAF muestran un mayor índice proliferativo y defectos en las proteínas supresoras tumorales.(129) Partiendo de la alteración en la matriz secundaria a factores solubles y enzimas, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el TGF- $\beta$  y las metaloproteinasas de la matriz, los CAF inducen la progresión tumoral al promover la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la invasión.(130) Uno de los efectos del TGF- $\beta$  es impulsar la producción de colágeno I, estableciendo un microambiente protumoral de tipo fibrótico.(131) Los focos fibróticos en el CM, como ya se ha mencionado previamente, son ahora reconocidos como una característica de pronóstico histológico adverso y se incluyen en la última clasificación de la OMS.(8)

Las células endoteliales y los adipocitos son otros componentes celulares con relevancia en el TME de la mama. Ambos componentes cursan una interrelación mutua y dinámica con las células tumorales para impulsar la progresión del tumor. Es conocido que las células tumorales estimulan la angiogénesis mediante la secreción de VEGF y TGF- $\beta$ .(132) Los adipocitos viscerales, pero no los subcutáneos, promueven la proliferación tumoral e inducen la transición epitelio-mesénquima a través de la IL-6 y la IL-8.(133)

El estado de oxigenación y acidosis del TME también influyen significativamente en la biología del CM. En general, la hipoxia y la acidosis contribuyen a la invasión y progresión tumoral, selección de clones resistentes e interfieren con el efecto citotóxico de los agentes quimioterapéuticos.(104)

### **1.3.4. MICROAMBIENTE METASTÁSICO**

Cuando las células tumorales invaden los vasos linfáticos y sanguíneos inician un paso crucial en la cascada metastásica. Los altos niveles de células tumorales circulantes se asocian a un pronóstico desfavorable en pacientes con CM precoz de alto riesgo.(134)

Los ganglios linfáticos regionales son con frecuencia el primer lugar de metástasis, un indicador pronóstico clave de recurrencia y pobre supervivencia. Desde el punto de vista inmunológico, el conocimiento sobre las implicaciones de la metástasis tumoral en las funciones inmunitarias del ganglio linfático es limitado.(135) Sin embargo, está claro que

los tumores desarrollan una amplia gama de mecanismos inmunosupresores, lo que se refleja en una composición celular inmunitaria alterada (mayor densidad de Treg, menor número de DC CD38+) y diferente estructura (agrandamiento y linfangiogénesis) de los ganglios linfáticos tumorales en comparación con los ganglios linfáticos centinela no afectados.(104,107) Además, se han descrito diferencias en los niveles de expresión de las proteínas de control inmune, como PD-1 y PD-L1, del microambiente de los ganglios linfáticos y el tumor primario.(136)

El microambiente del paciente puede modificarse para formar el nicho pre-metastásico, un entorno favorable para el crecimiento del tumor en un tejido determinado antes de que se produzca afectación sistémica. El nicho pre-metastásico está regulado por factores secretados por las células tumorales y los exosomas, el reclutamiento de células inmunes y las alteraciones en las células del huésped.(137) La capacidad de las células tumorales para iniciar el crecimiento depende en gran medida de la interacción entre las células tumorales metastásicas y el TME. En este contexto, se ha comunicado un recuento de TIL sustancialmente más bajo, acompañado de un aumento en la firma de genes inmunosupresores en las metástasis del CM en comparación con los tumores primarios.(72) La disparidad de microambientes inmunitarios entre las lesiones primarias y los focos metastásicos puede contribuir, al menos en parte, a la limitada respuesta terapéutica en la enfermedad avanzada.

#### **1.4. BIOMARCADORES DE RESPUESTA INMUNE EN CÁNCER DE MAMA**

En el caso de algunas terapias dirigidas, la identificación de la diana a través de un biomarcador se correlaciona directamente con la respuesta al tratamiento (por ejemplo, HER2 y trastuzumab). Sin embargo, la interacción entre las células tumorales y el sistema inmunitario es un proceso complejo, dinámico y en evolución, que puede requerir biomarcadores integrales. Se ha descrito un elevado número de biomarcadores de respuesta inmune en CM, que se pueden estructurar en biomarcadores del microambiente tumoral y biomarcadores circulantes relacionados con el compartimento periférico, tal y como se expone a continuación.

## **1.4.1. BIOMARCADORES INMUNES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL**

### **1.4.1.1. LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR**

En 2014, Salgado et al. establecieron criterios metodológicos para cuantificar el porcentaje de TIL de muestras de CM en portaobjetos teñidos con hematoxilina y eosina, mediante microscopía óptica convencional (figura 6), que podía ser determinado fácilmente en cualquier unidad de Anatomía Patológica tras una formación adecuada y sin necesidad de técnicas especiales.(106) Los TIL estromales (sTIL), definidos como el porcentaje de área estromal del tumor que contiene un infiltrado linfocítico, se reconocieron entonces como el parámetro inmunológico más reproducible puntuado por el anatomopatólogo.(106) A diferencia de los sTIL, los TIL intratumorales se definen como linfocitos en nidos tumorales que tienen contacto célula a célula, sin estroma intermedio y que interactúan directamente con las células tumorales. Dado que se localizan en el tejido tumoral, cabe resaltar que ambas categorías representan verdaderos TIL.(106)

Aunque esta distinción pudiera resultar artificial, el objetivo de detallar el método era facilitar que grupos de investigación independientes reprodujeran los hallazgos pronósticos en CM precoz. Se convocó un grupo de trabajo con patólogos de mama para estandarizar, probar la reproducibilidad y perfeccionar el método.(138) También se creó un sitio web que permitió la formación gratuita ([www.tilsinbreastcancer.org](http://www.tilsinbreastcancer.org)). La finalidad última era establecer el rol predictivo y pronóstico de los sTIL en CM para su potencial incorporación como biomarcador a la práctica clínica habitual.

En el entorno adyuvante, la presencia de cifras elevadas de sTIL en el momento del diagnóstico se ha asociado con mayor SLE tras quimioterapia basada en antraciclinas en el CMTN y de la terapia basada en trastuzumab para el CM HER2+.(139,140) La infiltración por sTIL también se asoció con mayores tasas de respuesta a la inmunoterapia en CMTN avanzado.(81,82)

Sin embargo, es en el contexto neoadyuvante, donde existe mayor evidencia sobre su papel predictivo y pronóstico, demostrando varios estudios una correlación entre los sTIL y la RCp, en especial para el CMTN y el CM HER2+.(79) El CM con RH+ representa el subtipo de CM con menor infiltrado inmunológico, oscilando la mediana de sTIL entre el

7 y el 10 %, habitualmente más alta que los TIL intratumorales (1,5 y 5%). La biología del infiltrado inmunológico aún no se conoce por completo y varios estudios han demostrado que, al contrario que en el CMTN y el subtipo HER2+, los niveles más altos de sTIL se asocian a un peor pronóstico en este subtipo.(79,141)

De los estudios que evaluaron la asociación entre la infiltración linfocitaria obtenida en las biopsias antes del tratamiento y la probabilidad de respuesta a tratamiento neoadyuvante, la serie más amplia ha sido comunicada por Denkert et al. que incluía 3771 pacientes tratados con diferentes regímenes de QTN.(79) Los TIL se evaluaron de acuerdo a los métodos estandarizados propuestos por el “sTIL Working Group”. Los tumores luminales presentaron una proporción significativamente menor de sTILs en comparación con los CM HER2+ y los CMTN (13% frente a 19,5 y 30%, respectivamente). Los sTIL se estudiaron como variable continua y en tres categorías: baja (sTIL <10 %), intermedia (sTIL 11-59 %) y alta (sTIL ≥60 %) infiltración.(79,106) Las concentraciones de sTIL se asociaron con la RCp en todos los subtipos de CM, con tasas de RCp que aumentaron del 6% al 11% y al 28% en los grupos de baja, intermedia y alta infiltración, respectivamente, en la cohorte luminal. El papel predictivo se confirmó cuando el análisis se realizó considerando los sTIL como variable continua.(79) Cuando los sTIL se evaluaron como marcador pronóstico se observó un comportamiento opuesto entre los subtipos de CM con una asociación positiva entre los niveles crecientes de sTIL, la SLE y la SG para el CMTN y HER2+, mientras que las concentraciones bajas de sTIL se asociaron con una mayor SG en los tumores luminales. Esta correlación se confirmó en el análisis multivariable.(79) Para explicar este hallazgo, los autores sugirieron una resistencia relativa a la terapia endocrina en los tumores que expresan mayores concentraciones de sTIL y genes relacionados con el sistema inmunológico. Otras series más pequeñas confirmaron parcialmente estos hallazgos en CMTN.(142,143) Es relevante destacar que en el estudio GeparNuevo, que incluía pacientes con CMTN, los sTIL fueron un biomarcador predictivo de RCp en ambos brazos del ensayo, es decir, para la inmunoterapia combinada con quimioterapia y para la quimioterapia sola.(144)

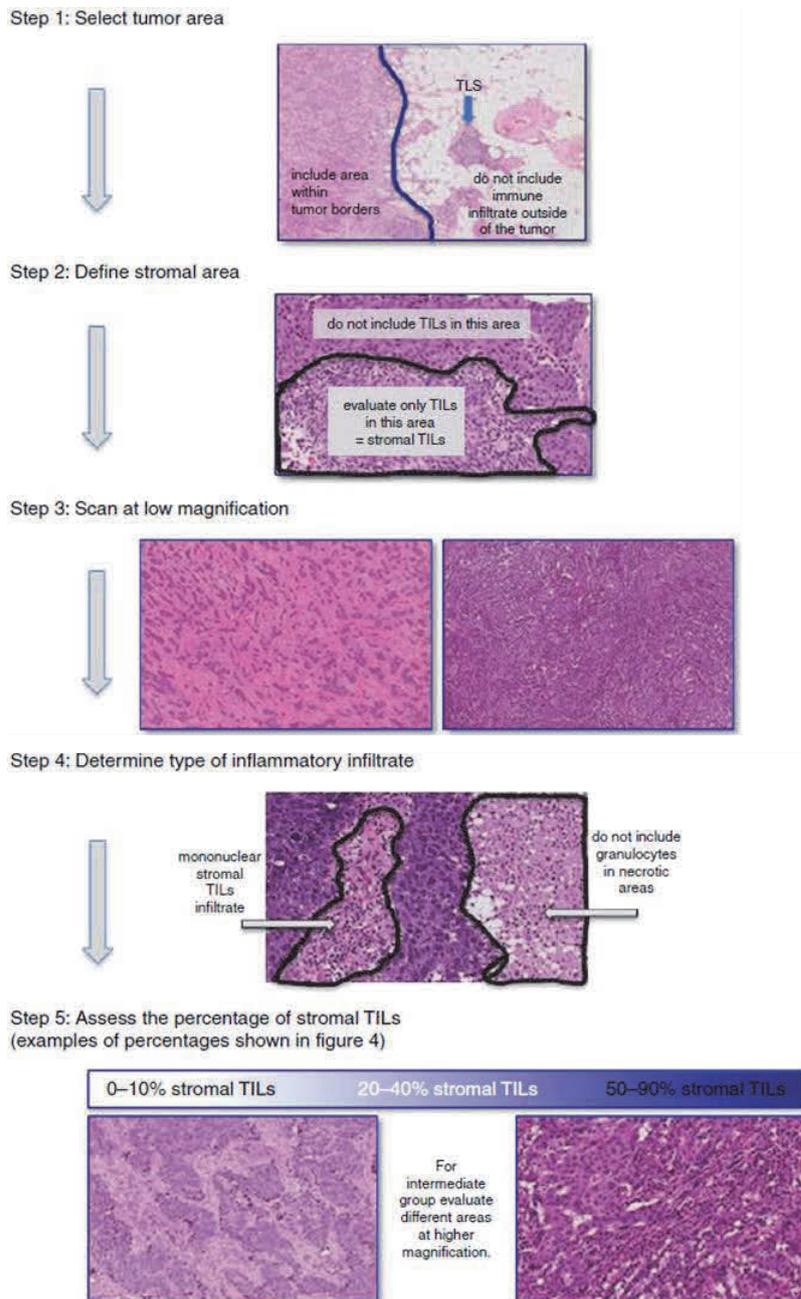
Estudios dinámicos de seguimiento de la respuesta inmunitaria durante la QTN mostraron que durante el tratamiento, los TIL se asociaron significativamente con el estado inmunitario de las muestras previas a la QTN, con pequeñas diferencias según

los subtipos.(145) La mayoría de los tumores RE+/HER2- que eran inmunológicamente fríos al inicio del tratamiento siguieron siendo fríos tras el tratamiento. Por otro lado, los CMTN cambiaron a un estado más inmunoestimulado o mantuvieron el estado inmune caliente durante el tratamiento. Asimismo, el recuento de TIL fue generalmente menor en las muestras post-tratamiento, probablemente atribuible a la linfodepleción por los agentes quimioterapéuticos o a la disminución de la reacción inmune antitumoral con la disminución de la carga tumoral.(145)

Watanabe et al. evaluaron los sTIL previos y posteriores a la QTN en una serie retrospectiva de 197 pacientes con CM, 91 de los cuales eran RH+/HER2-. Acorde a resultados previos, entre los tumores RH+/HER2-, los sTIL elevados ( $\geq 50\%$ ) constituían una proporción significativamente menor en comparación con otros subtipos (12,1%) y mostraron una tendencia a mayor tasa de RCp en comparación con los grupos baja ( $< 10\%$ ) e intermedia (10–50%) infiltración (27% frente a 6% y 7%, respectivamente). Se observó una disminución de los sTIL altos en las muestras post-QTN (5% vs 10 %). En cuanto al papel pronóstico de los sTIL en los tumores RH+/HER2-, no se observó correlación entre el valor pre-QTN y posterior al tratamiento, prediciendo los sTIL bajos posteriores a la QTN, pero no al inicio, una mejor SLE de forma significativa, resultados no confirmados para SG.(146)

Publicaciones recientes, fruto de la colaboración establecida por Salgado et al., y tras analizar datos de sTIL en más de 20.000 muestras de CM primario, confirman las asociaciones con un mejor pronóstico para el CMTN y HER2+.(138) Esto ha dado lugar a la inclusión del biomarcador TIL en la última clasificación de la OMS.(8) Por lo tanto, los TIL representan el primer marcador pronóstico biológico para el CMTN en fase inicial. Sin embargo, para el resto de subtipos, los datos indican que los TIL son un biomarcador dinámico, y encontrar una forma pragmática de guiar la terapia con agentes inmunoterapéuticos en los diferentes subtipos sigue siendo un reto. A pesar de que el papel del entorno inmunitario en los tumores luminales sigue bajo investigación, el hallazgo de altos niveles de sTIL parece constituir un factor predictivo de sensibilidad y beneficio de QTN también en tumores RH+/HER2-.

Figura 6. Método estandarizado para la evaluación de TIL en cáncer de mama



STIL: stromal tumor-infiltrating lymphocytes

Adaptado de: Salgado R, et al. The evaluation of TILs in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group. *Annals of Oncology*, 2015

#### **1.4.1.2. PD-L1**

La alta expresión de PD-L1 se ha relacionado con CM de alto grado, con RH-, HER2+ y CMTN. En cuanto a su valor predictivo, PD-L1 ha demostrado utilidad para guiar la respuesta al tratamiento con inmunoterapia, especialmente en combinación con quimioterapia, en CMTN.(127) Aunque la principal relevancia de la vía PD-1/PD-L1 radica en las terapias que la bloquean, PD-L1 resulta un biomarcador imperfecto para guiar el uso de ICI en CM.(104) Un ejemplo claro es su mayor valor predictivo en el entorno metastásico del CMTN, respecto al entorno temprano.(89,127) En cuanto a su significado pronóstico, la sobreexpresión de PD-L1 se ha correlacionado con menor supervivencia en pacientes con CM RH+.

Además de las limitaciones descritas, existen múltiples métodos de cuantificación de PD-L1 vinculados a diferentes agentes terapéuticos. Cada ensayo utiliza diferentes anticuerpos, protocolos de IHQ y plataformas, así como distintos puntos de corte para considerar la positividad de PD-L1, y evaluación en diferentes tipos celulares (células tumorales frente a células inmunitarias).(147) Más concretamente, el CPS evalúa el número de células que tiñen PD-L1 (células tumorales, linfocitos, macrófagos) en relación con todas las células tumorales viables. En este sentido, otro ejemplo práctico es las condiciones de aprobación de atezolizumab y pembrolizumab para el tratamiento de pacientes con CMTN avanzado, en base a determinación de PD-L1  $\geq 1\%$  o CPS  $\geq 10$ , respectivamente.(83,84)

Algunos retos adicionales, que añaden complejidad a la interpretación de PDL-L1, son los relacionados con la tasa de concordancia de las pruebas de PD-L1 entre diferentes patólogos, la dinámica de PD-L1 y el hecho de que una gran proporción de CM son PD-L1 negativos.(74)

#### **1.4.1.3. BIOMARCADORES AGNÓSTICOS**

La TMB elevada y la deficiencia de reparación del sistema *mismatch repair* (*Mismatch-repair deficiency*, MMRd) son biomarcadores tumorales agnósticos para inmunoterapia en tumores sólidos en el entorno metastásico, si bien su uso todavía no se ha explorado ampliamente en el entorno temprano del CM.(74) Una limitación importante de estos

biomarcadores son los diferentes puntos de corte entre los distintos estudios para definir TMB alta y baja.

La prevalencia en CM de TMB alta (definida como 10 mutaciones por megabase) se ha estimado en un 5%, siendo más frecuente en los tumores metastásicos.(148) En el estudio GeparNuevo, la TMB alta fue un biomarcador predictivo de RCp, independientemente de la adición de inmunoterapia.(144)

La frecuencia de MMRd en CM precoz es baja, ya que se presenta en < 2% de los casos y se asocia a peor pronóstico en CM con RH+.(149) Es conocido que los tumores hipermutados revelan una mayor carga de neoantígenos y actividad citolítica, lo que se ha relacionado con mayor tasa de respuesta en otros tumores como el cáncer de colon y de endometrio.(150)

#### **1.4.1.4. FIRMAS GENÓMICAS**

En las últimas décadas, el avance y la aplicación generalizada de la "ómica" ha proporcionado importantes conocimientos sobre la complejidad molecular del CM, lo que ha llevado a la exploración sistemática de nuevos métodos para identificar mejor a las pacientes con enfermedad de alto riesgo. De hecho, Oncotype DX® que es una firma de 21 genes, es un método validado para la estratificación del riesgo de recaída e indicación de quimioterapia en CM RH+/HER2-.(17)

Dado el carácter más inicial, las firmas genómicas de respuesta a la inmunoterapia en CM constituyen aún un campo en desarrollo. El estudio GeparNuevo proporcionó algunos resultados interesantes en este sentido, demostrando correlación entre los perfiles de expresión de genes inmunitarios y la RCp.(151) Aunque estos resultados son interesantes, la disponibilidad y reproducibilidad de estas pruebas supone un obstáculo para la práctica clínica.(74)

#### **1.4.1.5. MicroRNA**

Los microARN (miARN) han demostrado ser reguladores clave de la interacción entre las células tumorales y las inmunitarias, con el fin de evadir la inmunovigilancia y favorecer la progresión tumoral. En particular, su desregulación se ha relacionado con la expresión aberrante de oncogenes y genes supresores de tumores.(152) Sin embargo, como

determinantes vitales de la regulación postranscripcional, los miRNA no sólo participan en el inicio y la progresión tumoral, sino que también regulan la respuesta inmunitaria contra el cáncer.(153) Por ejemplo, algunos miRNA promueven la evasión inmune al interferir en la expresión de los puntos de control inmune, más concretamente, en la expresión de PD-L1.(152) En este sentido, existe evidencia creciente de los miRNAs moduladores del sistema inmune, como potenciales dianas para contrarrestar el escape inmunitario del cáncer.(153) No obstante, son necesarias más investigaciones clínicas centradas en estos miRNAs antes de utilizarlos como marcadores reproducibles y específicos de la enfermedad.(6)

#### **1.4.2. BIOMARCADORES CIRCULANTES**

El cáncer es una enfermedad sistémica y la inflamación prolongada es un sello distintivo del cáncer. Si esta inflamación inicia la tumorigénesis o favorece el crecimiento del tumor depende del contexto, pero en última instancia, el panorama inmunológico global más allá del tumor se altera significativamente durante la progresión tumoral.(154)

Como ya se ha descrito, cada vez asistimos a un mayor desarrollo de la terapia dirigida al sistema inmunitario para el tratamiento del CM. La modulación del sistema inmune del paciente mediante ICI ha conducido a respuestas duraderas, sin embargo, la inmunoterapia sigue siendo ineficaz para la mayoría de los pacientes.

Hasta el momento, la inmunología tumoral se ha centrado en gran medida en las respuestas inmunitarias locales, pero la inmunidad se coordina en todos los tejidos. Por ejemplo, la activación y programación de células T ocurre en los tejidos linfoides, por lo que, la respuesta inmunitaria antitumoral localizada no puede existir sin una comunicación continua con la periferia.(155)

Por todo ello, es lógico que los biomarcadores circulantes periféricos previos al tratamiento se hayan propuesto como un parámetro para mejorar la comprensión de la respuesta inmune sistémica tumoral y la estratificación pronóstica de los pacientes.(154)

### 1.4.2.1. DETERMINACIONES DE CÉLULAS INMUNES CIRCULANTES

#### a) Neutrófilos circulantes

Existe evidencia creciente sobre la modulación de los neutrófilos, a partir de señales derivadas del tumor primario, que implican tanto a sus progenitores en la médula ósea como a los neutrófilos en la circulación.(119,156) Este es un concepto emergente y fundamental en la biología de los neutrófilos, ya que se comprueba que el cáncer actúa a nivel sistémico para alterar no sólo el número de células, sino también sus propiedades y heterogeneidad, pudiendo influir en la propagación metastásica.(119) Se han descrito dos subtipos de neutrófilos circulantes; los neutrófilos de alta densidad (high density neutrophils, HDN) y de baja densidad (low density neutrophils, LDN), que reflejan funcionalmente las células TAN N1 y N2, respectivamente. Los LDN son raros en condiciones no patológicas, pero frecuentes en el cáncer, mostrando un fenotipo pro-tumoral. Aunque este fenotipo, se ha descrito fundamentalmente en modelos animales, se están realizando estudios de validación en humanos.(157)

En el contexto neoadyuvante, pocos estudios han evaluado el valor predictivo del recuento de neutrófilos de forma aislada.(158) La evidencia actual, aunque limitada, no demuestra una clara asociación entre el recuento de neutrófilos y la RCp.(159)

En cuanto a las implicaciones pronósticas de la cifra de neutrófilos en sangre periférica, y más concretamente para el CM tratado con intención adyuvante, no se ha se dispone de evidencia firme sobre su correlación con supervivencia.(160,161) Asimismo, la evidencia continúa siendo limitada para el CM tratado con QTN.(119) El recuento de neutrófilos fue un factor pronóstico independiente para la SLE en el estudio de Qian et al., tras analizar 180 pacientes con CM tratadas con QTN.(159) Por el contrario, en el análisis de Marín et al., en el que también se incluyeron pacientes con diferentes subtipos IHQ de CM, el recuento de neutrófilos no se correlacionó con SG.(162) De forma interesante, se ha comprobado un aumento de los neutrófilos LDN en sangre periférica de pacientes con CM metastásico y, dentro de la población de pacientes no metastásicas, en aquellas con mala respuesta a la QTN.(157)

## **b) Linfocitos y poblaciones linfocitarias**

Como se ha expuesto previamente, los linfocitos pueden inhibir la progresión tumoral a través de la inmunovigilancia.(163) En las pacientes con CM, se han descrito algunas alteraciones en las células T circulantes, como una menor diversidad en el repertorio de receptores de células T (T cell receptor, TCR) y una capacidad disminuida de producir IL-2 e IFN $\gamma$ .(164)(165) Sin embargo, la alteración de las células T más estudiada es la expansión de células T reguladoras CD4<sup>+</sup> supresoras (Treg) en la periferia y su infiltración en el tumor. Trabajos recientes han demostrado que las células Treg presentes en la sangre de los pacientes con CM comparten repertorios fenotípicos y de TCR con las células T intratumorales, lo que sugiere que una proporción significativa de las células Treg supresoras intratumorales se derivan de las células Treg tímicas.(166) Otra población de linfocitos supresores que desempeña un papel clave en la progresión tumoral son las células B reguladoras, que se caracterizan por la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10.(167) Las células NK periféricas de las pacientes con CM también presentan fenotipos alterados, caracterizados por la disminución de la expresión de los receptores activadores, incluidos Nkp30, NKG2D, DNAM-1 y CD16, y el aumento de la expresión del receptor inhibitor NKG2A, así como la disminución de la capacidad para eliminar directamente las células diana y degranular *in vitro*.(168)

Aunque la linfopenia se ha propuesto como un factor pronóstico adverso en las pacientes con CM, tanto en el entorno metastásico como en el neoadyuvante, su significado predictivo y pronóstico permanece poco explorado y no permite extraer conclusiones firmes al respecto.(154,164,169) En su valoración predictiva, el recuento absoluto de linfocitos fue un factor predictivo independiente de RCp en el estudio de Qian et al. (OR=4,37; IC95% 1,43-13,39).(159)

En cuanto a sus implicaciones pronósticas, aunque la evidencia es mayor para las pacientes con CM tratadas con adyuvancia, una minoría de estudios han mostrado una asociación significativa entre el recuento de linfocitos y la SLE.(161) Estos resultados no se ha confirmado en cohortes independientes ni para la SG.(160,170) Los análisis celulares genéticos, mediante citometría de flujo, han identificado poblaciones celulares específicas en sangre periférica que demuestran asociaciones entre subconjuntos de células inmunosupresoras circulantes y la respuesta al tratamiento.(154)

Específicamente para el CM, un estudio reciente demostró que los valores elevados de un subconjunto de células Treg circulantes definidas como CD45RA-FOXP3hi eran predictivos de recaída en las pacientes con CM tratadas con cirugía.(166) Para las pacientes con CM metastásico, se ha descrito una asociación significativa entre el recuento de linfocitos y la SLE para el CM HER2+ y CMTN.(171,172) En el entorno neoadyuvante, el recuento de linfocitos no se correlacionó con la SLE ni SG en el estudio de Marín et al.(162)

#### **1.4.2.2. RATIO NEUTRÓFILO-LINFOCITO**

De forma sintética, existe evidencia sobre el papel de los linfocitos en la inmunovigilancia del CM. Por el contrario, los neutrófilos suprimen la actividad citolítica de los linfocitos, lo que conduce a un aumento de la angiogénesis, crecimiento y progresión tumoral.(6) La ratio neutrófilo-linfocito (RNL), es decir, la relación entre el valor absoluto neutrófilos y el recuento absoluto de linfocitos ha emergido como un potencial biomarcador pronóstico y es de especial interés clínico debido a su accesibilidad y facilidad de cálculo a partir de analíticas sanguíneas rutinarias de los pacientes.(173)

Aunque en el CM, muchos estudios, revisiones sistemáticas y metaanálisis han explorado el biomarcador RNL, se han comunicado resultados contradictorios sobre su significado predictivo y pronóstico. Existe una marcada heterogeneidad entre los estudios, especialmente en lo que respecta a la inclusión de pacientes con diferentes estadios, subtipos moleculares, tratamientos y puntos de corte para clasificar una RNL "alta", lo que dificulta la interpretación de los resultados.(173)

Es en el contexto del CM localizado tratado con quimioterapia adyuvante donde la RNL ha demostrado mayor fiabilidad pronóstica. Un metaanálisis reciente, en el que se analizaron hasta 29 series con 18.153 pacientes que incluyeron modelos multivariados, en 21 (72,4 %) la RNL se correlacionó de forma independiente con la supervivencia (SLE, SG y/o supervivencia específica de CM (SGCM)).(158) En el entorno metastásico, los datos son más limitados. Aunque algunas series han mostrado la RNL como un buen factor pronóstico para SLE y SG, los estudios son difíciles de comparar debido a la heterogeneidad de la población (características moleculares, tipo de tratamiento, entre

otros).(174,175) Series independientes, como la comunicada por nuestro grupo, encontraron que las pacientes con CM avanzado y RNL elevada presentaron menor SG, si bien el impacto pronóstico de la RNL se derivaba de su asociación con otros factores clínicos relevantes.(176)

Los resultados son menos claros para las pacientes con enfermedad localizada tratadas con QTN y con determinación basal de RNL. Fueron Azab et al. quienes informaron por primera vez que la RNL antes de la quimioterapia era un factor independiente de mortalidad a largo plazo y lo relacionaron con la edad y el tamaño tumoral en CM.(177) Desde el punto de vista de su potencial utilidad como marcador predictivo, algunas series han encontrado asociación de la RNL con la RCp, especialmente para el CMTN. (178,179) Sin embargo, otras series independientes no han confirmado tal asociación (159,162,180,181) Suppan et al. no encontraron ninguna correlación entre la RNL y la RCp en pacientes que recibieron tanto antraciclinas como taxanos y en pacientes que sólo recibieron antraciclinas o taxanos. También compararon los diferentes subtipos moleculares de CM y no identificaron ninguna correlación entre la RNL y la RCp según subtipo.(180)

Chen et al., tras analizar una cohorte de 215 pacientes con CM tratadas con QTN, encontraron asociación entre la RNL elevada ( $RNL \geq 2.1$ ) y la SLE, permaneciendo como variable independiente en el análisis multivariable.(178) En términos de SG, Marín et al. describieron una asociación significativa para la RNL, pero ésta no permaneció como factor pronóstico independiente.(162)

Teniendo en cuenta el subtipo molecular, los resultados continúan siendo contradictorios en el entorno neoadyuvante. Para el CM RH+/HER2-, se ha informado la RNL como factor pronóstico independiente para la SLE (HR=3,87; IC 95%: 1,64-9,14) y SG (HR=24,87; IC 95%: 3,1-201,3).(182) En cambio, Asano et al. mostraron que en el subgrupo de pacientes con CMTN (n=61), la RNL estaba correlacionada con la SLE en el análisis univariable, pero no se confirmó como factor pronóstico independiente.(183) Un estudio del Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM) usando la RNL derivada (neutrófilos/leucocitos-neutrófilos) sí ha encontrado una relación negativa con la RCp en CMTN.(184)

Esta heterogeneidad en los resultados para la RNL en el contexto neoadyuvante podría justificarse por varias causas. En primer lugar, podría verse influida por los diferentes subtipos moleculares analizados y también por el pequeño tamaño muestral (inferior al contexto adyuvante). Otra limitación se refiere a los fármacos utilizados. Gran parte de las series publicadas, aunque informaron del uso de antraciclinas y/o taxanos, no describieron el uso secuencial o concomitante de dichos regímenes según directrices internacionales.(33,34,39) Igualmente, para el CM HER2+, el uso de la terapia dirigida contra el HER2 se notificó de forma inconsistente en muchos estudios. Por último, otra causa que constituye un aspecto fundamental es la que se refiere al punto de corte de la RNL. La mayoría de autores argumentan su cálculo mediante un análisis de curva ROC (Receiver Operating Characteristic, ROC), lo cual contribuye de forma muy significativa a aumentar la heterogeneidad y dificulta la comparación de las diferentes series.

Por tanto, la correlación entre RNL y supervivencia en el entorno del CM tratado con QTN sigue sin estar clara, ya que la mayoría de los estudios no mostraron evidencia de que la RNL fuera independiente. A su vez, un porcentaje significativo comunicaron que la RNL no es un factor predictivo de RCp en pacientes tratados con QTN. Debido a la heterogeneidad de la población y/o al pequeño tamaño muestral de los estudios publicados sobre esta cuestión, se requieren investigaciones adicionales.

#### **1.4.2.3. RATIO PLAQUETA-LINFOCITO**

Un recuento elevado de plaquetas se ha asociado a mal pronóstico en CM.(185) Las plaquetas contienen tanto moléculas y citoquinas proinflamatorias (P selectina, CD40L, IL-1, IL-3 e IL-6) como otras antiinflamatorias. Además, la secreción del factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el factor plaquetario 4 pueden estimular la angiogénesis y el crecimiento tumoral.(104)

La mayoría de estudios que exploraron el significado predictivo y pronóstico de la ratio plaqueta-linfocito (RPL), entendida como la relación entre el valor absoluto plaquetas y el recuento absoluto de linfocitos, arrojaron resultados inconsistentes.(158)

Para el CM tratado con quimioterapia adyuvante, algunos estudios encontraron una asociación positiva entre la RPL y la SLE o la SG.(162,186) Sin embargo, esta asociación no se ha validado en otras series independientes.(160) En el estudio pronóstico de la

RPL en pacientes con CM avanzado, se ha comunicado tanto asociación positiva (172) como negativa para SLE y SG.(187)

En las pacientes con CM tratadas con QTN, varios estudios han informado de la asociación entre una RPL baja, la RCp y mejor SLE y SG.(188,189) En un análisis reciente por Lusho, et al., en el que se incluyeron de forma retrospectiva 120 pacientes con CMTN, se confirmó el valor pronóstico en términos de respuesta y SLE.(190) Sin embargo, estos resultados no se validaron en otras series, para la RCp ni para la SLE o SG.(191)

Se han comunicado diferencias en los niveles de RPL, según subtipo molecular. No obstante, la información sobre su significado predictivo y pronóstico en base a la clasificación IHQ es escasa y no permite su aplicación en la práctica habitual.(161,185)

#### **1.4.2.4. CITOQUINAS**

Las citoquinas participan en la respuesta inmune tumoral a través de la regulación de la inmunidad innata y adaptativa. En CM, se ha descrito un patrón de expresión de 26 citoquinas circulantes diferente del expresado en mujeres sanas, lo que sugiere su potencial uso como biomarcador.(192)

También partiendo de las citoquinas, existe evidencia creciente sobre la interacción inmune entre el nicho tumoral y el circulante en CM. Por ejemplo, se ha descrito correlación entre el nivel de células mielosupresoras en CM precoz con los niveles de IL-6 y la RNL.(193) También se ha comunicado que niveles altos de sTIL se correlacionan con una baja expresión proinflamatoria de citoquinas en sangre periférica, identificando correlación adicional entre los sTIL FOXP3 altos y una alta expresión proinflamatoria de citoquinas.(192) En otro trabajo, se postuló que en el CM operable, el bajo nivel de citoquinas circulantes (VEGF, TNF- $\beta$  e IL-15) es un marcador subrogado de la sobreexpresión de PD-L1 en tejido.(194) De forma paralela, se ha identificado que el alto nivel circulante de IL-18 en CM operable es un factor pronóstico adverso de forma independiente a los niveles de TIL y la RNL.(195) Sin embargo, la relevancia pronóstica de estas asociaciones es todavía poco conocida y ninguna ha sido establecida como modelo pronóstico o predictivo en la práctica clínica, en parte por la habitual alta

correlación entre diferentes biomarcadores inmunes que hacen difícil establecer su valor independiente.

#### **1.4.2.5. MICROPARTÍCULAS**

Las micropartículas (MP) son pequeños cuerpos subcelulares, liberados por las células tumorales, con potentes propiedades reguladoras por su contenido genético y proteico.(196) Las MP de pequeño tamaño son un subtipo de MP, caracterizadas por un tamaño de 0,1 a 0,5  $\mu\text{m}$ , y liberadas por las células mediante exocitosis. El tamaño distingue a las MP de pequeño tamaño de los exosomas ( $< 0,1 \mu\text{m}$ ) y de los cuerpos apoptóticos, formados por fragmentos de células que sufren apoptosis ( $> 0,5 \mu\text{m}$ ). (197) Las MP, y más concretamente los exosomas, regulan la compleja vía intracelular implicada en todos los pasos del desarrollo del CM, desde el inicio hasta el establecimiento del nicho pre-metastásico y la progresión hacia la diseminación metastásica.(198) Entre sus funciones más relevantes, se ha descrito la evasión de la inmunovigilancia. Muchos estudios, fundamentalmente en modelos murinos, han revelado que los exosomas pueden ayudar a las células del CM a ejercer actividades inmunomoduladoras a través de múltiples mecanismos, como la inhibición de la actividad citotóxica de las células NK, induciendo la apoptosis de células T CD8 y CD4, o modulando negativamente la proliferación de células T a través del TGF- $\beta$ , entre otros.(199–201)

#### **1.5. CORRELACIÓN ENTRE BIOMARCADORES INMUNES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL Y CIRCULANTES EN CÁNCER DE MAMA NEOADYUVANTE**

Cada vez existe más evidencia, en forma de datos preclínicos y clínicos, que ponen de manifiesto que la progresión del cáncer está impulsada no sólo por las alteraciones genéticas en el tumor y las interacciones con su microambiente local, sino también por procesos sistémicos complejos y poco conocidos, que pueden tener un profundo impacto en la respuesta inmune antitumoral.(202) Algunas de las pruebas más convincentes de que los cánceres ejercen efectos sistémicos únicos y específicos proceden de estudios que demuestran que los tejidos pueden verse alterados a nivel estructural, histopatológico y molecular en presencia de una neoplasia maligna distante.

La visión que está emergiendo en la actualidad es la de un componente inmune periférico cuya integridad es también necesaria para que la respuesta inmune frente al tumor sea eficaz y para que las nuevas estrategias de inmunoterapia sean capaces de generar respuestas inmunes antitumorales de novo.(154) Por lo tanto, aunque ya estaba clara la visión del cáncer como una enfermedad sistémica, los efectos a distancia de la respuesta inmune local y la modificación de ésta por el componente periférico de la respuesta inmune están siendo ahora objeto de numerosas investigaciones.(202)

Entre los procesos que conectan desde el punto de vista biológico la respuesta inmune en el compartimento periférico y el microambiente tumoral tienen especial relevancia:

#### **a) Células mieloides supresoras**

Muchos estudios, en modelos murinos y también en humanos, han objetivado una significativa alteración de la hematopoyesis secundaria a la enfermedad neoplásica. Esta disrupción se ha manifestado, especialmente, por una expansión de neutrófilos y monocitos inmaduros en la periferia de los huéspedes, que luego se dirigen al microambiente tumoral y contribuyen a la inmunosupresión local.(154,203,204) Modelos murinos de CM han demostrado que la proporción de células madre hematopoyéticas de la médula ósea, los progenitores multipotentes y los progenitores monocitarios granulocíticos aumentan progresivamente con la carga tumoral.(205) En este proceso, se han implicado varios factores, como la IL-17, la IL-8, el TNF, los exosomas derivados del tumor y la IL-1 $\beta$ .(154) Además de la producción excesiva de células monocíticas y neutrófilos, se ha observado un recuento disminuido de células dendríticas en la periferia de los huéspedes con carga tumoral respecto a controles sanos. Esto tiene importantes implicaciones para el desarrollo de la respuesta inmune antitumoral, ya que las células dendríticas son elementos críticos en la preparación, diferenciación y proliferación de las células T CD8+ y CD4+ en muchos contextos, incluido el cáncer.(206)

#### **b) Cambio en poblaciones inmunes circulantes**

La inmunoterapia como tratamiento oncológico ha supuesto un cambio de paradigma para múltiples neoplasias. Clásicamente, la visión predominante de la eficacia de la inmunoterapia se ha centrado en los efectores citotóxicos dentro del TME, pero cada

vez existe más evidencia sobre la naturaleza fundamentalmente sistémica de la inmunidad antitumoral eficaz. En este sentido, estudios recientes demuestran que la inhibición del eje PD1/PD-L1 tiene efectos más allá del bloqueo de las señales inmunosupresoras locales en el tumor, informado sobre el beneficio terapéutico de los ICI únicamente en modelos con expresión intacta de PD1 y PD-L1 en el huésped, siendo menos dependiente de la expresión de PD-L1 en las células tumorales.(207,208) A su vez, se ha sugerido que la alteración de la integridad inmunitaria secundaria a la quimioterapia puede impedir el beneficio terapéutico por el bloqueo de PD1, causando una linfodepleción sistémica y la anulación de la memoria inmunitaria a largo plazo.(154) De forma sintética, estos hallazgos confirman la necesidad de una función inmunitaria periférica intacta para asegurar la eficacia de los ICI.

### **c) Cambios en perfiles de citoquinas y otras biomoléculas circulantes**

Como se ha referido, el impacto de la quimioterapia en el sistema inmunitario depende en gran medida del contexto, por lo que supone un reto, pero también un imperativo, entender cómo cada estrategia terapéutica puede comprometer la función inmunitaria en los distintos contextos oncológicos. Más concretamente, las pacientes con CM tratadas con QTN muestran efectos inmunitarios diferentes en función del estadio, subtipo molecular y del agente terapéutico empleado, lo que se refleja en la funcionalidad de las células periféricas. En pacientes con CM HER2+, un estudio reciente sugiere que una mayor cantidad de monocitos e IL-10 circulante se asocian a una menor RCp tras la quimioterapia.(209) Se ha descrito, en pacientes con CM RH+, un descenso en la polifuncionalidad de las células T PD1+CD8+ circulantes, medida por la producción de citoquinas tras la estimulación del TCR. Por el contrario, pacientes con CMTN mostraron un elevado número de células T PD1+CD8+ con alta funcionalidad, produciendo citoquinas efectoras como IFN $\gamma$  y TNF, y con evidencias de expansión clonal.(210)

Basándonos en todo lo expuesto, es primordial la comprensión más profunda de la interrelación entre la respuesta inmune periférica y la que ocurre en el microambiente tumoral, teniendo en cuenta la interrelación entre los biomarcadores de cada una de

ellas. De forma individual, los TIL y la RNL reflejan el estado de la inmunidad local y sistémica, respectivamente. Sin embargo, la correlación entre ambos parámetros aún no ha sido completamente evaluada y es un aspecto clave para su posible integración en sistemas predictivos o pronósticos de uso clínico.

En el contexto adyuvante, la evidencia sobre la correlación entre los TIL y la RNL es limitada. En una revisión reciente de la clínica Mayo, en la que se incluyeron pacientes con CMTN tratadas con cirugía primaria, se evaluó la capacidad pronóstica en términos de SLE y SG, de los sTIL y la RNL en combinación con variables clásicas como la edad, status menstrual, tamaño tumoral y afectación ganglionar, grado, Ki67, tipo de cirugía y tratamiento adyuvantes. Aunque los autores concluyeron que el modelo combinado mejoraba la predicción, no se comunicaron datos específicos sobre la correlación de variables.(211) Para el CM con enfermedad metastásica, no se han publicado estudios de correlación sobre TIL y RNL de forma exclusiva, aunque un estudio de 2020 por Van C, et al. analizó datos de pacientes con CM inflamatorio localmente avanzado y metastásico, sin encontrar correlación significativa.(212)

Los principales resultados en el contexto neoadyuvante se resumen en la tabla 2. A modo de resumen, ninguno de los estudios encontró correlación entre el porcentaje de TIL y la RNL. La mayoría de estudios (3/5; 60%) se realizaron en pacientes con CMTN. Cabe destacar una marcada heterogeneidad en la evidencia disponible, con un estudio que incluía pacientes con CMTN, tratadas con QTN y adyuvante (213), otro estudio que analizó pacientes con carcinoma inflamatorio tratadas con QTN, pero también metastásicas (212) y, un último análisis, que además de diferentes subtipos moleculares, incluía pacientes con diferente estrategia terapéutica, realizándose la cuantificación de TIL mediante el recuento de células CD8+ y FOXP3+.(214)

Por tanto, en el contexto neoadyuvante, no hay datos, más allá del CMTN, que establezcan una relación entre la infiltración linfocitaria y la RNL en pacientes con CM localmente avanzado de cualquier subtipo.

Tabla 2. Resumen de la evidencia sobre la correlación TIL y RNL en CM neoadyuvante

Artículo	Número de pacientes	Tratamiento	Objetivo primario	Puntos de corte	Correlación
Pang J, 2021 (213) [Probable duplicada: (215)]	N = 395 Todas CMTN	- N = 310, QTN (antraciclinas o taxanos) - N = 85, QT adyuvante	Correlación, SLE	- TIL: 0-10%; 11-20%; >20% - RNL: 1,928 (media)	p=0,569
Dong X, 2019 (215)	N = 170 Todas CMTN	N = 170, QTN (esquema TEC)	Correlación, SLE	- TIL: 0-10%; 11-20%; >20% - RNL: 1,928 (media)	p=0,706
Lusho S, 2021 (190)	N = 120 Todas CMTN	N = 120, QTN (FEC/taxano)	Respuesta patológica, SLED	- TIL: 5, 10, 30 y 50% - RNL: no	p > 0,05
Van C, 2020 (212)	N = 127 (N = 34, M1) Todas ca. inflamatorio	- N = 93, QTN (antraciclinas o taxanos) - N = 34, M1	Correlación, SLE, SG	- TIL: <10%; 10-40%; >40% - RNL: 4 (bibliograf/p80)	p=0,38
Lee, 2018 (214)	N = 145 Todos los subtipos	- N = 44, QTN (AD, AC, ACT) - N = 95, QT adyuvante - N = 6, no QT	Correlación, SLE, SG	- TIL-CD8+: 30% (mediana) - RNL: 1,72 (mediana)	p=0,518

CMTN: cáncer de mama triple negativo. FEC: fluorouracilo, epirubicina, ciclofosfamida. QT: quimioterapia. QTN: quimioterapia neoadyuvante. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de enfermedad. SLED: supervivencia libre de enfermedad a distancia. TEC: docetaxel, epirubicina, ciclofosfamida. TIL: linfocitos infiltrantes de tumor.

## 1.6. MODELOS PREDICTIVOS Y PRONÓSTICOS EN CÁNCER DE MAMA NEOADYUVANTE

Actualmente, el factor con mayor capacidad pronóstica para las pacientes con CM tratadas con QTN, es la enfermedad residual tras completar tratamiento. Sin embargo, algunas pacientes presentan recaída a pesar de haber alcanzado RCp y, a su vez, otras pacientes con enfermedad residual presentan excelente evolución. En este contexto, se han realizado esfuerzos por identificar aquellos factores que pudieran predecir RCp. Desde el punto de vista pronóstico, para conocer otros que ayudaran a seleccionar a las pacientes con menor o mayor riesgo de recaída, de cara a plantear estrategias de desescalada o escalada terapéutica. En un entorno en el que el papel del sistema inmunológico es clave, como ocurre en el CM, el estudio de variables inmunes podría

contribuir a mejorar los sistemas predictivos y pronósticos disponibles actualmente, proporcionando información clínicamente relevante.

Dado el enfoque de este trabajo nos ceñiremos para la exposición al contexto de la QTN y no se tratarán los factores o modelos relacionados con el tratamiento neoadyuvante de base hormonal.

### **1.6.1. FACTORES Y MODELOS PREDICTIVOS**

La utilización de modelos predictivos es clave para la selección de pacientes, tanto para el tratamiento neoadyuvante en general, como para las distintas estrategias de tratamiento sistémico. Se tratarán en primer lugar, dado que son relevantes para la toma de decisiones antes de iniciar el tratamiento neoadyuvante.

El subtipo molecular es el factor con mayor capacidad predictiva de respuesta a QTN. Aunque se detallará de forma más exhaustiva en el apartado 6.2.1., la evidencia disponible confirma que la tasa de RCp es mayor en las pacientes con CMTN y HER2+ que en las pacientes con CM RH+/HER2-.(36)

En cuanto al tamaño tumoral, un estudio que analizó 38.864 mujeres con CM tratadas con QTN encontró que las pacientes con CM cT3 presentaban menor tasa de RCp (OR=0,64; IC95% 0,59-0,70) en comparación con las pacientes con CM cT1, de forma significativa. Esta asociación no se evidenció para las pacientes con CM cT2 (OR=0,95; IC95% 0,89-1,02).(216) También se ha relacionado la afectación clínica ganglionar al diagnóstico con la RCp axilar y, a su vez, con la RCp global.(217) La mayoría de estudios, especialmente para los subtipos HER2+ y CMTN, encontraron mayor posibilidad de alcanzar RCp en las pacientes con CM cN1 vs cN2-3.(217,218)

Otros factores, como el grado tumoral, que además se relaciona con el subtipo molecular, se ha propuesto como predictor directo de RCp en el subtipo luminal.(36) En una revisión de 6793 pacientes con CM que recibieron QTN, se describió el marcador de proliferación Ki67, como predictor de RCp.(219) La evidencia sobre la asociación entre la invasión linfovascular y la respuesta a QTN es controvertida, habiéndose comunicado tanto resultados significativos (220) como no(221), todos basados en análisis retrospectivos.

En general, esos factores son los más relevantes y la búsqueda de factores adicionales a los establecidos habitualmente ha sido de escasa utilidad, incluso utilizando abordajes de procesamiento complejo.(222)

En el CM luminal, la introducción de test genómicos predictivos probablemente se desarrollará más en los próximos años, aunque ya se dispone de resultados que indican el valor de una puntuación Recurrence Score (RS) elevada o de un MammaPrint© de alto riesgo para predecir la RCp a la QTN.(94) También para la enfermedad axilar se ha establecido una relación entre el RS y la probabilidad de RCp.(223)

Desde el punto de vista radiológico, la resonancia magnética nuclear (RMN) y otras técnicas funcionales, como la tomografía por emisión de positrones (PET)-TAC, analizadas con modelos radiómicos, también se ha propuesto como herramientas para la predicción de RCp.(224,225) Un metaanálisis de 17 estudios analizó el valor de la RMN, encontrando una capacidad predictiva moderada.(224) Los resultados fueron similares en un metaanálisis que incluyó 22 estudios evaluando el valor del PET-TAC para la predicción de la RCp.(225)

La integración de estos factores en modelos más complejos ha sido especialmente explorada en el contexto de la respuesta completa axilar, que tiene consecuencias quirúrgicas muy relevantes. Sin embargo, muchos de estos modelos demasiado dirigidos a la enfermedad axilar, integran la respuesta mamaria como un factor, lo que impide su utilización para la toma de decisiones sobre la indicación de QTN.(218,226)

### **1.6.2. FACTORES Y MODELOS PRONÓSTICOS DEPENDIENTES DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO**

Como se ha expuesto anteriormente, la capacidad del tratamiento neoadyuvante para generar datos sobre la sensibilidad al tratamiento y para estratificar pronósticamente a las pacientes en función de la enfermedad residual, se ha convertido en uno de los aspectos claves que ha motivado su utilización creciente. Los modelos pronósticos vigentes pueden integrar otros factores previos al tratamiento, pero fundamentalmente se orientan por la carga de enfermedad restante tras la QTN.

### 1.6.2.1. RESPUESTA COMPLETA PATOLÓGICA

La RCp se ha definido unánimemente como la desaparición completa de las células malignas invasivas en el tumor primario.(36,45) Sin embargo, algunos aspectos sometidos a debate se refieren a la evaluación del carcinoma ductal in situ (CDIS) y las células tumorales residuales en los ganglios linfáticos axilares para definir la RCp.(227) Cortazar et al., en un metaanálisis de 12 ensayos clínicos, demostraron que las tasas de SLE y SG fueron similares, independientemente del CDIS.(36) Aunque varios estudios han sugerido que el CDIS no es importante para definir la RCp, otros investigadores sostienen que el CDIS podría suponer un mayor riesgo de recidiva local para las pacientes tras la QTN.(45) En cuanto a la afectación axilar, el grupo de Cortazar propuso la exclusión de la definición de RCp, de aquellas pacientes con células aisladas en los ganglios linfáticos axilares tras QTN.(36) Por lo tanto, se acepta que la evaluación de la respuesta axilar tras QTN es indispensable ya que mejora la eficacia pronóstica de la RCp, quedando ésta definida como la ausencia de células malignas invasivas en el tumor primario y en los ganglios linfáticos metastásicos.(228) Una revisión exhaustiva de los estudios clínicos anteriores mostró que la RCp puede definirse como la ausencia de carcinoma invasivo residual en la mama y los ganglios linfáticos, pero permite el CDIS (ypT0/isypN0).(227)

En cuanto a su significado pronóstico, la RCp representa una respuesta satisfactoria al tratamiento neoadyuvante. Un metaanálisis, por el grupo de Spring, et al. que incluyó 27.895 pacientes, propuso la RCp como factor protector para la SLE, especialmente en los subtipos CM HER2+ (HR=0,32; IC95% 0,21-0,47) y CMTN (HR=0,18; IC95% 0,10-0,31).(229) Los resultados fueron consistentes para la SG. Cabe destacar que las pacientes que alcanzaron RCp no mostraron diferencias significativas para la SLE ( $p=0,60$ ), según hubieran recibido o no quimioterapia adyuvante (HR=0,36; IC95% 0,19-0,67 vs HR= 0,36; IC95% 0.27-0.54).(229) Dado que la RCp tiene la ventaja de reflejar la quimiosensibilidad poco tiempo después de la QTN, puede orientar sobre la necesidad de un tratamiento adyuvante posterior.(36) Otros grupos han descrito una asociación significativa entre la RCp y la SLE en el subtipo luminal B/HER2-, HER2+ y CMTN, pero no en los tumores luminales A y luminal B/HER2+.(45) En el análisis a 3 años de las pacientes incluidas en el ensayo I-SPY2, en el que se excluyeron las pacientes con CM luminal de

bajo riesgo, también se demostró que alcanzar RCp tras QTN implicaba una reducción de aproximadamente el 80% en la tasa de recurrencia.(94)

La evidencia disponible sugiere que el fracaso en la consecución de la RCp está relacionado con un pronóstico desfavorable en CMTN y HER2+, pero no en la mayoría de los pacientes con CM RH+ que tienden a un pronóstico favorable, pese a tener una probabilidad menor de alcanzar RCp.(36) Esto refleja una correlación incierta entre la RCp y los resultados a largo plazo en los pacientes con CM RH+. Teniendo en cuenta el gran número de estudios que demuestran la asociación de la RCp con una menor probabilidad de recidiva y muerte (36), especialmente para el CMTN y HER2+, la FDA sugirió la RCp como criterio de valoración sustitutivo para la evaluación y aprobación acelerada de nuevos fármacos.(62)

Sin embargo, algunas pacientes recaen o mueren incluso tras alcanzar RCp, mientras que otras sin RCp presentan una evolución favorable.(227) Además, no todas las pacientes se benefician de la QTN, ya que algunas desarrollan resistencia farmacológica y progresan tras la misma. Por lo tanto, la RCp no parece un indicador único adecuado para predecir la supervivencia a largo plazo, máxime teniendo en cuenta que la tasa de RCp es muy diferente según el subtipo molecular de CM.

La limitación de la RCp podría deberse a algunos otros factores de riesgo de las pacientes que podrían debilitar su beneficio pronóstico. Factores como la positividad de HER2, la afectación ganglionar, el estadio clínico IIIB-C y el status premenopáusico podrían aumentar las tasas de recurrencia de las pacientes que han logrado RCp.(230–233) Estudios de expresión génica recientes han planteado que otras variables, como la menor expresión de la firma de señalización del RE o de los parámetros de expresión relacionados con la inmunidad (menor expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II), podrían condicionar la recaída en pacientes que alcanzaron RCp.(234) Aunque estas diferencias no se mantuvieron significativas tras ajustar por la tasa de falsos descubrimientos, el análisis abre la posibilidad de futuras investigaciones.

Por tanto, los determinantes biológicos o perfiles moleculares que justifican la recaída tras RCp no son bien conocidos. Además, como ya se ha mencionado, las tasas de RCp son discordantes entre los distintos subtipos y los efectos pronósticos no se aplican a todos los subgrupos moleculares de CM. Aunque las tasas de RCp han aumentado tras la incorporación de nuevos fármacos, un gran número de pacientes no logran RCp tras QTN, y no todas las pacientes con RCp tienen buen pronóstico, especialmente para el CM RH+. Por lo tanto, el uso de la RCp como sustituto de SLE y SG para reflejar el pronóstico a largo plazo todavía no es suficiente y se deberían tener en cuenta factores adicionales.

#### **1.6.2.2. CARGA DE CÁNCER RESIDUAL**

La RCp se relaciona con un mejor pronóstico, sin embargo, en algunos pacientes persisten diferentes grados de enfermedad residual tras la QTN, lo que ha motivado la exploración de otros indicadores pronósticos.

El RCB es un sistema de evaluación patológica de la enfermedad residual tras QTN que se ha relacionado con el pronóstico a largo plazo.(46) El sistema de evaluación del RCB tiene en cuenta el tumor primario en el tejido mamario (tamaño, celularidad y enfermedad in situ) y los ganglios metastásico (número y tamaño).(235) Su puntuación se expresa tanto como una puntuación continua como categórica basada en la extensión del tumor residual. El RCB 0 equivale a la RCp, mientras que la enfermedad residual se divide en RCB I (tumor residual mínimo), RCB II (tumor residual moderado) y RCB III (tumor residual extenso).(46)

En cuanto a su significado pronóstico, Peintinger et al. confirmaron que los pacientes con RCB I tenían una tasa de recaída a distancia a 5 años similar a la de RCB 0 (5,4% y 2,4%, respectivamente), mientras que los pacientes con RCB III mostraron un mal pronóstico con una tasa de recaída a distancia a 5 años del 53,6%.(236) Symmans et al. realizaron un estudio que incluía cinco cohortes e informaron que el índice RCB se asociaba significativamente con el pronóstico a largo plazo en todos los subtipos moleculares.(37)

Aunque varios estudios han demostrado el valor pronóstico del RCB, su capacidad para identificar con precisión a las pacientes de alto riesgo sigue siendo conflictiva. Además, una limitación importante en la toma de decisiones clínicas para los pacientes con RCB I es la similitud de su pronóstico con los que han alcanzado RCB 0. Debe investigarse la fiabilidad del RCB como criterio de valoración sustitutivo tras QTN.(227)

### **1.6.3. MODELOS PREDICTIVOS Y PRONÓSTICOS CON INTEGRACIÓN DE PARÁMETROS INMUNES**

Hasta el momento, los factores asociados a la respuesta a QTN se han obtenido a partir de análisis clínicos, patológicos y moleculares. Sin embargo, la mayoría de estos estudios incluyen un tamaño muestral limitado, combinan datos de pacientes con diferente estrategia terapéutica y utilizan perfiles con variables aisladas que no captan la complejidad del ecosistema tumoral, lo que condiciona que para la selección de las pacientes candidatas a tratamiento neoadyuvante se siga empleando una estratificación empírica del riesgo clínico.(237) Publicaciones recientes sugieren que la determinación combinada de biomarcadores podría proporcionar información más completa y relevante.(238)

Varios estudios han explorado la combinación de biomarcadores inmunes locales asociados a factores clínicos clásicos como la respuesta a tratamiento neoadyuvante.(238) En concreto, los más explorados son TIL, PD-L1 y firmas genómicas, y sus combinaciones.(237,238) Asano et al. concluyeron que la eficacia pronostica del indicador integrado "sTIL-RCB" era mayor que la de los sTIL o RCB por separado en pacientes con CM RH+.(239) Se han comunicado resultados similares para la RCp.(240) Recientemente, el grupo de Salgado et al. han propuesto que en pacientes con CMTN y HER2+ avanzados, un límite de sTIL del 5% o el 10%, con expresión de PD-L1, podría definir tumores "enriquecidos inmunológicamente".(138)

Se han realizado también análisis exploratorios con biomarcadores inmunes circulantes y sus combinaciones. Graziano et al. demostraron que las tasas de RCp eran mayores en los pacientes con RNL baja/RPL baja que en los pacientes con RNL alta/RPL alta (OR=1,98; IC 95%: 1,01-3,89).(191) Asimismo, se ha explorado la combinación de varios biomarcadores periféricos, con resultados interesantes, aunque pendientes de validación.(241)

Sin embargo, el significado predictivo y pronóstico de la combinación de biomarcadores inmunitarios del TME y circulantes, más concretamente la combinación de TIL y RNL, permanece poco explorada. En el estudio de Lee et al., en el que se analizaron una minoría de pacientes con CM tratadas con QTN (44/145; 30,34%) incluyendo diferentes subtipos IHQ, los TIL-CD8+ no mostraron valor pronóstico en el análisis univariable ni multivariable, aunque cabe resaltar el contexto heterogéneo de la muestra que incluía pacientes con diversas estrategias terapéuticas.(214)

Específicamente para el CMTN, Pang et al. comunicaron la independencia de la RNL (alta vs baja) y la cifra de sTIL (alta vs baja) en un análisis multivariable para la SLE, incluyendo afectación ganglionar (pN0 vs pN2-3) y el G3 (vs G1-2).(213) Es importante resaltar que el estudio incluía pacientes tratadas en neoadyuvancia y adyuvancia. En la cohorte de 2019 por Dong et al., en la que se incluyeron únicamente pacientes con CMTN tratadas con QTN, una RNL elevada y bajos sTIL, junto con la afectación ganglionar ( $\geq 10$ ), el mayor grado histológico y la no RCp se mostraron como indicadores pronósticos independientes de mal pronóstico para SLE.(215)

También se han publicado algunos resultados, en pacientes con CMTN, que incluían la RCp como principal objetivo, no encontrando superioridad de los biomarcadores periféricos (RNL y RPL) respecto a los TIL, tampoco para la recaída a distancia.(190) En el estudio de Van et al., en el que se analizaron pacientes con CM inflamatorio, únicamente se comunicó el análisis conjunto de biomarcadores locales y sistémicos para el estudio de la correlación.(212)

## **1.7. JUSTIFICACIÓN**

La QTN es la opción terapéutica de elección para el tratamiento del CM localmente avanzado e inflamatorio. Además, es una opción válida para aquellas pacientes que previsiblemente requieran quimioterapia adyuvante, especialmente en subtipos HER2+ y CMTN. La QTN aumenta la tasa de cirugía conservadora y preservación axilar, permite el seguimiento de la respuesta al tratamiento, la individualización de la terapia adyuvante según el riesgo y brinda oportunidades únicas para el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas e individualizadas.

La estratificación del riesgo es fundamental en las pacientes con CM tratadas con QTN, ya que la enfermedad patológica residual puede afectar la toma de decisiones postoperatorias. En este contexto, la respuesta a QTN (RCp) es el predictor más robusto en términos de tasa de recurrencias, SLE y SG, especialmente para los subtipos más agresivos de CM. A pesar de la intención curativa de las medidas, hasta un 30-40% de estas pacientes, incluyendo algunas de las que alcanzaron RCp, presentarán recaída en los primeros años de seguimiento. Igualmente, algunas pacientes sin RCp presentarán evolución favorable. Además, no todas las pacientes se benefician de QTN, ya que algunas desarrollan resistencia farmacológica y presentan una enfermedad estable o incluso progresan tras la QTN.

Por lo tanto, la RCp no puede considerarse el estándar único para predecir la supervivencia a largo plazo. Resulta fundamental disponer de otros factores pronósticos que nos ayuden a identificar a las pacientes que van a recaer a pesar de haber alcanzado RCp, seleccionar los candidatos adecuados para QTN y evitar la toxicidad innecesaria en las pacientes no respondedoras a QTN.

La respuesta inmunitaria adaptativa e innata desempeñan un papel clave en la inmunovigilancia tumoral, pudiendo limitar el desarrollo y el crecimiento de neoplasias, así como condicionando la respuesta a nuevas estrategias terapéuticas como la inmunoterapia. Aunque el papel de la respuesta inmune en el CM no está completamente definido, cada vez existe más evidencia sobre la participación del microambiente inmune tumoral en la respuesta a los diferentes tratamientos del cáncer y el pronóstico de los pacientes. La evaluación de los TIL ha demostrado representar un sustituto fiable de la actividad inmunitaria antitumoral y un sólido biomarcador pronóstico en pacientes con CM, especialmente CMTN. Sin embargo, su papel en el CM luminal no es tan claro.

No solo es relevante la existencia de dicha infiltración, sino que además la composición y tipo de activación de la misma es importante desde el punto de vista pronóstico y predictivo de respuesta a tratamiento. Por lo tanto, una mejor comprensión de la inmunología tumoral debe evaluar el panorama inmunológico sistémico más allá del TME, es decir, se requiere que el sistema inmunitario periférico impulse respuestas inmunes antitumorales de forma natural y terapéuticamente inducida.

En este sentido, existe evidencia creciente de que el recuento total de leucocitos y, en especial, la RNL previa al inicio del tratamiento antineoplásico predicen un resultado clínico adverso en diversas neoplasias sólidas. Este marcador es especialmente interesante ya que integra la capacidad de respuesta inmune con el estado inflamatorio del paciente que habitualmente se relaciona con la progresión tumoral y mal pronóstico. Refleja, por otra parte, la situación inmune sistémica o periférica del paciente, que está probablemente relacionada, pero no es equivalente a la observada en el microambiente tumoral. En CM tratado con QTN, su significado pronóstico aún no es claro, y aunque todavía no hay ningún biomarcador inmunológico sistémico que se utilice ampliamente para guiar el tratamiento de los pacientes, los continuos avances en este ámbito están siendo alentadores.

A pesar de la modesta actividad de los ICI como agentes únicos en el CM en comparación con otros tumores sólidos, estamos asistiendo a un número creciente de ensayos que investigan estrategias combinadas. Hasta ahora, los factores que predicen la respuesta a la inmunoterapia en el CM incluyen la línea de tratamiento, estado de PD-L1 y la presencia de TIL. Sin embargo, ninguno es suficientemente sólido para guiar la terapia. Los avances hacia estrategias inmunoterapéuticas de mayor eficacia requieren de un conocimiento más profundo de las relaciones inmunológicas entre los tumores y sus huéspedes.

Dado que no podemos ignorar los posibles costes de los efectos adversos relacionados con la inmunidad a largo plazo, y puesto que algunos pacientes se curan con los enfoques estándar, dichos ensayos deben basarse en sólidos fundamentos preclínicos. Si bien el conocimiento profundo de la biología inmunológica del tumor explica en parte el desplazamiento de la investigación de la inmunoterapia hacia el escenario temprano, los intereses comerciales en un entorno altamente competitivo deben ser moderados por investigaciones dirigidas a reducir el riesgo de inducir más daños que beneficios. La investigación de biomarcadores para identificar la resistencia inicial, los respondedores y los pacientes con riesgo de toxicidad relacionada con la inmunidad está muy fragmentada y deberían iniciarse más proyectos en este sentido.

En última instancia, es poco probable que haya un único biomarcador perfecto. El sistema inmune, su interacción con el desarrollo-progresión tumoral y la importancia de la respuesta inmune tumoral se han de entender como un conjunto que integra, entre otros, células inmunes, tanto en el nicho tumoral como en el circulante.

Publicaciones recientes sugieren que la determinación combinada de biomarcadores podría proporcionar información más completa y relevante. Por tanto, y dada la necesidad de mejorar los sistemas predictivos y pronósticos disponibles actualmente con la finalidad última de optimizar la estrategia terapéutica y mejorar los resultados, el objetivo de este trabajo fue analizar la capacidad predictiva, pronóstica y contribución relativa de distintos marcadores relacionados con la respuesta inmune, tanto en el microambiente tumoral como en el nivel sistémico en pacientes con CM tratadas con QTN.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## **HIPÓTESIS**

Un biomarcador adecuado debe ser analíticamente válido, robusto, reproducible y clínicamente útil. Para que se incorpore a la práctica diaria, también debe ser asequible y accesible. Los TIL parecen representar un marcador fiable de la actividad inmunitaria antitumoral en CMTN. La RNL ha sido validada como un factor pronóstico independiente en el CM precoz tratado con intención adyuvante, probablemente como reflejo del balance sistémico de la respuesta inmune e inflamatoria inducida por la neoplasia. La comprensión más profunda de la interrelación entre la respuesta que ocurre en el microambiente tumoral y la respuesta inmune periférica es necesaria para su posible integración en sistemas predictivos o pronósticos de uso clínico. La mejora de los modelos de predicción en CM debe tener en cuenta los tumores como ecosistemas complejos y dinámicos. Partiendo de que la enfermedad precoz es el contexto probablemente más apropiado para la incorporación de la inmunoterapia en el CM, profundizar en el conocimiento de la correlación biológica de factores pronósticos relacionados con la inmunidad es indispensable para mejorar su aplicabilidad clínica y la posible generación de biomarcadores más complejos que puedan dirigir el tratamiento.

La hipótesis fundamental de esta tesis doctoral es que el estudio conjunto de biomarcadores inmunes del microambiente tumoral (sTIL) y de la periferia (RNL), así como su combinación, en pacientes con CM tratadas con QTN puede contribuir a profundizar en el conocimiento de su base biológica y a la identificación de biomarcadores simplificados con la finalidad última de proporcionar información clínica relevante para ayudar a guiar las decisiones de tratamiento.



## **OBJETIVOS**

### Objetivo principal

El objetivo principal de esta tesis doctoral es determinar si la evaluación combinada de la respuesta inmune tumoral y periférica mediante la infiltración linfocitaria tumoral (sTIL) y la RNL al diagnóstico, es capaz de mejorar, frente a los factores predictivos y pronósticos clínico-patológicos clásicos, la predicción de la respuesta y la estratificación pronóstica en una serie consecutiva de pacientes con CM precoz tratadas con QTN.

### Objetivos específicos

- 1) Evaluación global y por subtipos de la infiltración linfocitaria tumoral (sTIL) y de su valor predictivo y pronóstico en el CM tratado con QTN.
- 2) Evaluación global y por subtipos de la relación neutrófilo-linfocito (RNL) y de su valor predictivo y pronóstico en el CM tratado con QTN.
- 3) Análisis de la correlación entre sTIL y RNL al diagnóstico en el CM, de forma global y por subtipos, y evaluación del impacto predictivo y pronóstico de la combinación de ambas variables.
- 4) Generación de un modelo predictivo de respuesta a la QTN, que incluya los sTIL y la RNL.
- 5) Generación de un modelo pronóstico de CM tratado con QTN, que incluya los sTIL y la RNL.



## MATERIAL Y MÉTODOS

---



### **3.1. TIPO DE ESTUDIO**

Estudio observacional, transversal, unicéntrico y de carácter retrospectivo. Se estudió una cohorte de pacientes diagnosticadas de CM y tratadas con QTN entre 2008 y 2019.

Todas las pacientes recibieron tratamiento en el servicio de Oncología Médica del Hospital General Universitario Morales Meseguer y debían disponer de un seguimiento adecuado (fecha de última actualización: enero de 2022).

### **3.2. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO**

Globalmente, se incluyeron las pacientes diagnosticadas de CM estadios II o III, tratadas con QTN. Para la consideración en el registro, las pacientes debían disponer de una biopsia pretratamiento que confirmara el diagnóstico de malignidad. La inclusión se realizó de forma consecutiva.

La estadificación fue homogénea e incluyó estudio de la mama y ganglionar, así como estudio de extensión. Las pacientes recibieron tratamiento estándar, según las recomendaciones de las guías clínicas nacionales e internacionales, actualizadas con fecha de inicio del tratamiento.

Con el fin de homogeneizar la muestra, se excluyeron los varones diagnosticados de CM y las pacientes tratadas con hormonoterapia previa a la cirugía.

#### Estudio diagnóstico locorregional

El estudio de la mama y axila incluyó exploración física, mamografía bilateral, ecografía mamaria y ganglionar (axilar, infra y supraclavicular) y RMN bilateral. Se realizó biopsia con aguja gruesa (BAG) del tumor primario y focos mamarios adicionales si se consideraban clínicamente relevantes. También se realizó biopsia cutánea si había sospecha de infiltración de la piel o carcinoma inflamatorio (cT4b-d).

Para la estadificación ganglionar, se llevó a cabo punción aspiración con aguja fina (PAAF) si sospecha clínica y/o radiológica de afectación axilar tumoral. Además, se colocó marcaje con clip de titanio en el tumor mamario en aquellas pacientes con indicación de cirugía conservadora. En casos de cN1-2 en los que se había consensuado BSGC post-QTN, se realizó marcaje ganglionar axilar dirigido por ecografía.

### Evaluación histopatológica del tumor

Tras la BAG mamaria, la muestra se procesó y analizó por el Servicio de Anatomía Patológica, según práctica habitual, incluyendo análisis histológico (subtipo histológico, grado, componente in situ, invasión vascular) y perfil inmunohistoquímico (RE, RP, HER2, Ki67).

El estado de los RE y RP se evaluó mediante IHQ. Los casos se consideraron negativos cuando el porcentaje de células tumorales inmunorreactivas era inferior al 1%; el resto de los casos ( $\geq 1\%$  de las células tumorales teñidas) se clasificaron como positivos. El estado de HER2 se determinó mediante un método de IHQ validado (Herceptest, Dako North America, CA, EEUU hasta 2017; desde entonces, Pathway-ROCHE) o hibridación in situ fluorescente (FISH). Para la valoración se siguieron los criterios ASCO/CAP vigentes en cada momento.(242) En general, los casos se consideraron positivos si el resultado de Herceptest o Pathway fue 3+ y cuando la FISH mostró una relación  $HER2/CEP17 \geq 2$ , mientras que el resto de los casos se clasificaron como negativos.

La RCp se definió como la ausencia de carcinoma invasivo en la mama y en la axila, independientemente de la presencia de carcinoma in situ (ypT0/Tis ypN0) y evidencia de no enfermedad a distancia (M0). La estimación de la RCB se realizó según estándar, como: RCB 0 (equivalente a la RCp), RCB I (tumor residual mínimo), RCB II (tumor residual moderado) y RCB III (tumor residual extenso).(46)

### Estudio de extensión

El estudio para descartar enfermedad a distancia previo a iniciar tratamiento neoadyuvante se ajustó a las recomendaciones internacionales. Todas las pacientes disponían de analítica completa, incluyendo marcadores tumorales, y radiografía de tórax (postero-anterior y lateral). En tumores con RH- y/o Her2+ o cualquier tumor N1-3, se realizó de forma adicional gammagrafía ósea (GGO) y ecografía abdominal, en CMTN. En las pacientes con CM localmente avanzado (N2-3 y/o T4 y/o T3N1), se completó estudio de extensión mediante Tomografía Axial Computarizada (TAC) toracoabdominal y GGO. En caso de duda con los estudios complementarios habituales, se solicitó PET-TAC.

### Estudios complementarios adicionales

Las pacientes premenopáusicas debían disponer de un test de gestación negativo previo al inicio de la quimioterapia. Además, se realizó de forma sistemática un eje hormonal incluyendo estradiol, hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH).

En pacientes mayores de 65 años con factores de riesgo cardiovascular, cardiopatía conocida o candidatas a tratamiento anti-HER2, se realizó ecocardiografía antes de iniciar el tratamiento sistémico.

Para evaluar la respuesta a la QTN, se realizó exploración física antes de cada ciclo. Tras tres (en los esquemas de seis ciclos) o cuatro (en los esquemas de ocho ciclos) ciclos, se cursó mamografía y ecografía mamaria y ganglionar. Previo a la cirugía, se realizó RMN mamaria bilateral a todas las pacientes, salvo contraindicación. Además, en todas se reevaluó la enfermedad ganglionar mediante ecografía. Los casos con cN1 inicial que se hubieran planteado para BSGC post-QTN y sospecha de enfermedad ganglionar persistente, requerían confirmación con PAAF. En los casos de progresión durante la quimioterapia, se consideró el cambio de esquema citostático o cirugía de rescate, previa actualización del estudio de extensión, y valoración en comité de tumores.

### Tratamiento

Todas las pacientes recibieron tratamiento neoadyuvante con antraciclinas y taxanos o bien, con esquemas basados en taxanos y carboplatino cuando las antraciclinas no se consideraron necesarias, así como anti-HER2 en aquellas pacientes cuyos tumores eran HER2+.

En la propuesta quirúrgica, todas las pacientes se consideraron para cirugía conservadora mamaria, salvo indicación de mastectomía: pacientes con estadio clínico cT4, sin respuesta suficiente, con enfermedad multifocal o con contraindicaciones para radioterapia.

El tratamiento ganglionar se basó en el estadio clínico al diagnóstico y la respuesta a QTN. Las pacientes con estadio cN0, en las que se decidió BSGC post-QTN, se sometieron a linfadenectomía axilar en caso de positividad post-QTN (ypN1mic, ypN1). Si se había realizado BSGC pre-QTN (parte del protocolo habitual hasta el año 2012), se indicó

linfadenectomía axilar en caso de pN1(sn) pre-QTN, evitándose si pN0(sn) o pN1mic(sn) pre-QTN. En caso de cN1 (confirmado con PAAF/BAG pretratamiento) se realizó linfadenectomía axilar en todos los casos hasta 2015. Desde 2016, en los casos cN1 confirmados se realizó marcaje del ganglio dominante y evaluación tras el fin de tratamiento, indicándose linfadenectomía axilar tras la quimioterapia si había persistencia de afectación ganglionar (con confirmación mediante PAAF). Si la evaluación post-QTN era compatible con respuesta ganglionar completa, se realizó BSGC post-QTN y biopsia axilar dirigida del ganglio marcado con clip. Si ambos resultaban negativos (ypN0), se evitaba la linfadenectomía. Si existía positividad de cualquiera de ellos (ypN1mic, ypN1), se realizó linfadenectomía axilar. En caso de cN2-3 (confirmado con PAAF/BAG pretratamiento), se indicó linfadenectomía axilar en todos los casos, independientemente de la respuesta a QTN.

Tras la cirugía, se pautó hormonoterapia a todas las pacientes con tumores con RH+ y trastuzumab adyuvante en los tumores HER2+ (hasta completar un año de tratamiento). A partir de 2019, las pacientes con CM HER2+ y enfermedad residual tras neoadyuvancia, completaron tratamiento adyuvante con 14 ciclos de TDM-1.(243) Desde 2017, las pacientes con CMTN con enfermedad residual tras QTN y cirugía, recibieron QT adyuvante con capecitabina (1000-1250 mg/m<sup>2</sup>/12 horas x 8 ciclos).(244) Se administró radioterapia a todas las pacientes tratadas con cirugía conservadora, y a aquellas sometidas a mastectomía con factores de alto riesgo para recaída: tumor primario mayor de 5 cm, T4 y/o N2-3 clínico o patológico, pacientes premenopáusicas con afectación ganglionar tras QTN, posmenopáusicas con más de tres ganglios afectados tras QTN, o margen de resección positivo.

Todas las pacientes fueron valoradas en comité de tumores al diagnóstico y, reevaluadas en caso de precisarlas, en cualquier momento del tratamiento o seguimiento posterior.

### **3.3. VARIABLES DEL ESTUDIO**

Las variables analizadas incluyen información clínica, anatomo-patológica, aspectos terapéuticos, variables necesarias para la evaluación de resultados, biomarcadores inmunes del TME (sTIL) y circulantes (RNL).

### 3.3.1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS

Las variables demográficas y clínico-patológicas, así como la información del tratamiento y la respuesta, se obtuvieron de la historia clínica tras revisar los documentos en papel y los sistemas de historia electrónica. Las variables clínicas incluidas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Variables clínicas y derivadas incluidas en el análisis

Variable	Tipo de variable	Unidades - Valores
Raza	categoría nominal	0: caucásica, 1: africana, 2: asiática, 3: otras, 4: desconocido
Fecha nacimiento	fecha	DD/MM/AAAA
Peso	cuantitativa continua	Kilogramos
Talla	cuantitativa continua	Metros
Status menstrual	categoría binaria	0: postmenopausia, 1: pre/perimenopausia
BRCA	categoría nominal	0: no mutación, 1: mutación <i>BRCA1</i> , 2: mutación <i>BRCA2</i> , 3: desconocido, 4: mutación en otros genes (especificar)
Fecha diagnóstica	fecha	DD/MM/AAAA
ECOG	categoría ordinal	0: ECOG 0, 1: ECOG 1, 2: ECOG 2, 3: ECOG 3, 4: ECOG 4
cT	categoría ordinal	1: cT1, 2: cT2, 3: cT3, 4: cT4a/b/c, 5: cTd, 6: cTx
cN	categoría ordinal	0: cN0, 1: cN1, 2: cN2, 3: cN3, 4: cNx
Estadio clínico	categoría ordinal	1: IA, 2: IB, 3: IIA, 4: IIB, 5: IIIA, 6: IIIB, 7: IIIC
Variables derivadas		
Edad al diagnóstico	fecha	Fecha diagnóstica – fecha de nacimiento
IMC	cuantitativa continua	Kilogramos/m <sup>2</sup>

cT: tamaño tumoral clínico. cN: afectación ganglionar clínica. DD/MM/AAAA: día/mes/año. ECOG: clasificación del Eastern Cooperative Oncology Group, para evaluar la situación funcional de los pacientes oncológicos. IMC: índice de masa corporal.

### 3.3.2. VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS

Los datos relativos a la clasificación histológica y molecular, obtenidos tras la revisión de los informes de anatomía patológica de las BAG realizadas al diagnóstico, así como de los informes anatomopatológicos de la pieza quirúrgica, se recogen en la tabla 4 (datos anatomopatológicos al diagnóstico) y tabla 5 (datos anatomopatológicos tras la administración de QTN).

Tabla 4. Variables anatomopatológicas al diagnóstico

Variable	Tipo de variable	Unidades - Valores
Subtipo histológico	categoría nominal	1: NST, 2: lobulillar infiltrante, 3: otros
pN (si BSGC pre-QTN)	categoría ordinal	0: pN0, 1: pN1, 2: pN2, 3: pN3, 4: pN1mi, 5: pNx
Invasión vascular	categoría binaria	0: ausente, 1: presente
RE	categoría binaria	0: negativo, 1: positivo
RE_%	cuantitativa continua	% de positividad
RP	categoría binaria	0: negativo, 1: positivo
RP_%	cuantitativa continua	% de positividad
RH	categoría binaria	0: negativo, 1: positivo
HER2	categoría binaria	0: negativo, 1: positivo
Ki67_%	cuantitativa continua	% de positividad
Grado	categoría ordinal	1: Grado 1, 2: Grado 2, 3: Grado 3
Variable derivada		
Subtipo al diagnóstico	categoría nominal	1: RH+/HER2-, 2: RH+/HER2+, 3: RH-/HER2+, 4: CMTN, 5: desconocido
Subtipo luminal A/B	categoría binaria	1: A (RH+ & HER2- & Ki67 ≤20%) 2: B (RH+ & HER2- & Ki67 > 20% ó G3)

BSGC: biopsia selectiva de ganglio centinela. CMTN: cáncer de mama triple negativo. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. NST: No Special Type. pN: afectación ganglionar patológica (si BSGC pre-QTN). RE: receptor de estrógenos. RH: receptor hormonal. RP: receptor de progesterona.

Tabla 5. Variables anatomopatológicas tras el tratamiento neoadyuvante

Variable	Tipo de variable	Unidades - Valores
AP_BSGC	categórica ordinal	0: ypN0, 1: ypN1mic, 2: ypN1 (1-2 ganglios), 3: > 2 ganglios afectados
Margen quirúrgico	categórica binaria	0: negativo, 1: positivo
ypT	categórica ordinal	0: ypT0, 1: ypT1, 2: ypT2, 3: ypT3, 4: ypT4, 5: ypTis, 6: ypTx
ypN	categórica ordinal	0: ypN0, 1: ypN1, 2: ypN2, 3: ypN3, 4: ypN1mi, 5: ypNx
Inv. extracapsular	categórica binaria	0: no, 1: sí
ypN_Evaluados	cuantitativa continua	Número de ganglios evaluados
ypN+	cuantitativa continua	Número de ganglios afectados
RCp	categórica binaria	0: no, 1: sí
RCB	categórica ordinal	0: RCB 0, 1: RCB I, 2: RCB II, 3: RCB III, 4: desconocido
Subtipo post-QTN	categórica nominal	1: RH+/HER2-, 2: RH+/HER2+, 3: RH-/HER2+, 4: CMTN, 5: desconocido
Ki67 post-QTN	cuantitativa continua	% de positividad
Invasión vascular post-QTN	categórica binaria	0: ausente, 1: presente

AP: anatomía patológica. BSGC: biopsia selectiva de ganglio centinela. CMTN: carcinoma de mama triple negativo. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. QTN: quimioterapia neoadyuvante. RCB: residual cancer burden. RCp: respuesta completa patológica. ypN: afectación ganglionar tras QTN. ypT: tamaño tumoral tras QTN. RE: receptor de estrógenos. RH: receptor hormonal.

### 3.3.3. VARIABLES RELACIONADAS CON EL TRATAMIENTO

Para la correcta evaluación de resultados, se revisaron aspectos relativos al tratamiento neoadyuvante, quirúrgico y adyuvante. Todas las pacientes recibieron tratamiento neoadyuvante con antraciclinas y taxanos, así como anti-HER2 en aquellas pacientes cuyos tumores eran HER2+. Las variables y su clasificación se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Variables relativas al tratamiento neoadyuvante, quirúrgico y adyuvante

Variable	Tipo de variable	Unidades - Valores
Fecha inicio QTN	fecha	DD/MM/AAAA
Fecha fin QTN	fecha	DD/MM/AAAA
Esquema QTN	categoría nominal	1: antraciclinas + taxanos, 2: antraciclinas, 3: taxanos, 4: taxanos + carboplatino, 5: taxanos + carboplatino + antraciclinas, 6: Otros
Ciclos QTN	cuantitativa continua	Número de ciclos
Fecha cirugía	fecha	DD/MM/AAAA
Cirugía mama	categoría binaria	0: cirugía conservadora, 1: mastectomía
Cirugía axilar	categoría binaria	0: BSGC/DAD, 1: linfadenectomía
RT adyuvante	categoría binaria	0: no, 1: sí
HT adyuvante	categoría binaria	0: no, 1: sí
QT adyuvante	categoría nominal	0: no, 1: capecitabina, 2: otra quimioterapia
Anti-HER2 adyuvante	categoría nominal	0: no, 1: PTZ, 2: TTZ, 3: PTZ + TTZ, 4: TDM-1
Otro adyuvante	categoría binaria	0: no, 1: sí (ensayo clínico, inmunoterapia...)

BSGC: biopsia selectiva de ganglio centinela. DAD: disección axilar dirigida. DD/MM/AAAA: día/mes/año. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. HT: hormonoterapia. PTZ: pertuzumab. QTN: quimioterapia neoadyuvante. RT: radioterapia. TDM-1: trastuzumab emtansina, TTZ: trastuzumab.

### 3.3.4. VARIABLES DE RESULTADO

Las variables principales de resultado incluyeron la RCp, que se consideró como la ausencia de células tumorales invasivas tras QTN (ypT0/isypN0); la SLE que se midió desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha del último seguimiento o recaída de la enfermedad invasiva, exceptuando segundos tumores primarios de otra localización diferente a la mama; la SG que se midió desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha del último seguimiento o muerte y la SGCM, que comprendió el período del diagnóstico hasta la fecha del último seguimiento o muerte específica por CM.(245) Las variables para evaluación de resultados y su clasificación se detallan en la tabla 7.

Tabla 7. Variables empleadas para la medición de resultados

Variable	Tipo de variable	Unidades - Valores
Fecha diagnóstica	fecha	DD/MM/AAAA
Fecha inicio QTN	fecha	DD/MM/AAAA
Fecha fin QTN	fecha	DD/MM/AAAA
Fecha cirugía	fecha	DD/MM/AAAA
RCp	categoría binaria	0: no, 1: sí
RCB	categoría ordinal	0: RCB 0, 1: RCB I, 2: RCB II, 3: RCB III, 4: desconocido
Fecha última visita	fecha	DD/MM/AAAA
Status última visita	categoría binaria	0: viva sin enfermedad, 1: viva con enfermedad
Recaída	categoría binaria	0: no, 1: sí
Fecha recaída	fecha	DD/MM/AAAA
Tipo recaída	categoría nominal	1: recaída metastásica, 2: recaída local, 3: recaída ganglionar regional, 4: recaída metastásica + locorregional, 5: contralateral
Localización de la recaída metastásica	categoría nominal	0: no recaída a distancia, 1: visceral, 2: ósea, 3: visceral + ósea, 4: ganglionar, 5: partes blandas/locorregional no resecable, 6: SNC, 7: otras
Exitus	categoría binaria	0: no, 1: sí
Exitus por CM	categoría binaria	0: no, 1: sí
Causa exitus	categoría nominal	0: desconocido, 1: tumor, 2: toxicidad, 3: otras causas
Fecha exitus	fecha	DD/MM/AAAA

CM: cáncer de mama. DD/MM/AAAA: día/mes/año. QTN: quimioterapia neoadyuvante. RCp: respuesta completa patológica. RCB: residual cancer burden. SNC: sistema nervioso central.

A continuación, se indican las variables derivadas de las de resultado (tabla 8)

Tabla 8. Variables derivadas de las de resultado

Variables derivadas		
SLE	Cuantitativa continua	Fecha recaída – fecha diagnóstica
SLED	Cuantitativa continua	Fecha recaída distancia – fecha diagnóstica
SG	Cuantitativa continua	Fecha exitus – fecha diagnóstica
SGCM	Cuantitativa continua	Fecha exitus por CM – fecha diagnóstica
Tº Diagn_QTN	Cuantitativa continua	Fecha inicio QTN – fecha diagnóstica
Tº fin QT_Cx	Cuantitativa continua	Fecha cirugía – fecha fin QTN

CM: cáncer de mama. QTN: quimioterapia neoadyuvante. SGCM: supervivencia específica por cáncer de mama. SLE: supervivencia libre de enfermedad. SLED: supervivencia libre de enfermedad a distancia. SG: supervivencia global. Tº: tiempo.

### 3.3.5. EVALUACIÓN DE LOS LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR

La evaluación de los sTIL se realizó por un patólogo de mama experto que desconocía la información clínica de las pacientes. Los sTIL se cuantificaron en secciones de hematoxilina y eosina (H&E) de la biopsia con aguja gruesa del diagnóstico, mediante microscopía de luz, según el método descrito por Salgado et al. (Figura 6).(106) Se realizó una evaluación completa del promedio de los sTIL, empleando secciones de al menos 4-5  $\mu\text{m}$  con aumento  $\times$  200-400.

A modo de resumen, la determinación se realizó cuantificando todas las células mononucleares (incluidos los linfocitos y las células plasmáticas, excluyendo los leucocitos polimorfonucleares) en el compartimento estromal (= % de TIL estromales) y dentro de los límites del tumor invasivo. Los sTIL no incluyeron los linfocitos infiltrados más allá del límite del tumor, el CDIS y los lobulillos normales. Del mismo modo, los sTIL no se puntuaron si había artefactos de aplastamiento, necrosis y/o hialinización, excluyendo el sitio de la biopsia central previa. La cuantificación se informó como valor porcentual (figura 7) y se analizó como una variable continua.

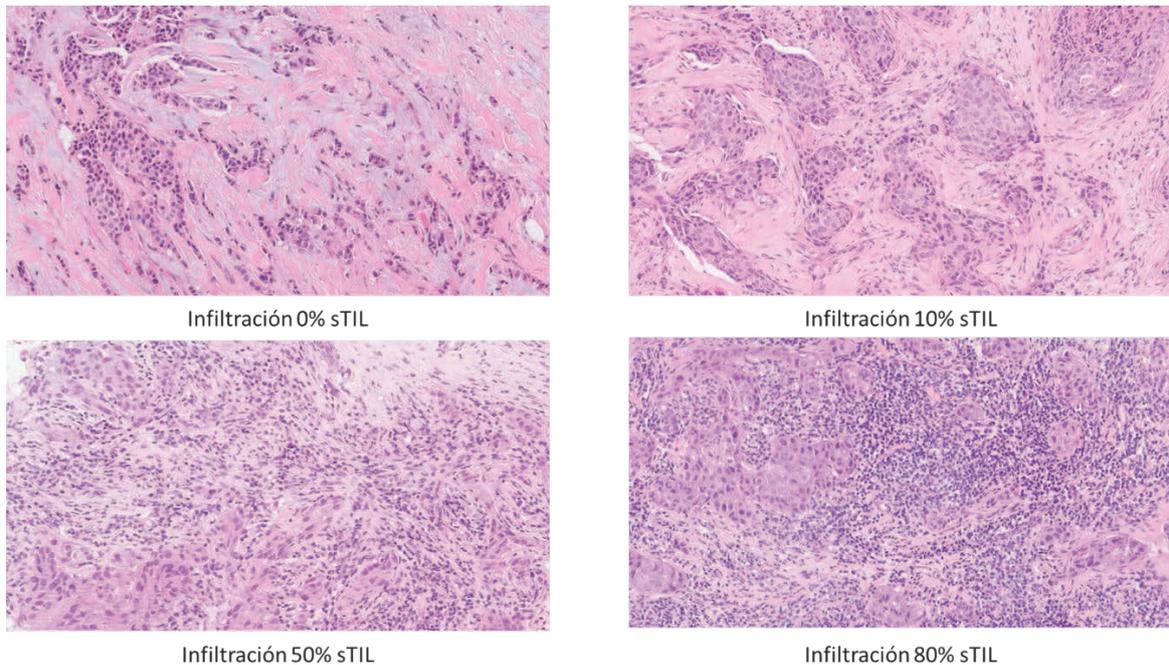


Figura 7. Cuantificación de sTIL en la biopsia al diagnóstico. Se muestran algunos ejemplos de pacientes de nuestra serie, empleando los puntos de corte 0%, 10%, 50% y 80% de sTIL.

### 3.3.6. VARIABLES HEMATIMÉTRICAS Y ESTIMACIÓN DE LA RATIO NEUTRÓFILO-LINFOCITO

Se recogieron parámetros hematimétricos de rutina de bases de datos de laboratorio. El recuento sanguíneo periférico completo se realizó justo antes de iniciar la QTN (tiempo máximo: dos semanas). La RNL pretratamiento se calculó dividiendo el recuento absoluto de neutrófilos ( $\text{neutrófilos} \times 10^{12}/\text{L}$ ) por el recuento absoluto de linfocitos ( $\text{linfocitos} \times 10^{12}/\text{L}$ ). Todas las analíticas se llevaron a cabo de forma centralizada de acuerdo con los procedimientos operativos estandarizados.

## 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 3.4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y DE CORRELACIÓN

El análisis descriptivo de las variables cualitativas incluyó proporciones. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para probar la normalidad de las variables continuas. Las variables continuas con distribución normal se presentaron como medias  $\pm$  desviaciones estándar (Standard Deviation, SD), mientras que las variables con

distribución no normal se presentaron como mediana y rangos intercuartílicos (Interquartile Range, IQR).

La prueba de  $\chi^2$  de Pearson fue utilizada para comparar proporciones o variables ordinales. Las diferencias de medias se estudiaron con la prueba T de Student o ANOVA (paramétricas) o con la prueba U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis (no paramétricas).

Todos los contrastes fueron bilaterales y el nivel de significación estadística se estableció en 0,05. Se proporcionaron los intervalos de confianza al 95% en los casos en los que era adecuado.

### **3.4.2. VARIABLES DE SUPERVIVENCIA Y DESARROLLO DE MODELOS PRONÓSTICOS**

El análisis de supervivencia de las variables resultado SLE y SG se realizó mediante el método de Kaplan-Meier y la comparación entre grupos mediante pruebas log-rank. El impacto predictivo de las distintas variables clínicas y biológicas sobre las variables de resultado se evaluó mediante análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox uni- y multivariable. La selección por el método Forward-stepwise fue la elegida para la construcción del modelo multivariable. Para evitar el problema de la colinealidad, no se incorporaron variables que hubieran presentado correlación fuerte ( $|r| \geq 0.5$ ) ni significativa ( $p < 0.05$ ).

Con la finalidad de seleccionar el mejor modelo predictivo y pronóstico a partir de un número  $n$  de variables independientes (factores de riesgo, pronósticos y/o variables de confusión), se aplicaron dos comandos de análisis sistemático de STATA: *allsets* y *confound*. Ambos son capaces de generar a partir de un modelo total o máximo, que es el que incluye  $n$  variables independientes, todos los posibles submodelos de 1 a  $n$  términos que resultan de la combinación de estos factores. Mediante el comando *allsets*, para cada modelo se calculan los principales índices de discriminación y bondad del ajuste, tales como el área bajo la curva ROC (*Area Under the Curve*, AUC), el índice C de Harrell o el *Akaike Information Criterion* (AIC). De forma complementaria, mediante el comando *confound*, para los mismos modelos se estiman las OR/HR de las variables a evaluar (OR/HR *crudas*, y éstas se comparan con la OR/HR del modelo total (OR/HR *ajustada*)), cambios entre las medidas de asociación crudas y ajustadas superiores al 10% sugieren que la estimación del modelo puede encontrarse sesgada por factores de

confusión. En consecuencia, la utilización de ambos comandos, basados en el análisis masivo y automatizado de modelos de regresión, facilitó la selección del modelo óptimo por medio de criterios objetivos.

La comparación de la capacidad predictiva de los modelos de regresión se evaluó mediante los índices de discriminación AUC (regresión logística), índice C de Harrell (regresión de Cox), el índice de bondad del ajuste AIC y mediante el test de *la likelihood ratio* (LLRT). Las variables biológicas fueron analizadas como variables cuantitativas continuas, si bien se realizaron transformaciones logarítmicas (logaritmo neperiano, ln) de las variables sTIL y RNL, para hacer que los datos cumplieran más fielmente con los supuestos de los procedimientos estadísticos a aplicar, o para mejorar su interpretabilidad. Para la representación gráfica de resultados, se empleó el punto de corte de sTIL > 50%, que corresponde a la definición de CM de predominio linfocítico, y la mediana de la muestra (p50) para la RNL.

### **3.4.3. VALIDACIÓN INTERNA MEDIANTE TÉCNICAS DE MUESTREO ALEATORIO**

Una vez establecido el modelo predictivo o pronóstico óptimos, se analizó la fiabilidad o reproducibilidad del mismo, mediante una validación cruzada. Los datos fueron divididos al azar en 5 grupos de igual tamaño muestral. De forma repetida, cada grupo fue empleado para validar el modelo de regresión estimado a partir de los 4 grupos restantes. Este proceso fue repetido para cada uno de los 5 grupos, de los cuales se obtienen valores pseudo-R<sup>2</sup>, que miden la capacidad predictiva del modelo y se pueden comparar con el valor pseudo-R<sup>2</sup> de la cohorte global.

Asimismo, se empleó un segundo procedimiento mediante remuestreo bootstrap. Para ello, a partir de la cohorte original, se generaron 1000 subgrupos distintos mediante muestro aleatorio con reposición. En cada uno de ellos, se estimó el AUC, de manera que al disponer de cientos de estimaciones se pudo obtener de manera empírica un AUC promedio y un intervalo de confianza, que se pudo comparar también con el de la cohorte global.

#### **3.4.4. BASE DE DATOS Y PAQUETES ESTADÍSTICOS**

La recogida de datos se realizó en una base del paquete IBM SPSS Statistics versión 21. Previo al análisis estadístico, los datos fueron revisados de forma exhaustiva, para mejorar la fiabilidad y la interpretación de los mismos. El análisis estadístico se realizó con STATA v.16 (StataCorp LLC, TX, EEUU).

#### **3.5. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES**

La realización del estudio se ha ajustado a lo establecido en la legislación española (Ley de Investigación Biomédica 14/2007) y en el Reglamento General de Protección de Datos del Parlamento Europeo (Reglamento 2016/679).

El estudio fue aprobado por la Comisión de Ensayos e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Morales Meseguer (código interno: EST07/15). Dado el carácter retrospectivo y sin intervención, ajustado a la práctica clínica habitual, el comité ético no consideró necesaria la adquisición de consentimiento informado, excepto en aquellas pacientes en las que se obtuvo muestra biológica (anexo 1).

Las pacientes fueron anonimizadas para su inclusión en el estudio, de tal forma que los datos personales se encontraban disociados de los clínicos, previo a su tratamiento estadístico. En todo momento se ha garantizado la confidencialidad de la información, de acuerdo a la Ley orgánica 15/1999 de protección de datos de carácter personal.

## RESULTADOS

---



#### 4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

Se identificaron 468 pacientes con CM tratadas con QTN (2009-2019), de las cuales 2 no disponían de seguimiento adecuado, por lo que, la población de estudio fue de 466 pacientes. La mayoría eran de raza caucásica (N=434; 93,1%). La mediana de edad fue de 49 años y los estadios más frecuentes: IIA (32,6%), IIB (18,7%) y IIIA (20,6%). La mediana del IMC se situó en 26,4 (rango: 14,9-55,5) Kg/m<sup>2</sup>. En un 6,4% de las pacientes se detectaron variantes patogénicas en línea germinal (*BRCA1*: N=6; 1,3%, *BRCA2*: N=7; 1,5%, otros genes: N=17; 3,6%). Las características basales se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Características clínicas al diagnóstico

Variable	N=466 (%)
<b>Edad (mediana, rango)</b>	49 (rango: 25-87) años
<b>ECOG</b>	
• ECOG 0 - 1	460 (98,7%)
• ECOG 2	6 (1,3%)
<b>Status menstrual</b>	
• Pre/perimenopausia	263 (56,4%)
• Postmenopausia	203 (43,6%)
<b>cT</b>	
• cT1	36 (7,7%)
• cT2	263 (56,5%)
• cT3	137 (29,4%)
• cT4a/b/c	22 (4,7%)
• cT4d	5 (1,1%)
• cTx	3 (0,6%)
<b>cN</b>	
• cN0	128 (27,5%)
• cN1	154 (33,0%)
• cN2	129 (27,7%)
• cN3	53 (11,4%)
• cNx	2 (0,4%)
<b>Estadio clínico</b>	
• IB	41 (8,8%)
• IIA	152 (32,6%)
• IIB	87 (18,7%)
• IIIA	96 (20,6%)
• IIIB	55 (11,8%)
• IIIC	35 (7,5%)

cT: tamaño tumoral clínico. cN: afectación ganglionar clínica. ECOG: clasificación del Eastern Cooperative Oncology Group, para evaluar la situación funcional de los pacientes oncológicos.

El CM NST fue la histología predominante (95,7%) y aproximadamente la mitad de las pacientes (48,5%) presentaban tumores grado 3. En 56 (12,0%) pacientes se realizó BSGC pre-QTN (pN0: N=35; 62,5%, pN1mi: N=7; 12,5%, pN1: N=14; 25%). La distribución por subtipos incluyó 73,0% de tumores con RH+ (24,7% HER2+), 10,9% RH-/HER2+ y 16,1% CMTN. Las características AP al diagnóstico se detallan en la tabla 10.

Tabla 10. Características anatómo-patológicas al diagnóstico

Variable	N=466 (%)
<b>Subtipo histológico</b>	
• NST	446 (95,7%)
• Lobulillar infiltrante	16 (3,4%)
• Otros	4 (0,9%)
<b>Grado</b>	
• Grado 1	13 (2,8%)
• Grado 2	185 (39,7%)
• Grado 3	226 (48,5%)
• Desconocido	42 (9,0%)
<b>Invasión vascular</b>	
• Ausente	129 (27,7%)
• Presente	51 (10,9%)
• Desconocido	288 (61,4%)
<b>RE</b>	
• Negativo	139 (29,8%)
• Positivo	327 (70,2%)
<b>RP</b>	
• Negativo	187 (40,1%)
• Positivo	279 (59,9%)
<b>RH (RE y/o RP)</b>	
• Negativo	126 (27,0%)
• Positivo	340 (73,0%)
<b>HER2</b>	
• Negativo	300 (64,4%)
• Positivo	166 (35,6%)
<b>KI67</b>	
• ≤ 20%	85 (18,2%)
• > 20%	349 (74,9%)
• Desconocido	32 (6,9%)
<b>Subtipo</b>	
• RH+/HER2-	225 (48,3%)
• RH+/HER2+	115 (24,7%)
• RH-/HER2+	51 (10,9%)
• CMTN	75 (16,1%)
<b>Subtipo RH+/HER2-</b>	N=174
• Luminal A	31 (17,82%)
• Luminal B	143 (82,18%)

CMTN: cáncer de mama triple negativo. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. NST: No Special Type. RE: receptor de estrógenos. RH: receptor hormonal. RP: receptor de progesterona.

En cuanto a la estrategia terapéutica, la mayoría de las pacientes (66,7%) recibieron QTN según el esquema secuencial NSABP-B27 (adriamicina 60 mg/m<sup>2</sup> y ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup> c/21días x 4 ciclos, seguido de docetaxel 100 mg/m<sup>2</sup> c/21días x 4 ciclos). Todas las pacientes con CM HER2- incluidas, excepto un 1,1% con contraindicación para antraciclinas (por edad o comorbilidad limitante), recibieron tratamiento estándar basado en antraciclinas y taxanos. Todas las pacientes con CM HER2+ completaron tratamiento anti-HER2 con quimioterapia estándar basada, según el momento del diagnóstico, en antraciclinas y/o taxanos, taxanos con carboplatino.

Tras QTN, un 57,9% de las pacientes pudo beneficiarse de cirugía mamaria conservadora. En cuanto al tratamiento ganglionar axilar, en 56 pacientes (previas a 2016) se realizó BSGC pre-QTN (12,0% del total de la serie), no precisando tras la neoadyuvancia tratamiento a nivel axilar el 75% de las mismas (pN0: n=35, pN1mi: n=7). Las 14 (25,0%) pacientes con BSGC positiva al diagnóstico fueron sometidas a linfadenectomía axilar tras el tratamiento neoadyuvante. Las pacientes incluidas en la serie a partir de 2016, fueron manejadas de acuerdo al nuevo protocolo de tratamiento de la axila en nuestra unidad, lo que supuso la ausencia de estudio con BSGC al diagnóstico. De estas pacientes, 73 requirieron BSGC post-QTN y el 21,7% fueron sometidas, además, a linfadenectomía por positividad de la BSGC. De las 364 pacientes que precisaron linfadenectomía, se obtuvo al menos diez ganglios linfáticos en 315 (87,9%) casos. Los aspectos más relevantes del tratamiento neoadyuvante y de la cirugía se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. Tratamiento neoadyuvante y quirúrgico

Variable	N=466 (%)
<b>Esquema QTN</b>	
• Antraciclinas + taxanos	46 (9,9%)
○ Esquema B27	311 (66,7%)
• Taxanos	19 (4,1%)
• Taxanos + carboplatino	77 (16,5%)
• Taxanos + carboplatino + antraciclinas	13 (2,8%)
<b>Tratamiento anti-HER2</b>	<b>N=166 (100%)</b>
• TTZ	95 (57,2%)
• TTZ + PTZ	71 (42,8%)
<b>Ciclos QTN (mediana, rango)</b>	8 (rango: 2-9) ciclos
<b>Cirugía mama</b>	
• Cirugía conservadora	270 (57,9%)
• Mastectomía	196 (42,1%)
<b>Cirugía axilar</b>	<b>N=424 (100%)</b>
• BSGC post-QTN	66 (15,6%)
• Linfadenectomía	358 (84,4%)
<b>Tº Diagn_QTN (mediana, rango)</b>	21 (rango: 1-92) días
<b>Tº fin QT_Cx (mediana, rango)</b>	29 (rango: 3-302) días

BSGC: biopsia selectiva de ganglio centinela. B27: adriamicina, ciclofosfamida, docetaxel. Cx: cirugía. QTN: quimioterapia neoadyuvante. Tº: tiempo. PTZ: pertuzumab. TTZ: trastuzumab.

El análisis anatomopatológico de la pieza quirúrgica tras QTN (tabla 12) evidenció un 26,4% de RCp (42,1% RCp axilares). En 74 (18,0%) pacientes se objetivó invasión extracapsular y 7 (1,5%) presentaron márgenes de resección afectos, no ampliables. En todos estos casos, se aplicó RT adyuvante. Se realizó análisis inmunohistoquímico del subtipo post-QTN de la neoplasia mamaria en la mayoría de las pacientes (67,1%) con enfermedad residual. Cabe destacar que el valor de Ki67 tras completar QTN estaba disponible en sólo el 114 (33,2%) de las pacientes con enfermedad residual, por lo que no se determinó el subtipo luminal A o B post-neoadyuvancia.

Tabla 12. Variables anatomopatológicas tras el tratamiento neoadyuvante

Variable	N=466 (%)
<b>ypT</b>	
• ypT0	112 (24,0%)
• ypT1	162 (34,8%)
• ypT2	105 (22,5%)
• ypT3	37 (7,9%)
• ypT4	7 (1,5%)
• ypTis	36 (7,7%)
• ypTx	7 (1,5%)
<b>ypN</b>	
• ypN0	196 (42,1%)
• ypN1	98 (21,0%)
• ypN2	64 (13,7%)
• ypN3	23 (4,9%)
• ypN1mi	29 (6,2%)
• ypNx	56 (12,1%)
<b>Invasión extracapsular</b>	
• No	336 (82,0%)
• Sí	74 (18,0%)
<b>RCp</b>	
• No	343 (73,6%)
• Sí	123 (26,4%)
<b>RCB</b>	
• RCB 0	123 (26,4%)
• RCB I	30 (6,4%)
• RCB II	102 (21,9%)
• RCB III	50 (10,7%)
• Desconocido	161 (34,6%)
<b>Subtipo post-QTN</b>	
• RH+/HER2-	147 (42,9%)
• RH+/HER2+	42 (12,2%)
• RH-/HER2+	15 (4,4%)
• CMTN	26 (7,6%)
• Desconocido	113 (32,9%)

HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. QTN: quimioterapia neoadyuvante. RCB: residual cancer burden. RCp: respuesta completa patológica. ypN: afectación ganglionar tras QTN. ypT: tamaño tumoral tras QTN. RE: receptor de estrógenos. RH: receptor hormonal.

Las estrategias de terapia adyuvante se resumen en la tabla 13. Tras la cirugía, se administró radioterapia a todas las pacientes tratadas con cirugía conservadora, y a aquellas sometidas a mastectomía con factores de alto riesgo para recaída, incluyendo margen de resección positivo no ampliable (N=7; 1,5%). Todas las pacientes con tumores

RH+ recibieron hormonoterapia adyuvante. Las pacientes con CM HER2+, completaron adyuvancia con trastuzumab; una paciente recibió pertuzumab adyuvante por reacción severa a trastuzumab; otra paciente, diagnosticada en noviembre de 2019, recibió TD-M1 adyuvante tras su aprobación por la EMA. A partir de 2017, las pacientes con CMTN con enfermedad residual tras QTN, completaron adyuvancia con capecitabina.

Tabla 13. Tratamiento adyuvante recibido por las pacientes

Variable	N=466 (%)
<b>QT adyuvante</b>	
• No	440 (94,4%)
• Capecitabina	16 (3,4%)
• Otra quimioterapia	10 (2,1%)
<b>Anti-HER2 adyuvante</b>	
• No	290 (62,2%)
• PTZ	1 (0,2%)
• TTZ	174 (37,3%)
• TDM-1	1 (0,2%)
<b>HT adyuvante</b>	
• No	136 (29,2%)
• Sí	330 (70,8%)
<b>RT adyuvante</b>	
• No	22 (4,7%)
• Sí	444 (95,3%)
<b>Otro adyuvante</b>	
• No	459 (98,5%)
• Sí (ensayo, inmunoterapia...)	7 (1,5%)

HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. HT: hormonoterapia. PTZ: pertuzumab. QT: quimioterapia. RT: radioterapia. TDM-1: trastuzumab emtansina, TTZ: trastuzumab.

La mediana de seguimiento en la muestra fue de 5,79 años (rango: 5,41-6,17 años), con una SLE a 3 años del del 90,6% (IC95% 87,53-93,06) y SLE a 5 años del del 88,0% (IC95% 84,68-90,79). La SG a 3 años fue del 95,9% (IC95% 93,7-97,53) y a 5 años del 92,7% (IC95% 89,90-94,89). De forma complementaria, la SGCM a 3 años fue del 96,8% (IC95% 94,75-98,19) y a 5 años del 93,8% (IC95% 91,18-95,79). En la tabla 14, se muestran los resultados de las variables relacionadas con el seguimiento, la supervivencia y el tipo de recaída.

Tabla 14. Variables asociadas a pronóstico adicionales a la respuesta a QTN

Variable	N=466 (%)
<b>Recaída</b>	<b>N=466 (100%)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No</li> <li>• Sí</li> </ul>	401 (86,1%) 65 (13,9%)
<b>Tipo recaída</b>	<b>N=65 (100%)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recaída metastásica</li> <li>• Recaída local</li> <li>• Recaída ganglionar regional</li> <li>• Recaída M1 + locorregional</li> <li>• Contralateral</li> </ul>	46 (70,8%) 5 (7,7%) 5 (7,7%) 8 (1,7%) 1 (0,2%)
<b>Localización de la recaída metastásica</b>	<b>N=54 (100%)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Visceral</li> <li>• Ósea</li> <li>• Visceral + ósea</li> <li>• Ganglionar</li> <li>• SNC</li> <li>• Otras</li> </ul>	12 (22,2%) 15 (27,8%) 7 (13,0%) 9 (16,7%) 7 (13,0%) 4 (7,5%)
<b>Exitus</b>	<b>N=466 (100%)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No</li> <li>• Sí</li> </ul>	427 (91,6%) 39 (8,4%)
<b>Causa exitus</b>	<b>N=39 (100%)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumor</li> <li>• Otras causas</li> </ul>	33 (84,6%) 6 (15,4%)
<b>Seguimiento (mediana, rango)</b>	5,79 (rango: 5,41-6,17) años
<b>SLE a 5 años (IC95%)</b>	88,0% (IC95% 84,68-90,79)
<b>SG a 5 años (IC95%)</b>	92,7% (IC95% 89,90-94,89)

CM: cáncer de mama. IC95%: intervalo de confianza al 95%. M1: metastásico. SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de enfermedad. SNC: sistema nervioso central.

## 4.2. VALOR PREDICTIVO Y PRONÓSTICO DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

### 4.2.1. VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE DE LOS FACTORES CLÁSICOS

Cuando se analizó la tasa de RCp, según el subtipo molecular al diagnóstico, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Las pacientes con CMTN fueron las que alcanzaron mayor tasa de RCp (53,3%), seguido del subtipo HER2+ (49,0% global; 33,9% para el RH+/HER2+), y finalmente el CM RH+/HER2- (8,4%). Los resultados se representan en la figura 8.

Los hallazgos fueron superponibles para la RCp mamaria aislada: CMTN (39/75; 52,0%), RH-/HER2+ (22/51; 43,1%), RH+/HER2+ (30/115; 26,1%) y RH+/HER2- (21/225; 9,3%). Para la RCp axilar, independientemente de la enfermedad residual mamaria, las diferencias se mantuvieron significativas entre subgrupos; sin embargo, el porcentaje fue mayor para el subtipo RH-/HER2+ (39/51; 76,5%), seguido del CMTN (51/75; 68,0%), RH+/HER2+(70/115; 60,9%) y RH+/HER2- (55/225; 24,4%).

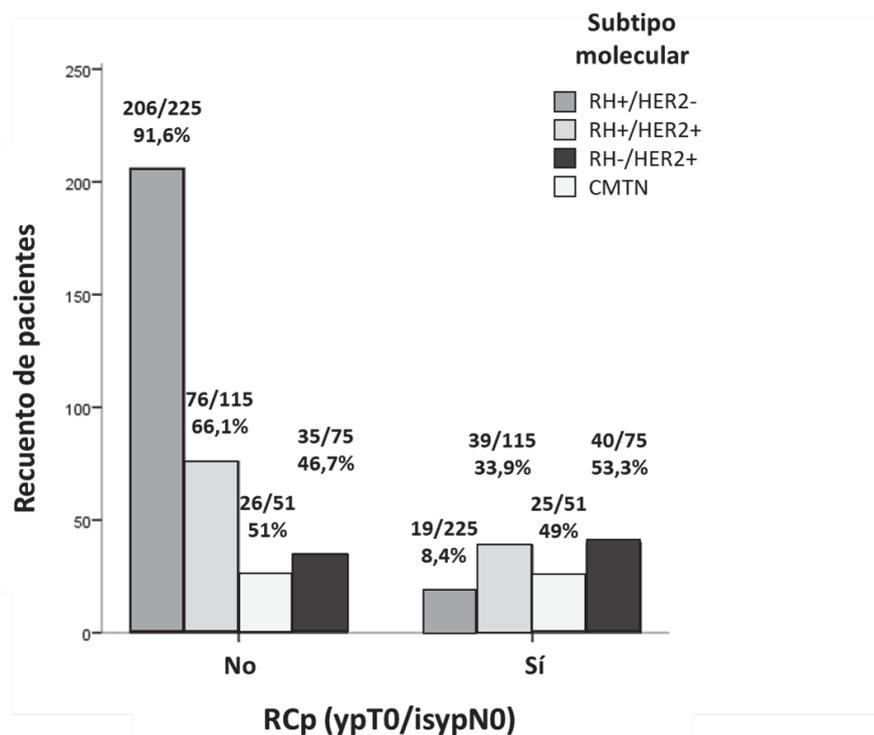


Figura 8. Porcentaje de RCp, según subtipo subrogado inmunohistoquímico

A su vez, se analizó la asociación de las características clínico-patológicas con la RCp tras QTN. El subtipo molecular, así como, el status del RH y HER2 de forma aislada, se mostraron como factores predictivos de RCp. A su vez, el grado histológico (1-2 vs 3) y el KI67 ( $\leq 20\%$  vs  $> 20\%$ ) también demostraron significación estadística. Los resultados más relevantes se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Análisis univariable para la RCp, de los diferentes factores clínico-patológicos al diagnóstico

Variable	OR	IC95%	P
Status menstrual Pre/perimenopausia	0,94	0,62-1,42	0,764
Obesidad (IMC > 30)	0,97	0,59-1,59	0,898
Estadio Dx (I-II vs III)	1,04	0,69-1,59	0,846
Subtipo molecular			
• RH+/HER2-	ref.	-	-
• HER2+	10,43	5,06-24,48	< 0,001
• CMTN	12,39	6,45-23,81	< 0,001
RH+	0,19	0,12-0,30	0,001
HER2+	2,56	1,68-3,91	0,001
Grado (1-2 vs 3)	1,93	1,39-2,68	0,001
Ki67 (≤ 20% vs > 20%)	2,48	1,29-4,76	0,006
Invasión vascular	1,12	0,88-1,42	0,357

CMTN: carcinoma de mama triple negativo. Dx: diagnóstico. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. IMC: índice de masa corporal. OR: *odds ratio*. RH: receptor hormonal.

#### 4.2.2. VALOR PRONÓSTICO DE LA RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE

En el análisis univariable, la RCp (N=466) fue un factor protector para la SLE (HR=0,21; IC95% 0,07-0,59, p=0,003), SG (HR=0,15; IC95% 0,04-0,61, p=0,008) y SGCM (HR=0,08; IC95% 0,01-0,62, p=0,015), de forma estadísticamente significativa (figura 9).

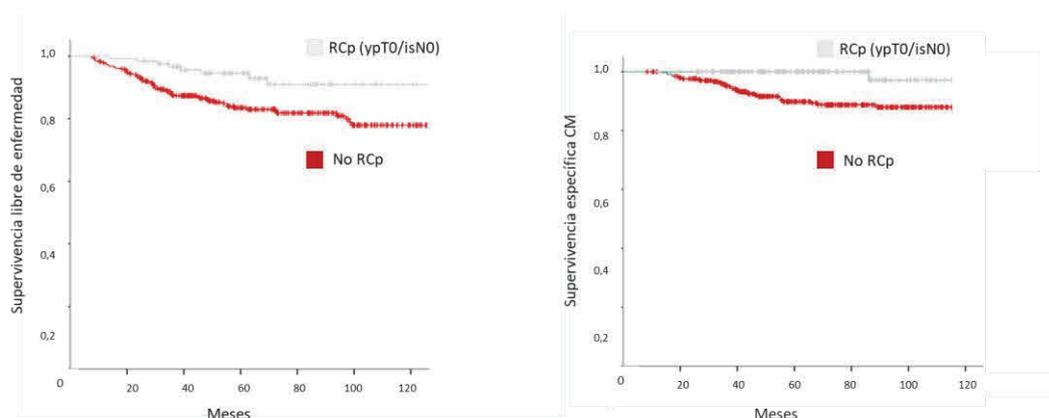


Figura 9. Curvas de Kaplan-Meier para SG y SGCM, según RCp

El significado pronóstico de la RCp, estratificado por subtipo, se muestra en la tabla 16. Cabe destacar que la RCp mostró una tendencia a comportarse como variable protectora consistente en todos los subtipos moleculares, si bien, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, probablemente por el tamaño muestral de cada subgrupo. De forma exploratoria, se realizó un análisis adicional según el status de RH y HER2, encontrando diferencias estadísticamente significativas para la SLE, en las pacientes con RH+.

Tabla 16. Análisis univariable del valor pronóstico de la RCp, según subtipo molecular

Variable RCp	SLE			SG			SGCM		
	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P
RH+/HER2-	0,04	0,0-8,199	0,241	0,04	0,0-36,50	0,398	0,04	0,0-62,92	0,398
RH+/HER2+	0,26	0,03-2,13	0,210	0,03	0,0-59,26	0,354	0,03	0,0-147,99	0,407
RH-/HER2+	0,27	0,03-2,46	0,250	0,24	0,03-2,06	0,192	0,02	0,0-52,21	0,319
CMTN	0,34	0,07-1,73	0,193	0,14	0,02-1,20	0,073	0,14	0,02-1,20	0,073
<b>Análisis exploratorio, según status de RH y HER2</b>									
RH+	0,11	0,02-0,81	<b>0,030</b>	0,04	0,0-2,92	0,139	0,04	0,0-4,29	0,174
HER2+	0,28	0,06-1,25	0,096	0,17	0,02-1,30	0,087	0,02	0,0-8,27	0,208

CMTN: cáncer de mama triple negativo. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. HR: Hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza al 95%. RCp: respuesta completa patológica. RH: receptor hormonal. SGCM: supervivencia específica de CM. SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de enfermedad.

La determinación de RCB estaba disponible en 305 pacientes. Su significado pronóstico en términos de SLE, SG y SGCM se recoge en la tabla 17. Globalmente, no hubo diferencias significativas entre las pacientes RCB 0 y RCB I. Sin embargo, el riesgo aumentó progresivamente y de forma significativa para las pacientes con RCB II y RCB III.

Tabla 17. Análisis univariable del valor pronóstico del RCB

Categorías RCB	SLE			SG			SGCM		
	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P
<b>RCB 0</b>	ref	n/a	n/a	ref	n/a	n/a	ref	n/a	n/a
<b>RCB I</b>	1,13	0,24-5,31	0,88	2,33	0,21-25,67	0,49	4,71	0,30-75,38	0,27
<b>RCB II</b>	2,52	1,07-5,94	<b>0,035</b>	6,57	1,44-29,98	<b>0,015</b>	13,2	1,69-103,2	<b>0,014</b>
<b>RCB III</b>	4,78	1,98-11,54	<b>0,001</b>	12,93	2,79-59,86	<b>0,001</b>	20,3	2,5-165,27	<b>0,005</b>

CM: cáncer de mama. HR: Hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza al 95%. RCB: residual cancer burden. SGCM: supervivencia específica de CM. SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de enfermedad.

Dada la limitación de tamaño muestral para las categorías, en la valoración del índice RCB por subtipo molecular, los IC95% fueron amplios y no alcanzaron la significación estadística. Específicamente en las pacientes con tumores RH+, se objetivaron diferencias en términos de SLE, para las pacientes con RCB 3 (HR=4,83; IC95% 1,68-13,93) vs RCB 0-I (referencia), no así para las pacientes con índice RCB II residual (HR=1,82; IC95% 0,61-5,44). Los resultados fueron similares para la SG (HR=14,66; IC95% 1,80-119,20) y SCM (HR=10,59; IC95% 1,24-90,70) en la comparación del RCB III vs RCB 0-I. El modelo global (no considerando la variable como categórica) fue concordante con lo presentado en la serie general, para todos los subtipos y de forma estadísticamente significativa (p=0,001).

#### 4.2.3. VALOR PRONÓSTICO DE LOS FACTORES CLÍNICOS CLÁSICOS

Se realizó un análisis de las variables clínico-patológicas con potencial impacto pronóstico. Los resultados se sintetizan en las tablas 18A y 18B. Para las características al diagnóstico, se encontró que las pacientes con estadio I-II vs III, presentaron mayor SLE (HR=1,87; IC95% 1,10-3,18) y SGCM (HR=2,66; IC95% 1,31-5,41). Las pacientes con CM HER2+ presentaron mayor SLE (HR=0,52; IC95% 0,28-0,97), aunque sin diferencias significativas para la SG (HR=0,66; IC95% 0,33-1,33) ni para la SGCM (HR=0,54; IC95% 0,24-1,19).

Tras QTN, el tamaño tumoral residual (ypT0 vs ypT3-4) se mostró como factor pronóstico significativo para la SLE (HR=6,09; IC95% 2,11-17,54) y la SGCM (HR=8,46; IC95% 1,71-41,97). Asimismo, para la afectación ganglionar residual (ypN0 vs ypN1, ypN2, ypN3), el impacto pronóstico fue negativo y creciente, siendo máximo para las pacientes con enfermedad residual ypN3, en comparación con aquellas sin enfermedad residual, para SLE (HR=13,0; IC95% 5,85-29,07) y SGCM (HR=11,92; IC95% 3,45-41,21).

Adicionalmente, las pacientes con margen de resección positivo y no ampliable, presentaron peor evolución en términos de SG (HR=4,52; IC95% 1,10-18,8) y SGCM (HR=5,53; IC95% 1,32-23,18).

Tabla 18A. Análisis univariable del valor pronóstico de los factores clínico-patológicos al diagnóstico

Variables	SLE			SG			SGCM		
	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P
Status menstrual Pre-meno.	0,76	0,44-1,29	0,305	0,97	0,52-1,83	0,934	1,32	0,65-2,68	0,449
Obesidad (IMC≥30)	1,15	0,60-2,18	0,681	1,43	0,70-2,96	0,329	1,58	0,73-3,41	0,247
Estadio Dx (I-II vs III)	1,87	1,10-3,18	<b>0,021</b>	3,04	1,56-5,9	<b>0,001</b>	2,66	1,31-5,41	<b>0,007</b>
RH+	1,24	0,67-2,32	0,492	0,76	0,39-1,48	0,419	0,763	0,37-1,57	0,463
HER2+	0,52	0,28-0,97	<b>0,039</b>	0,66	0,33-1,33	0,242	0,54	0,24-1,19	0,124
Grado (1-2 vs 3)	0,96	0,55-1,68	0,888	1,47	0,75-2,88	0,258	1,97	0,93-4,19	0,077
Invasión vascular	0,95	0,70-1,29	0,723	0,79	0,55-1,11	0,173	0,74	0,51-1,08	0,118

CM: cáncer de mama. Dx: diagnóstico. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. HR: Hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza al 95%. IMC: índice de masa corporal. RH: receptor hormonal. SGCM: supervivencia específica de CM. SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de enfermedad.

Tabla 18B. Análisis univariable del valor pronóstico de los factores clínico-patológicos tras QTN

Variables	SLE			SG			SGCM		
	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P
<b>ypT</b>	ref	n/a	n/a	ref	n/a	n/a	ref	n/a	n/a
• ypT0	1,75	0,42-7,33	0,443	2,86	0,58-14,2	0,20	2,84	0,40-20,17	0,30
• ypTis									
• ypT1 - ypT2	2,56	1,00-6,58	0,051	2,89	0,86-9,66	0,085	3,94	0,92-16,87	0,065
• ypT3-ypT4	6,09	2,11-17,54	<b>0,001</b>	7,44	2,0-28,1	<b>0,003</b>	8,46	1,71-41,97	<b>0,009</b>
<b>ypN</b>	ref	n/a	n/a	ref	n/a	n/a	ref	n/a	n/a
• ypN0									
• ypNmi	2,00	0,57-7,10	0,282	2,36	0,49-11,4	0,285	3,32	0,64-17,09	0,152
• ypN1	2,52	1,13-5,61	<b>0,024</b>	3,26	1,22-8,8	<b>0,019</b>	4,08	1,33-12,48	<b>0,014</b>
• ypN2	3,93	1,76-8,74	<b>0,001</b>	4,98	1,9-13,4	<b>0,001</b>	6,99	2,34-20,86	<b>0,001</b>
• ypN3	13,0	5,85-29,07	<b>0,001</b>	11,76	4,1-33,6	<b>0,001</b>	11,92	3,45-41,21	<b>0,001</b>
<b>Inv. extracap.</b>	5,63	3,13-10,11	<b>0,001</b>	4,20	2,07-8,5	<b>0,001</b>	4,38	2,02-9,48	<b>0,001</b>
<b>Inv. vascular tras QTN</b>	1,38	0,98-1,94	0,068	1,28	0,85-1,93	0,231	1,44	0,93-2,23	0,099
<b>Margen +</b>	3,10	0,75-12,74	0,117	4,52	1,1-18,8	<b>0,038</b>	5,53	1,32-23,18	<b>0,019</b>

CM: cáncer de mama. HR: Hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza al 95%. Inv: invasión. QTN: quimioterapia neoadyuvante. SGCM: supervivencia específica de CM. SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de enfermedad. ypN: afectación ganglionar tras neoadyuvancia. ypT: tamaño tumoral tras neoadyuvancia. +: afecto/positivo.

### 4.3. OBJETIVO 1: ANÁLISIS DE LA INFILTRACIÓN LINFOCITARIA TUMORAL

#### 4.3.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

Del total de pacientes (N=466), los sTIL se pudieron cuantificar en 397 (85,19%). La mediana global de sTIL fue 10% (rango: 0-80%), siendo la media de 16,29%. El test de Kolmogorov-Smirnov reveló una distribución no normal ( $p < 0,001$ ) de los valores de sTIL (figura 10). De la serie, 20 (5,0%) pacientes presentaron carcinomas de predominio linfocitario (sTIL > 50%).

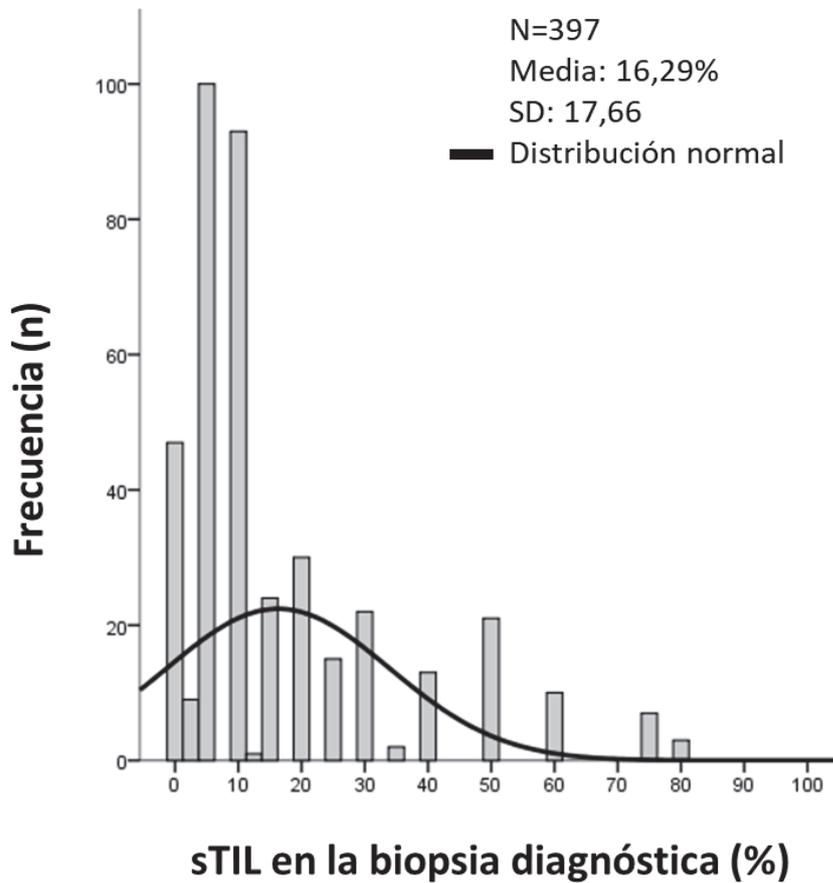


Figura 10. Histograma, en el que se representan los valores de sTIL de las pacientes

Se realizó un análisis exploratorio, teniendo en cuenta las principales características clínico-patológicas que podían influir en los sTIL. Las pacientes mostraron diferencias significativas en el % sTIL, según edad al diagnóstico (mayor infiltración en pacientes  $\leq$  40 años), subtipo histológico (mayor infiltración en CM NST respecto al carcinoma lobulillar), grado de diferenciación (mayor infiltración a mayor grado, I < II < III) y subtipo (el mayor porcentaje de infiltración fue para los tumores RH-/HER2+, seguido del CMTN y, finalmente el CM RH+/HER2-).

Los resultados se muestran en las tablas 19A y 19B. Las figuras 11 y 12 representan los sTIL en la serie global, según grado histológico y subtipo IHQ, respectivamente.

Tabla 19A. Análisis de los sTIL, según características clínico-patológicas al diagnóstico

Variables	sTIL				
	Recuento n=397	%	Mediana	Rango	P (U de Mann-Whitney)
<b>Edad</b>					
• $\leq$ 40 años	63	15,87%	10%	0-80%	<b>0,016</b>
• > 40 años	334	84,13%	10%	0-80%	
<b>Status menstrual</b>					
• Pre-menop.	222	55,92%	10%	0-80%	0,082
• Post-menop.	175	44,08%	10%	0-80%	
<b>Obesidad</b>					
• No	307	77,33%	10%	0-80%	0,205
• Sí	90	22,67%	10%	0-75%	
<b>Subtipo histológico</b>	n=394				
• CM NST	380	96,45%	10%	0-80%	<b>0,040</b>
• Ca. lobulillar	14	3,55%	5%	0-30%	
<b>RH+ (indep. de HER2)</b>					
• Negativo	118	29,72%	10%	0-80%	<b>0,018</b>
• Positivo	279	70,28%	10%	0-80%	
<b>HER2+ (indep. de RH)</b>					
• Negativo	253	63,73%	10%	0-80%	<b>0,001</b>
• Positivo	144	36,27%	10%	0-75%	

HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. RH: receptor hormonal. sTIL: recuento de linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

Tabla 19B. Análisis de los sTIL, según características clínico-patológicas

sTIL					
Variables	Recuento	%	Mediana	Rango	P (Kruskal-Wallis)
<b>Estadio</b>	n=397				
• IB	35	8,82%	5%	0-60%	0,086
• II	196	49,37%	10%	0-80%	
• III	166	41,81%	10%	0-80%	
<b>Grado</b>	n=359				
• Grado 1	12	3,34%	5%	0-10%	< 0,001
• Grado 2	150	41,78%	10%	0-75%	
• Grado 3	197	54,88%	10%	0-80%	
<b>Subtipo</b>	n=397				
• RH+/HER2-	185	46,60%	10%	0-80%	0,001
• RH+/HER2+	94	23,68%	10%	0-75%	
• RH-/HER2+	50	12,59%	20%	0-75%	
• CMTN	68	17,13%	10%	0-80%	
<b>Invasión Vascular</b>	n=146				
• Negativo	104	71,23%	10%	0-75%	0,143
• Positivo	42	28,77%	10%	0-50%	

CMTN: carcinoma de mama triple negativo. Dx: diagnóstico. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. Inv: invasión. NST: no special type. RH: receptor hormonal.

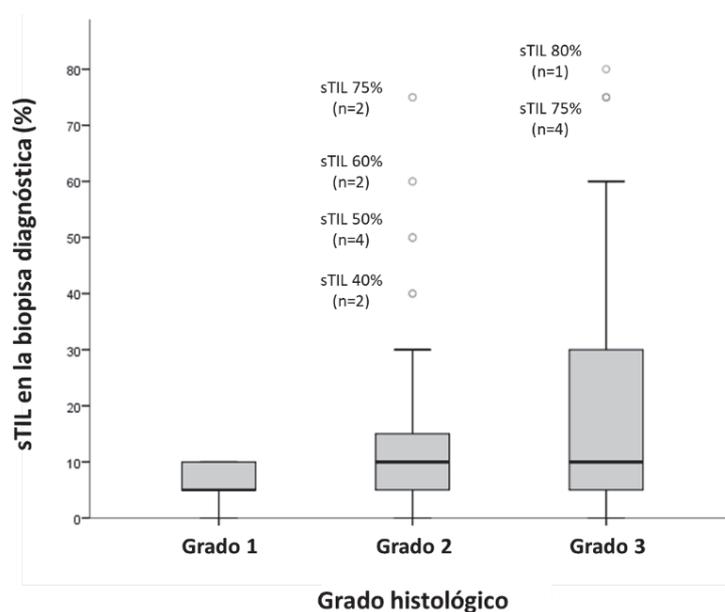


Figura 11. Diagrama de caja, en el que se representan los valores de sTIL según el grado histológico

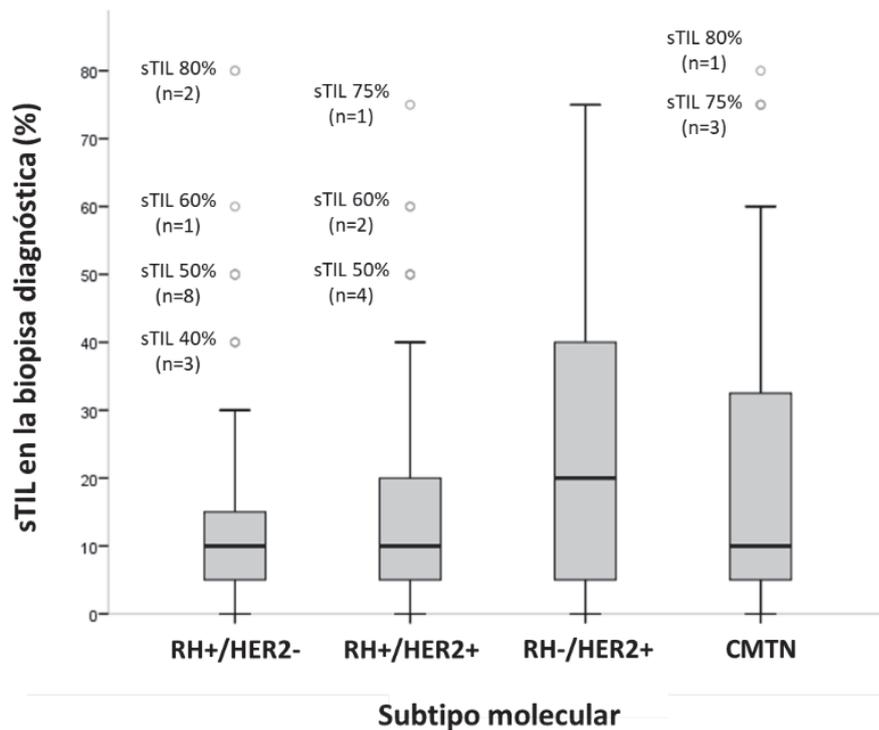


Figura 12. Diagrama de caja, en el que se representan los valores de sTIL según el subtipo inmunohistoquímico

#### 4.3.2. ANÁLISIS DEL VALOR PREDICTIVO DE RCp DE LA INFILTRACIÓN LINFOCITARIA TUMORAL

En el estudio de la asociación entre el biomarcador sTIL y la respuesta a QTN, se encontró que los sTIL, analizados como variable continua, se asociaron significativamente con la RCp (OR=1,03; IC95% 1,02-1,04,  $p < 0,001$ ). También se exploró el valor predictivo de los carcinomas de predominio linfocitario (sTIL > 50%) para la RCp, encontrando significación estadística para la asociación (OR=2,93; IC95% 1,86-4,63,  $p < 0,001$ ). La figura 13 muestra la relación, empleando la mediana y los sTIL de predominio linfocitario, como puntos de corte.

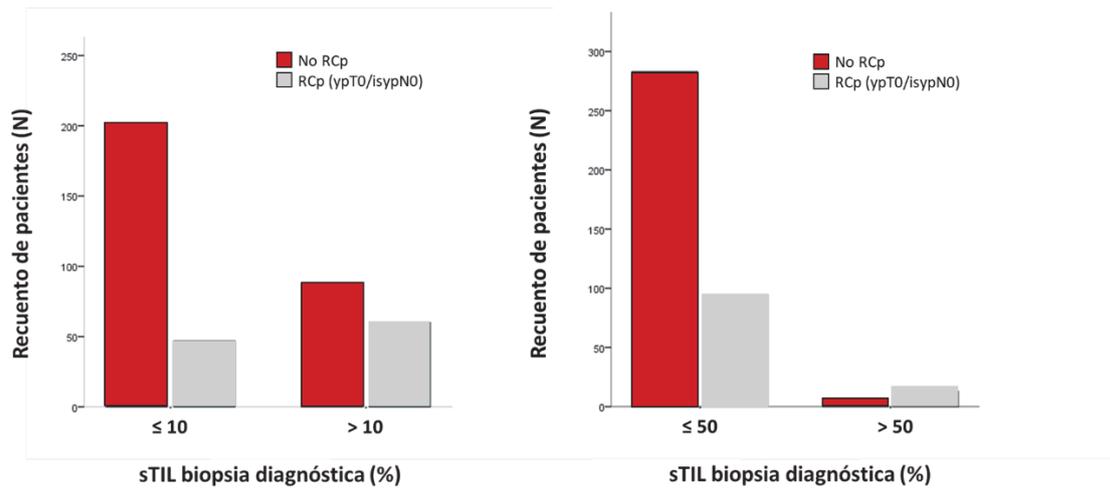


Figura 13. Asociación entre sTIL y RCp

A su vez, se evaluó el valor predictivo para la RCp de los sTIL, estratificando por las variables que habían demostrado ser determinantes en su recuento (edad, subtipo histológico, grado de diferenciación y subtipo molecular, tablas 19A y 19B). También se incluyó el análisis según el estadio al diagnóstico.

En las pacientes  $\leq 40$  años, los sTIL no fueron predictores de RCp (OR=1,01; IC95% 0,99-1,04,  $p=0,382$ ). Sin embargo, en las pacientes  $> 40$  años, los sTIL se mostraron como variable predictora de RCp, de forma estadísticamente significativa (OR=1,04; IC95% 1,02-1,05,  $p<0,001$ ). Teniendo en cuenta el tipo histológico, la predicción se mantuvo para el CM NST (OR=1,03; IC95% 1,01-1,04,  $p<0,001$ ), sin diferencias significativas para CM lobulillar infiltrante ( $p=0,994$ ). De forma similar, la asociación de los TILs con la RCp, fue consistente para el G2 (OR=1,04; IC95% 1,01-1,07,  $p=0,004$ ) y G3 (OR=1,03; IC95% 1,01-1,04,  $p=0,002$ ), no evidenciándose diferencias significativas para el G1 (OR=0,84; IC95% 0,44-1,60,  $p=0,587$ ). Para el estadio al diagnóstico, aunque se objetivó una tendencia en el estadio II (OR=1,02; IC95% 1,00-1,03,  $p=0,080$ ), las diferencias únicamente fueron significativas para el estadio III (OR=1,05; IC95% 1,03-1,08,  $p<0,001$ ).

En la estratificación, según subgrupo IHQ, la asociación únicamente fue significativa para el CM RH+/HER2- (OR=1,05; IC95% 1,02-1,07,  $p=0,001$ ), no encontrándose diferencias significativas para los subtipos RH+/HER2+ (OR=1,02; IC95% 1,00-1,05,  $p=0,109$ ), RH-/HER2+ (OR=1,02; IC95% 0,99-1,05,  $p=0,157$ ) y CMTN (OR=1,01; IC95% 0,99-1,04,  $p=0,210$ ).

Asimismo, de forma exploratoria, se analizó el valor predictivo de los sTIL para el RCB según las categorías RCB 0, RCB I, RCB II y RCB III. Los resultados fueron concordantes con los encontrados para la RCp y se sintetizan en la tabla 20 y la figura 14. Los carcinomas con sTIL > 50%, presentaron mayor tasa de RCp (12,1%) en comparación con la enfermedad residual RCB I, RCB II y RCB III (0%, 3,6% y 0%, respectivamente), de forma significativa (p=0,007).

Tabla 20. Análisis del valor predictivo de los sTIL para el RCB

RCB	OR	IC95%	P
RCB 0	ref	n/a	n/a
RCB I	0,96	0,93-0,99	<b>0,015</b>
RCB II	0,98	0,97-0,99	<b>0,026</b>
RCB III	0,95	0,93-0,98	<b>0,001</b>

IC95%: intervalo de confianza 95%. n/a: no aplica. OR: odds ratio. RCB: residual cancer burden. Ref: referencia.

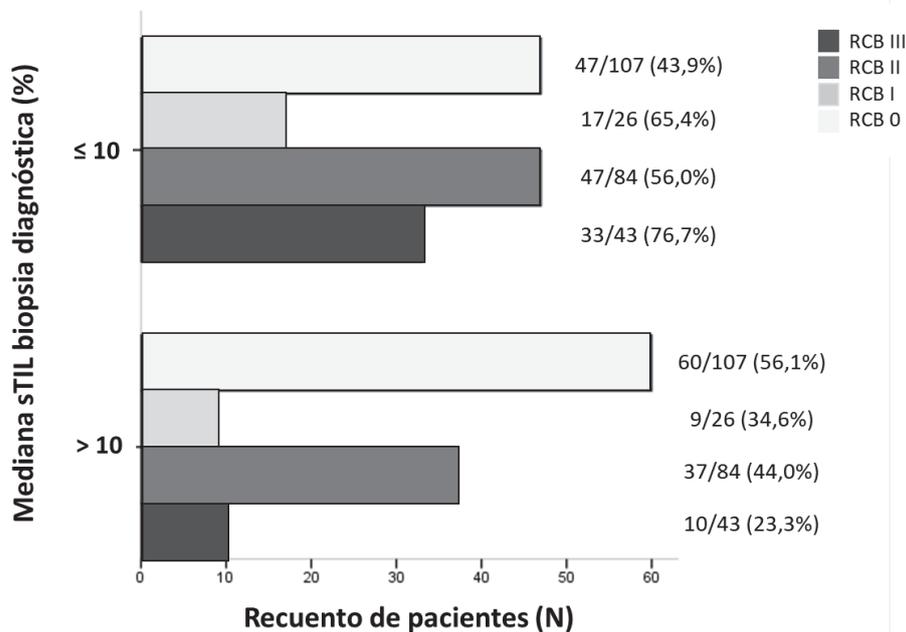


Figura 14. Gráfico, en el que se representa el índice RCB, según sTIL, empleando la mediana como punto de corte

### 4.3.3. ANÁLISIS DEL VALOR PRONÓSTICO DE LA INFILTRACIÓN LINFOCITARIA TUMORAL

En el análisis univariable del biomarcador sTIL, como variable continua, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la serie global, en términos de SLE (HR=0,77; IC95% 0,57-1,05, p=0,096), SG (HR=0,74; IC95% 0,49-1,12, p=0,160) ni SGCM (HR=0,74; IC95% 0,47-1,15, p=0,179).

Posteriormente, se analizó el significado pronóstico dentro de cada subtipo IHQ. Para las pacientes con CMTN, el recuento de sTIL fue un factor protector, en términos de SG y SGCM (HR=0,23; IC95% 0,07-0,72, p=0,011), manteniendo la tendencia para SLE (HR=0,45; IC95% 0,19-1,08, p=0,073), aunque sin alcanzar la significación estadística. Se estudió también a las pacientes con RH+ (independientemente del status de HER2), y en el subgrupo HER2+, sin encontrar diferencias significativas. Los resultados se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Significado pronóstico de los sTIL, según subtipo IHQ

Subtipo IHQ	SLE			SG			SGCM		
	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P
<b>RH+/HER2-</b>	1,02	0,83-1,24	0,875	1,05	0,81-1,4	0,732	1,11	0,88-1,48	0,305
<b>RH+/HER2+</b>	0,94	0,38-2,37	0,901	1,51	0,27-8,7	0,641	1,51	0,27-8,7	0,641
<b>RH-/HER2+</b>	0,63	0,31-1,29	0,206	0,53	0,21-1,3	0,181	0,37	0,11-1,28	0,117
<b>CMTN</b>	0,45	0,19-1,08	0,073	0,23	0,07-0,7	<b>0,011</b>	0,23	0,07-0,72	<b>0,011</b>
<b>RH+</b>	0,85	0,58-1,27	0,429	1,05	0,61-1,8	0,858	1,21	0,68-2,16	0,524
<b>HER2+</b>	0,85	0,48-1,50	0,572	0,85	0,38-1,9	0,693	0,68	0,26-1,76	0,421

CMTN: carcinoma de mama triple negativo. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. HR: Hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza al 95%. IHQ: inmunohistoquímica. RH: receptor hormonal. SGCM: supervivencia específica de cáncer de mama. SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de enfermedad. sTIL: linfocitos infiltrantes tumorales estromales.

Los sTIL se evaluaron como variable continua, aunque se muestran gráficamente de manera binaria según las categorías: sTIL alto/bajo (sTIL  $\leq$  o  $>$  50%, P90), que corresponde a la definición de carcinoma de predominio linfocitario. La figura 15 muestra las curvas de Kaplan-Meier para la SLE.

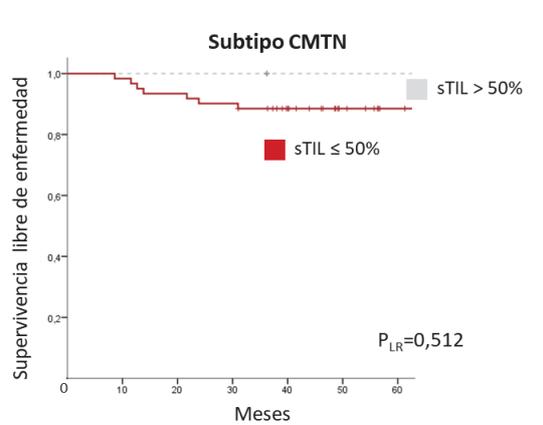
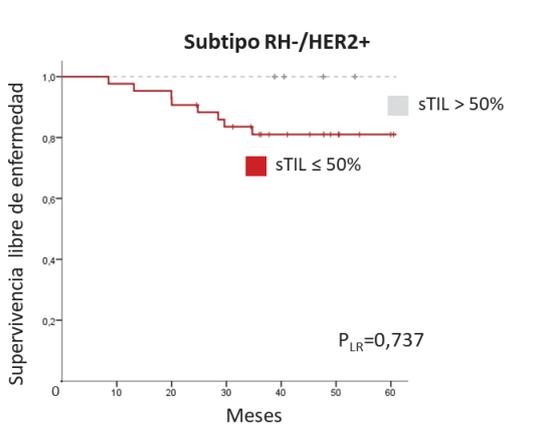
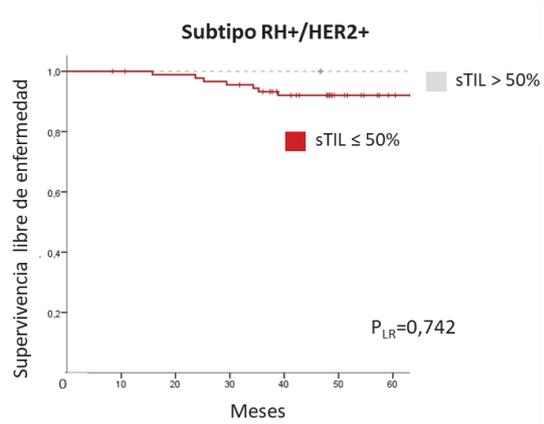
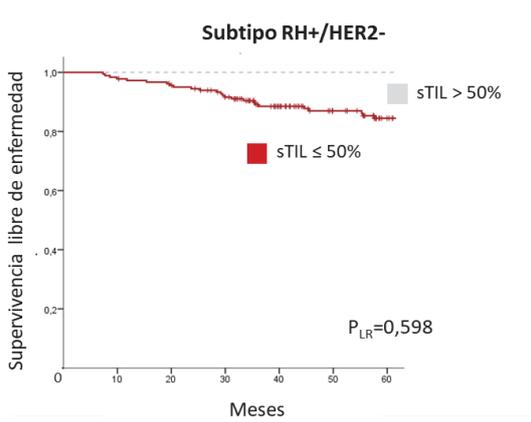


Figura 15. Curvas de Kaplan-Meier para la SLE, según carcinoma de predominio linfocitario (sTIL ≤ o > 50%) y subtipo IHQ

## 4.4. OBJETIVO 2. ANÁLISIS DE LA RATIO NEUTRÓFILO-LINFOCITO

### 4.4.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

Del total de pacientes (N=466), la RNL previa a iniciar tratamiento con QTN se pudo cuantificar en 444 (95,28%) pacientes. La mediana global de la RNL fue 1,92 (rango: 0,32-1,92), siendo la media de 2,25. El test de Kolmogorov-Smirnov reveló una distribución no normal ( $p < 0,001$ ) de los valores de RNL (figura 16).

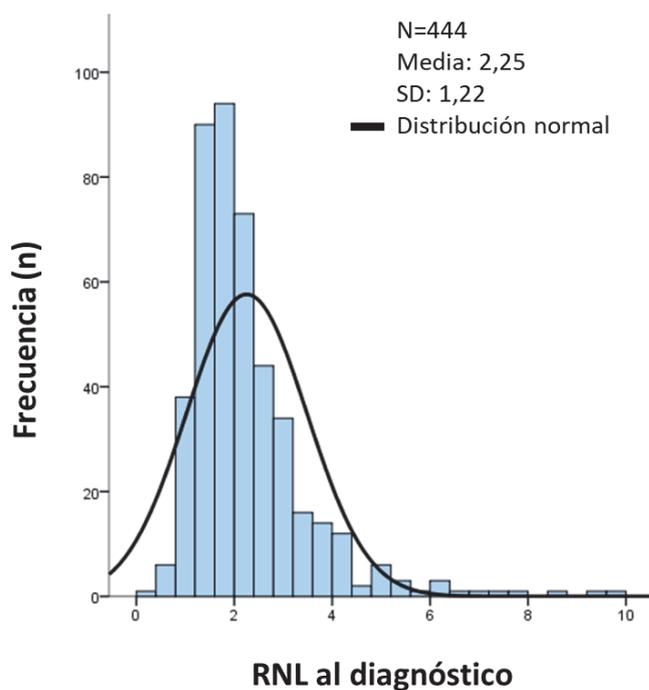


Figura 16. Histograma, en el que se representan los valores de RNL basales

Se realizó un análisis exploratorio, teniendo en cuenta las principales características clínico-patológicas. Para evaluar diferencias en la RNL, según dichas características, se procedió a la comparación de sus medianas.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes subgrupos, incluyendo: edad ( $\leq$  ó  $>$  40 años), status menstrual, obesidad ( $\text{IMC} \leq$  ó  $>$  30  $\text{kg/m}^2$ ), expresión de RH y HER2, estadio al diagnóstico (IB, II ó III), subtipo histológico, grado de diferenciación, clasificación IHQ (RH+/HER2-, RH+/HER2+, RH-/HER2+ y CMTN), así como invasión vascular al diagnóstico.

Los resultados detallados se muestran en las tablas 22A y 22B. Las figuras 17 y 18 representan la distribución de la RNL, según edad y subtipo IHQ, respectivamente.

Tabla 22 A y B. Análisis de la RNL, según características clínico-patológicas

Variables	RNL				P (U de Mann-Whitney)
	Recuento	%	Mediana	Rango	
<b>Edad</b>	n=444				
• ≤ 40 años	78	17,57%	1,85	0,90-9,70	0,664
• > 40 años	366	82,43%	1,95	0,32-9,59	
<b>Status menstrual</b>					
• Pre-menop.	253/444	56,98%	2,0	0,86-9,70	0,054
• Post-menop.	191/444	43,02%	1,82	0,32-8,67	
<b>Obesidad</b>	n=443				
• No	341	76,98%	1,92	0,32-9,70	0,756
• Sí	102	23,02%	2,0	0,50-9,59	
<b>Subtipo histológ.</b>	n=441				
• CM NST	426	96,60%	1,95	0,32-9,70	0,194
Ca. lobulillar	15	3,4%	1,50	1,20-7,36	
<b>RH+</b>	n=444				
• Negativo	117	26,35%	1,90	0,63-6,80	0,378
• Positivo	327	73,65%	1,93	0,32-9,70	
<b>HER2+</b>	n=444				
• Negativo	288/444	64,86%	1,89	0,50-9,70	0,160
• Positivo	156/444	35,14%	2,0	0,32-9,59	

Variables	RNL				P (Kruskal-Wallis)
	Recuento	%	Mediana	Rango	
<b>Estadio Dx</b>	n=444				
• IB	40	9,0%	1,95	0,86-5,20	0,922
• II	229	51,58%	1,92	0,63-9,70	
• III	175	39,42%	1,93	0,32-8,67	
<b>Grado</b>	n=408				
• Grado 1	12	2,94%	2,09	0,93-3,92	0,610
• Grado 2	181	44,36%	1,89	0,63-9,70	
• Grado 3	215	52,70%	2,0	0,32-9,59	
<b>Subtipo IHQ</b>	n=444				
• RH+/HER2-	217	48,9%	1,93	0,50-9,70	0,186
• RH+/HER2+	110	24,8%	1,94	0,32-9,59	
• RH-/HER2+	46	10,4%	2,15	0,63-5,42	
• CMTN	71	16,0%	1,85	0,86-6,80	
<b>Inv. Vascular Dx</b>	n=172				
• Negativo	124	72,09%	2,06	0,32-7,67	0,591
• Positivo	48	27,91%	1,92	1,10-7,36	

CMTN: carcinoma de mama triple negativo. Dx: diagnóstico. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IHQ: inmunohistoquímica. Inv: invasión. NST: no special type. RH: receptor hormonal. RNL: ratio neutrófilo-linfocito.

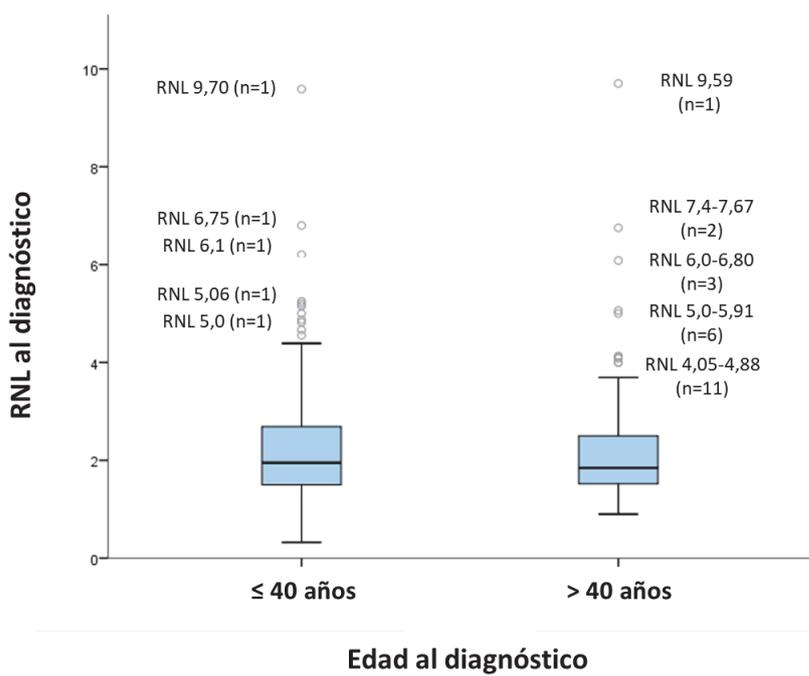


Figura 17. Diagrama de caja, en el que se representan los valores de RNL según edad

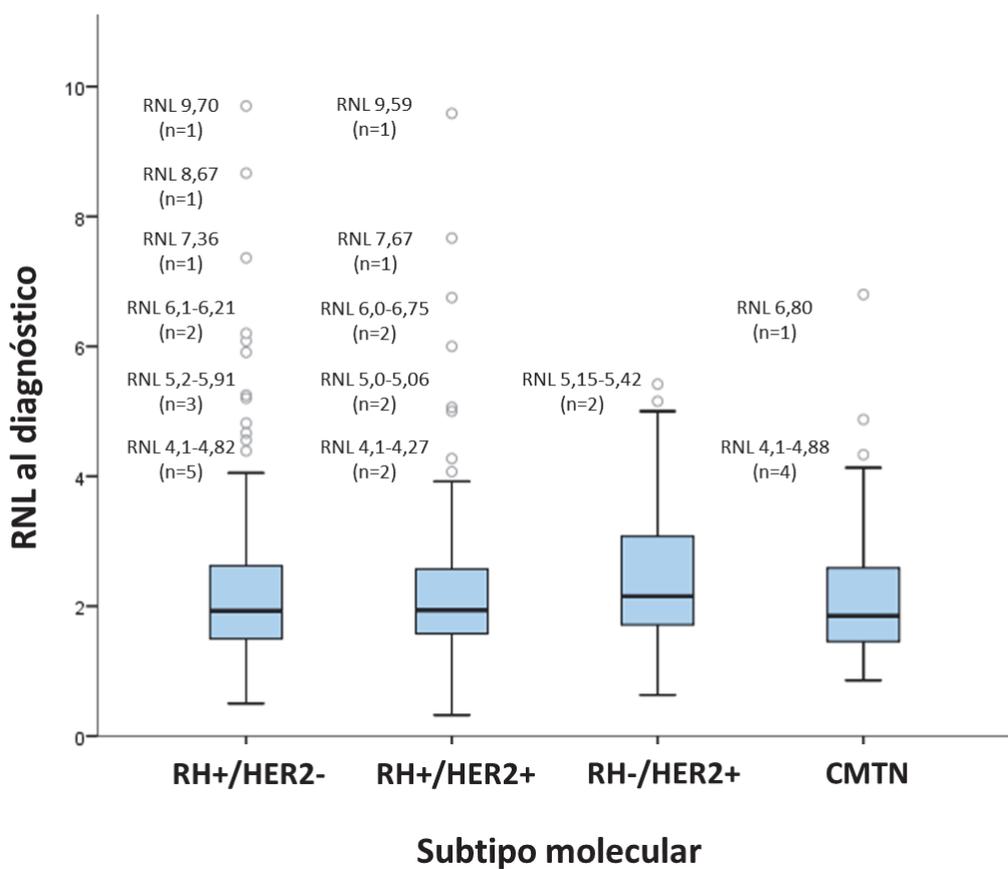


Figura 18. Diagrama de caja, en el que se representan los valores de RNL según subtipo

#### 4.4.2. ANÁLISIS DEL VALOR PREDICTIVO DE LA RATIO NEUTRÓFILO-LINFOCITO

En el estudio de la asociación entre el biomarcador RNL y la respuesta a QTN, la RNL como variable continua, no se asoció con la RCp (OR=0,96; IC95% 0,81-1,15, p=0,685). Curiosamente, las pacientes con RCp axilar presentaron una mediana de RNL basal mayor que aquellas que no consiguieron RCp (mediana, rango: 2,06, 0,51-9,70 vs 1,89, 0,32-9,59), rozando la significación estadística (p=0,053). La figura 19 muestra dicha observación, empleando la mediana como punto de corte.

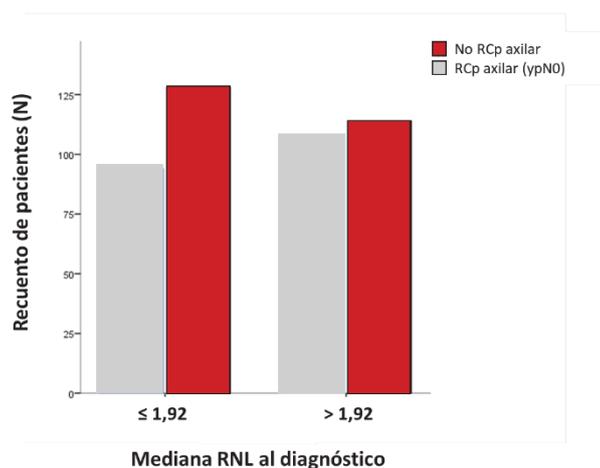


Figura 19. Asociación entre RNL y RCp axilar

A continuación, se evaluó el valor predictivo para la RCp de la RNL, estratificando por las variables: edad, estadio al diagnóstico, subtipo histológico, grado de diferenciación y subtipo molecular.

En cuanto a la edad, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la RCp según RNL, en las pacientes  $\leq 40$  años (OR=0,81; IC95% 0,52-1,27, p=0,362) ni  $> 40$  años (OR=1,0; IC95% 0,83-1,22, p=0,959). Para el estadio al diagnóstico, aunque se objetivó una tendencia en la asociación entre RNL y RCp axilar en el estadio I-II (OR=0,82; IC95% 0,65-1,03, p=0,085), las diferencias no fueron significativas para el estadio III (OR=0,96; IC95% 0,76-1,22, p=0,748) ni para la RCp global. A su vez, no se encontraron diferencias significativas según subtipo histológico: CM NST (OR=0,96; IC95% 0,80-1,15, p=0,644) y carcinoma lobulillar infiltrante (OR=1,01; IC95% 0,27-3,84, p=0,981). De forma similar, la asociación de la RNL con la RCp, no demostró diferencias significativas

para el el G1-2 (OR=0,89; IC95% 0,61-1,29, p=0,528) ni G3 (OR=0,87; IC95% 0,68-1,11, p=0,257).

En el análisis según subtipo IHQ, la asociación positiva entre la RNL y RCp global fue significativa para el subtipo RH+/HER2- (OR=1,34; IC95% 1,00-1,78, p=0,050), no encontrado diferencias estadísticamente significativas para el resto de subtipos: RH+/HER2+ (OR=0,84; IC95% 0,59-1,18, p=0,304), RH-/HER2+ (OR=0,76; IC95% 0,44-1,30, p=0,316) y CMTN (OR=0,71; IC95% 0,43-1,17, p=0,183). La figura 20 muestra la asociación para el subtipo RH+/HER2-, empleando la mediana como punto de corte.

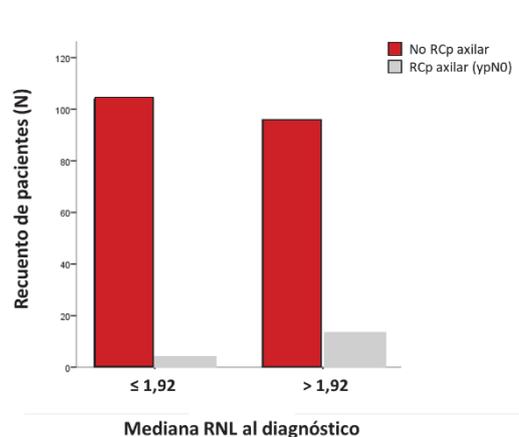


Figura 20. Asociación entre RNL y RCp, en el subtipo RH+/HER2-

A su vez, de forma exploratoria, se analizó el valor predictivo de la RNL para el RCB según las categorías RCB 0, RCB I, RCB II y RCB III en la toda la muestra a estudio. Los resultados fueron concordantes con los encontrados para la RCp, sin diferencias entre grupos, y se sintetizan en la tabla 23.

Tabla 23. Asociación entre RNL y RCB

RCB	OR	IC95%	P
RCB 0	ref	n/a	n/a
RCB I	1,17	0,88-1,54	0,288
RCB II	1,06	0,85-1,32	0,611
RCB III	0,912	0,67-1,24	0,562

IC95%: intervalo de confianza 95%. n/a: no aplica. OR: odds ratio. RCB: residual cancer burden. Ref: referencia.

#### 4.4.3. ANÁLISIS DEL VALOR PRONÓSTICO DE LA RATIO NEUTRÓFILO-LINFOCITO

En el análisis univariable de la RNL, como variable continua, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la serie global, para SLE (HR=0,89; IC95% 0,70-1,13, p=0,320), SG (HR=0,96; IC95% 0,73-1,27, p=0,778) ni SGCM (HR=1,0; IC95% 0,75-1,34, p=0,967).

Posteriormente, se analizó el significado pronóstico, dentro de cada subtipo IHQ. Se estudió también a las pacientes con RH+ (independientemente del status de HER2), y HER2+ (independientemente del status de RH), sin encontrar diferencias significativas. Los resultados se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. Significado pronóstico de la RNL, según subtipo IHQ

Subtipo IHQ	SLE			SG			SGCM		
	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P
RH+/HER2-	0,83	0,60-1,15	0,263	0,99	0,71-1,4	0,960	1,04	0,74-1,45	0,826
RH+/HER2+	1,18	0,77-1,80	0,454	0,95	0,44-2,0	0,897	0,94	0,38-2,28	0,882
RH-/HER2+	0,79	0,39-1,60	0,511	0,75	0,31-1,8	0,523	0,89	0,31-2,56	0,831
CMTN	0,74	0,31-1,77	0,496	0,99	0,45-2,2	0,989	0,99	0,45-2,2	0,989
RH+	0,91	0,70-1,18	0,469	0,98	0,72-1,4	0,918	1,02	0,74-1,41	0,892
HER2+	1,05	0,72-1,52	0,804	0,882	0,49-1,6	0,674	0,95	0,49-1,83	0,877

CMTN: carcinoma de mama triple negativo. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. HR: Hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza al 95%. IHQ: inmunohistoquímica. RH: receptor hormonal. SGCM: supervivencia específica de cáncer de mama. SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de enfermedad. sTIL: linfocitos infiltrantes tumorales estromales.

Además del análisis de RNL como variable continua, se realizó un análisis pronóstico exploratorio empleando la mediana como punto de corte. La RNL baja, definida como igual o inferior a la mediana (1,92), se mostró como factor pronóstico asociado a una peor SLE (HR=0,60; IC95% 0,36-0,99, p=0,048), aunque sin diferencias estadísticamente significativas para la SGCM (HR=0,90; IC95% 0,44-1,81, p=0,759). La figura 21 muestra las curvas de Kaplan-Meier para la SLE.

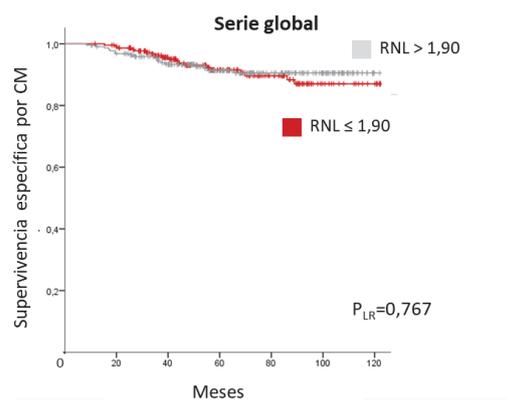
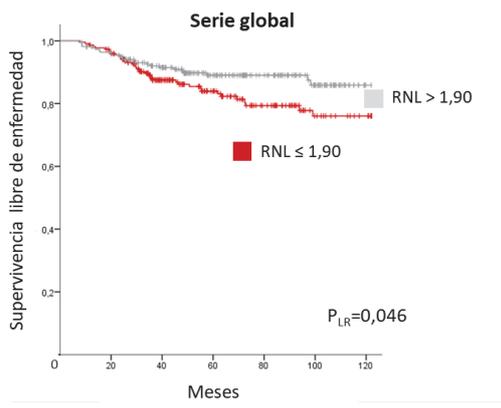


Figura 21. Curvas de Kaplan-Meier para la SLE y SGCM (serie global), empleando la mediana como punto de corte

#### 4.5. OBJETIVO 3: EVALUACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR Y LA RATIO NEUTRÓFILO-LINFOCITO Y DE SU IMPACTO PREDICTIVO Y PRONÓSTICO

##### 4.5.1. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS TIL Y LA RNL

Del total (N=466 pacientes), en 376 (80,9%) pacientes se pudo disponer del análisis completo de las variables clínicas (respuesta a QTN) e inmunológicas (sTIL, RNL). La figura 22 incluye el diagrama de flujo de la serie global.

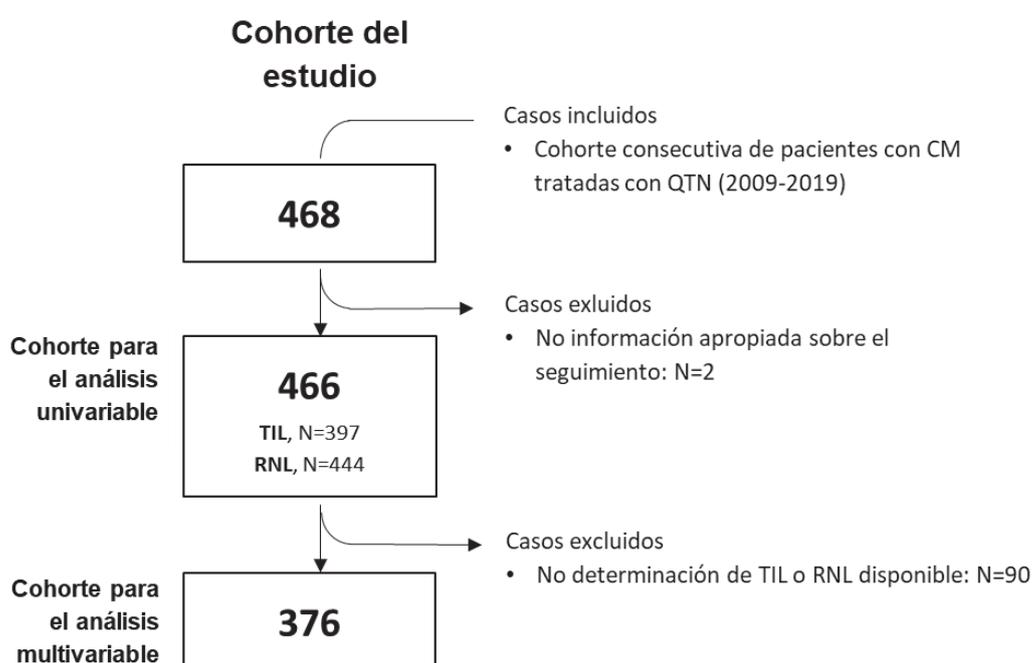


Figura 22. Diagrama de flujo de la serie global

El subgrupo final de 376 pacientes era representativo de la muestra total, dado que las características clínicas y patológicas de ambos grupos eran prácticamente superponibles (tabla 25).

Tabla 25. Comparación de las características basales de la cohorte completa de estudio y de la cohorte para el análisis multivariable

Características basales	N=466 (%)	N=376 (%)	p*
<b>Edad (mediana, rango)</b>	49 (rango: 25-87) años	49 (rango: 25-87) años	0,194
<b>Status menstrual</b>			0,851
• Premenopáusica	263 (56,4%)	213 (56,7%)	
• Postmenopáusica	203 (43,6%)	163 (43,3%)	
<b>Estadio clínico</b>			0,180
• IB	41 (8,8%)	34 (9,0%)	
• IIA	152 (32,6%)	115 (30,7%)	
• IIB	87 (18,7%)	72 (19,1%)	
• IIIA	96 (20,6%)	84 (22,3%)	
• IIIB	55 (11,8%)	41 (10,9%)	
• IIIC	35 (7,5%)	30 (8,0%)	
<b>Subtipo histológico</b>			0,295
• CM NST	446 (95,7%)	361 (96,0%)	
• Carcinoma lobulillar	16 (3,4%)	13 (3,5%)	
• Otros	4 (0,9%)	2 (0,5%)	
<b>Grado histológico</b>			0,746
• Grado 1	13 (2,8%)	11 (2,9%)	
• Grado 2	185 (39,7%)	147 (39,1%)	
• Grado 3	226 (48,5%)	186 (49,5%)	
• Desconocido	42 (9,0%)	32 (8,5%)	
<b>Subtipo IHQ</b>			0,255
• RH+/ HER2-	225 (48,3%)	178 (47,3%)	
• RH+/ HER2+	115 (24,7%)	89 (23,7%)	
• RH-/ HER2+	51 (10,9%)	45 (12,0%)	
• CMTN	75 (16,1%)	64 (17,0%)	
<b>Seguimiento (mediana, rango)</b>	5,79 (5,41-6,17) años	6,0 (5,59-6,41) años	0,226
<b>SLE a 5 años (IC95%)</b>	88,0% (84,68-90,79)	89,9% (86,81-92,50)	0,923
<b>SG a 5 años (IC95%)</b>	92,7% (89,90-94,89)	92,8% (90,21-95,43)	0,845

Todos los pacientes analizados, N=466. Cohorte anidada para el análisis multivariable, n=376.

CM NST: carcinoma de mama no special type. CMTN: carcinoma de mama triple negativo. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. RH: receptor hormonal. SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de enfermedad.

\*El valor de p hace referencia al resultado de comparación entre proporciones o medias de ambos grupos.

El análisis de correlación no evidenció asociación entre la RNL pretratamiento y los sTIL de la biopsia pretratamiento ( $|r|=0,07$ ,  $p=0,177$ ) en la serie global. Se descartó, a su vez, correlación para cada subtipo molecular: RH+/HER2- ( $|r|=0,12$ ,  $p=0,112$ ), RH+/HER2- ( $|r|=0,03$ ,  $p=0,813$ ), RH-/HER2+ ( $|r|=0,19$ ,  $p=0,215$ ) y CMTN ( $|r|=0,18$ ,  $p=0,168$ ). La figura 23 presenta el gráfico de dispersión para la serie global.

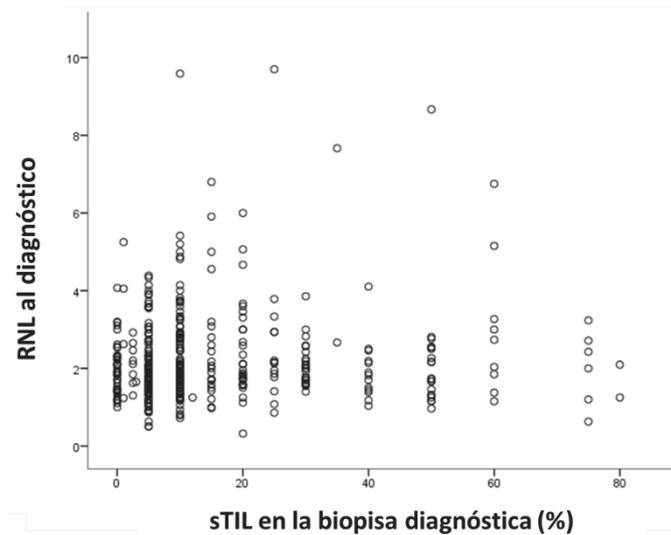


Figura 23. Gráfico de dispersión, para las variables sTIL y RNL al diagnóstico (serie global)

#### 4.5.2. ANÁLISIS DEL VALOR PREDICTIVO COMBINADO DE LOS LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR Y LA RATIO NEUTRÓFILO-LINFOCITO

Mediante regresión de Cox, se evaluó el significado predictivo y pronóstico de los biomarcadores sTIL y RNL en modelos en los que se introdujeron ambas variables, que fueron analizadas como cuantitativas continuas. Se comprobó la ausencia de interacción entre las variables en cada modelo y no se introdujeron otras variables clínico-patológicas para este primer análisis.

En el análisis de la capacidad predictiva de RCp, para la serie global, los sTIL permanecieron como factor predictivo independiente (IC95% 1,27-2,02,  $p<0,001$ ). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas para la RNL (tabla 26).

Tabla 26. Análisis multivariable de los sTIL y la RNL, para la RCp (serie global)

Variables	RCp		
	OR	IC 95%	P
sTIL*	1,60	1,27-2,02	< 0,001
RNL*	1,02	0,63-1,67	0,930

IC95%: intervalo de confianza al 95%. OR: odds ratio. RCp: respuesta completa patológica. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

De forma exploratoria, se realizó un análisis estratificando a las pacientes en los subgrupos: sTIL altos (> mediana) y RNL baja ( $\leq$  mediana), sTIL altos (> mediana) y RNL alta (> mediana), sTIL bajos ( $\leq$  mediana) y RNL baja ( $\leq$  mediana) y, finalmente, el subgrupo de sTIL bajos ( $\leq$  mediana) y RNL alta (> mediana). Con base en la representación gráfica (figura 24), se comprobó que las pacientes con mayor infiltración tumoral, presentaban mayor tasa de RCp, acorde al análisis multivariable que incluía ambos biomarcadores.

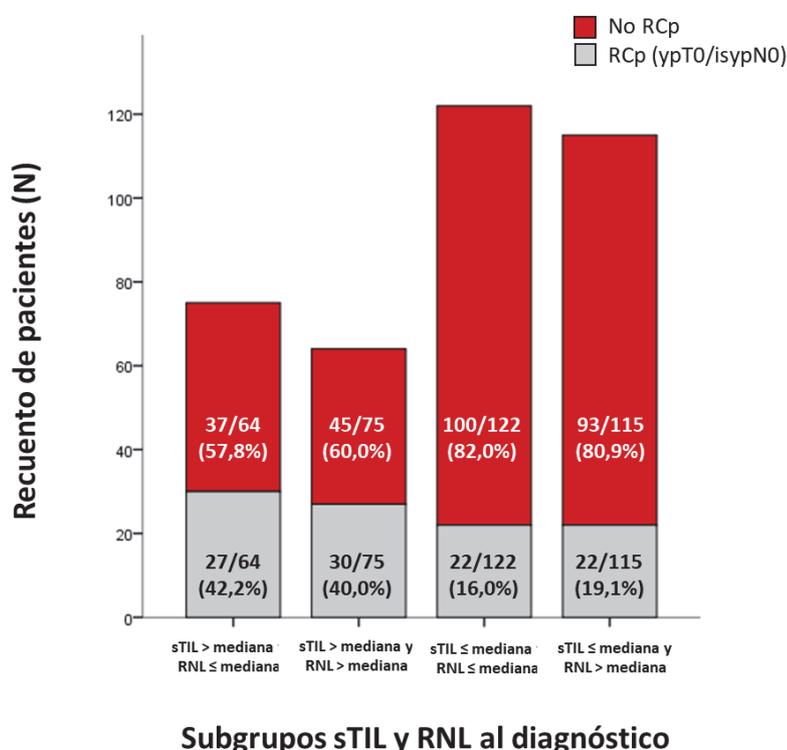


Figura 24. Representación gráfica de la RCp, estratificando a las pacientes según el análisis combinado de sTIL y RNL, empleando la mediana como punto de corte

En el análisis por subtipo molecular, a excepción de las pacientes con CM RH+/HER2-, en el que los sTIL permanecieron como variable independiente para la predicción de la RCp, no se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos (tabla 27).

Tabla 27. Análisis multivariable de los sTIL y la RNL, para la RCp, según subtipo IHQ

RCp			
RH+/HER2- (n=178)			
VARIABLES	OR	IC 95%	P
sTIL*	3,76	1,72-8,22	<b>0,001</b>
RNL*	3,44	1,02-11,61	0,052
RH+/HER2+ (n=89)			
VARIABLES	OR	IC 95%	P
sTIL*	1,40	0,87-2,24	0,166
RNL*	0,79	0,32-1,91	0,593
RH-/HER2+ (n=45)			
VARIABLES	OR	IC 95%	P
sTIL*	1,16	0,69-1,96	0,574
RNL*	0,38	0,09-1,64	0,196
CMTN (n=64)			
VARIABLES	OR	IC 95%	P
sTIL*	1,27	0,88-1,84	0,210
RNL*	0,55	0,15-1,99	0,362

CMTN: carcinoma de mama triple negativo. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. OR: odds ratio. RCp: respuesta completa patológica. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

#### 4.5.3. ANÁLISIS DEL VALOR PRONÓSTICO COMBINADO DE LOS LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR Y LA RATIO NEUTRÓFILO-LINFOCITO

En el análisis del valor pronóstico de los biomarcadores sTIL y RNL, ambas se exploraron como variables cuantitativas continuas, para SLE, SG y SGCM. Ni los sTIL ni la RNL mostraron valor pronóstico independiente para la SLE, SG o la SGCM (tabla 28).

Tabla 28. Análisis multivariable para supervivencia de los sTIL y la RNL (serie global)

Variables	SLE			SG			SGCM		
	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P
<b>sTIL*</b>	1,02	0,80-1,29	0,905	0,88	0,64-1,20	0,418	0,97	0,68-1,38	0,873
<b>RNL*</b>	0,66	0,37-1,19	0,166	0,82	0,38-1,76	0,608	0,94	0,41-2,20	0,894

HR: Hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza al 95%. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

De forma exploratoria, se realizó un análisis pronóstico estratificando a las pacientes en los subgrupos: sTIL altos (> mediana) y RNL baja ( $\leq$  mediana), sTIL altos (> mediana) y RNL alta (> mediana), sTIL bajos ( $\leq$  mediana) y RNL baja ( $\leq$  mediana) y, finalmente, el subgrupo de sTIL bajos ( $\leq$  mediana) y RNL alta (> mediana). Con base en la representación gráfica (figura 25), no se encontraron claras diferencias entre subgrupos, acorde al análisis multivariable que incluía ambos biomarcadores.

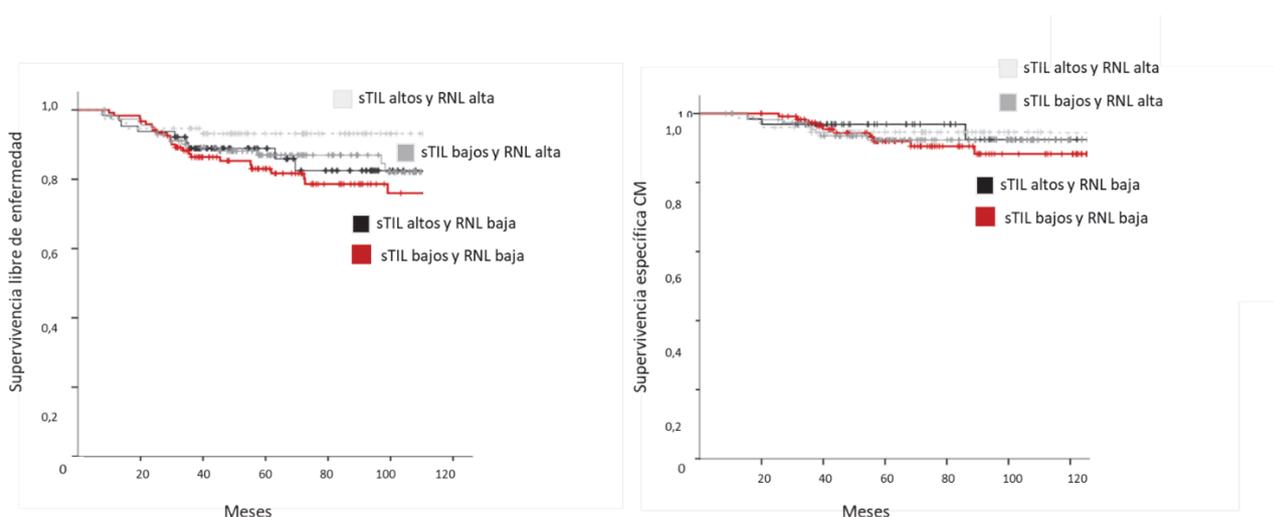


Figura 25. Curvas de Kaplan-Meier para la SLE y SGCM, estratificando a las pacientes según el análisis combinado de sTIL y RNL, con la mediana como punto de corte

En el análisis por subtipo molecular, no se encontraron diferencias pronósticas significativas para los biomarcadores sTIL y RNL (tabla 29).

Tabla 29. Análisis multivariable de los sTIL y la RNL, para la supervivencia, según subtipo

<b>RH+/HER2- (n=178)</b>									
<b>Variables</b>	<b>SLE</b>			<b>SG</b>			<b>SGCM</b>		
	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>
<b>sTIL*</b>	1,06	0,73-1,54	0,765	1,05	0,64-1,72	0,849	1,32	0,75-2,34	0,341
<b>RNL*</b>	0,65	0,30-1,39	0,265	0,98	0,37-2,64	0,972	1,04	0,36-3,03	0,939
<b>RH+/HER2+ (n=89)</b>									
<b>Variables</b>	<b>SLE</b>			<b>SG</b>			<b>SGCM</b>		
	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>
<b>sTIL*</b>	1,15	0,53-2,49	0,726	0,64	0,25-1,65	0,358	1,61	0,30-8,76	0,579
<b>RNL*</b>	2,38	0,54-10,48	0,250	2,66	0,24-29,1	0,424	2,60	0,19-36,09	0,477
<b>RH-/HER2+ (n=45)</b>									
<b>Variables</b>	<b>SLE</b>			<b>SG</b>			<b>SGCM</b>		
	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>
<b>sTIL*</b>	0,98	0,57-1,70	0,953	0,82	0,42-1,60	0,557	0,62	0,25-1,58	0,320
<b>RNL*</b>	0,49	0,11-2,09	0,332	0,40	0,07-2,44	0,320	0,98	0,07-13,8	0,986
<b>CMTN (n=64)</b>									
<b>Variables</b>	<b>SLE</b>			<b>SG</b>			<b>SGCM</b>		
	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>
<b>sTIL*</b>	0,90	0,56-1,45	0,672	0,78	0,45-1,35	0,371	0,78	0,45-1,35	0,371
<b>RNL*</b>	0,14	0,02-1,29	0,082	0,28	0,02-3,46	0,323	0,28	0,02-3,46	0,323

HR: Hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza al 95%. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

#### 4.6. OBJETIVO 4: GENERACIÓN DE UN MODELO PREDICTIVO MULTIVARIABLE DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE CON INCLUSIÓN DE BIOMARCADORES INMUNES

##### 4.6.1. GENERACIÓN Y SELECCIÓN DEL MODELO PREDICTIVO

Para la generación de modelos multivariantes predictores de respuesta, en concreto RCp, además de los sTIL y la RNL, se seleccionaron inicialmente todas las variables clínico-patológicas de relevancia identificadas en este trabajo, atendiendo a criterios clínicos y/o estadísticos ( $p < 0.20$  en el análisis univariable), así como potenciales factores de confusión (se excluyó Ki67 por su elevada correlación con el grado). Las variables incluidas fueron: edad, estatus menstrual, ECOG, subtipo molecular, grado histológico y estadio clínico al diagnóstico (cT cN).

En la cohorte global, el modelo de regresión logística multivariable que incluyó todas las variables previamente enumeradas (modelo total) se muestra en la tabla 30. En este modelo total o máximo, los sTIL, al contrario que la RNL, mostraron valor pronóstico independiente al de los parámetros clínico-patológicos.

Tabla 30. Análisis multivariable para la RCp (serie global)

Variables	RCp		
	OR	IC 95%	P
sTIL*	1,36	1,05-1,75	<b>0,020</b>
RNL*	0,74	0,32-1,73	0,487
Edad_40	0,72	0,34-1,53	0,391
Premenop.	0,83	0,46-1,52	0,551
ECOG	1,22	0,64-2,31	0,551
cT (cm)	0,84	0,74-0,97	<b>0,016</b>
cN2-3	0,53	0,30-0,96	<b>0,036</b>
RH+	0,23	0,13-0,40	<b>&lt;0,001</b>
HER2+	2,91	1,68-5,15	<b>&lt;0,001</b>
G3	2,52	1,41-4,50	<b>0,002</b>

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. Edad\_40: edad  $\leq 40$  vs  $> 40$  años. G3: grado 3. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. OR: odds ratio. Premenop: premenopáusica. RCp: respuesta completa patológica. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales \* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

Con la finalidad de seleccionar el mejor modelo predictivo a partir de todas las posibles ecuaciones derivadas del modelo total, se aplicó el comando de STATA *allsets*. Con esta herramienta, se estimaron y evaluaron un total de 1023 submodelos jerárquicos para predecir RCp.

El modelo seleccionado fue aquel que incluía variables clínicas (tamaño tumoral y afectación ganglionar al diagnóstico) y patológicas (RH, HER2 y grado 3), junto a la cuantificación de sTIL, que permaneció como variable pronóstica independiente (tabla 31).

Tabla 31. Análisis multivariable para RCp (serie global)

Variables	RCp		
	OR	IC 95%	P
<b>sTIL*</b>	1,32	1,05-1,68	<b>0,020</b>
<b>cT (cm)</b>	0,83	0,72-0,94	<b>0,005</b>
<b>cN2-3</b>	0,50	0,29-0,88	<b>0,016</b>
<b>RH+</b>	0,25	0,15-0,42	<b>&lt; 0,001</b>
<b>HER2+</b>	2,71	1,59-4,62	<b>&lt; 0,001</b>
<b>G3</b>	2,51	1,44-4,38	<b>0,001</b>

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. G3: grado 3. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. OR: odds ratio. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales. RH: receptor hormonal.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

La capacidad de discriminación del modelo seleccionado en términos de AUC y AIC se muestra en la tabla 32. Se presenta también el análisis comparativo de estos parámetros frente al modelo total, que incluye todas las variables (demográficas, clínico-patológicas, sTIL y RNL), así como frente a dos submodelos de interés basados en el modelo seleccionado: uno que añade la estimación de la RNL y otro que presenta exclusivamente las variables clínicas, eliminando los sTIL. Además del AUC y el AIC, se han estimado las razones de verosimilitud (Log-Likelihood ratio, LLR) entre los distintos modelos, y su análisis mediante el correspondiente test estadístico (LLRT). Antes de comparar los modelos entre sí, se comprobó mediante el comando *confound* que, frente al modelo total, ni en el modelo seleccionado, ni en los diferentes submodelos, los efectos de las variables sTIL y RNL diferían de manera relevante.

En comparación con el modelo total y el submodelo que incluía la RNL, el modelo seleccionado presentaba el mismo valor de AUC (AUC=0,81, IC95% 0,76-0,86), demostrando la misma capacidad de discriminación para la RCp. La estimación del AIC permite maximizar la relación entre la capacidad predictiva y la verosimilitud. El modelo seleccionado presentaba el menor valor de AIC (AIC=356,9), por lo que, en comparación con el modelo total y el submodelo que incluía la RNL, se mostró como el modelo óptimo en el proceso iterativo de estimación de parámetros con los datos de la serie, sin implicar una pérdida en la capacidad de discriminación. En el caso de la comparación con el submodelo carente de sTIL, basado exclusivamente en factores clínicos, este presentó una discreta menor capacidad predictiva que el modelo seleccionado, en base a una menor AUC y una peor bondad del ajuste. El LLRT evidenció que estas diferencias eran estadísticamente significativas ( $p=0,016$ ). Similares resultados se observaron para la comparación del submodelo clínico exclusivo con aquél que incluía también la RNL y con el modelo total, si bien en este último caso el valor  $p$  del LLRT no fue estadísticamente significativo ( $p=0,182$ ) (tabla 32).

Tabla 32. Análisis de la capacidad predictiva de los diferentes modelos para la RCp

Modelos	RCp								
	AIC	AUC	IC 95%	LLR†	P†	LLR‡	P‡	LLR†‡	P†‡
Submodelo clínico	360,8	0,80	0,75-0,85	7,57 (gl: 5)	0,182	6,30 (gl: 2)	<b>0,043</b>	5,84 (gl: 1)	<b>0,016</b>
Submodelo seleccionado	356,9	0,81	0,76-0,86	1,72 (gl: 4)	0,787	0,45 (gl:1)	0,502	REFERENCIA	n/a
Submodelo seleccionado + RNL	358,5	0,81	0,76-0,86	1,27 (gl:3)	0,735	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a
Modelo total	363,2	0,81	0,77-0,86	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

†Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del modelo total (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados (todos).

‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados.

†‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado (categoría de referencia) y el submodelo clínico anidado.

- Modelo total: sTIL\*, RNL\*, Edad\_40, Premenop, ECOG, cT (cm), cN2-3, RH+, HER2+ y G3

- Modelo seleccionado: sTIL\*, cT (cm), cN2-3, RH+, HER2+ y G3

- Modelo clínico: cT (cm), cN2-3, RH+, HER2+ y G3

AIC: Criterio de Información de Akaike. AUC: area under the curve. LLRT: likelihood-ratio test.

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. Edad\_40: edad ≤40 vs > 40 años. G3: grado 3. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. OR: odds ratio. Premenop: premenopáusica (vs postmenopáusica). RCp: respuesta completa patológica.

RH: receptor hormonal. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica

## **4.6.2. ANÁLISIS DE LA FIABILIDAD DEL MODELO**

### **4.6.2.1. VALIDACIÓN INTERNA MEDIANTE TÉCNICAS DE MUESTREO ALEATORIO**

Una vez establecido el modelo basado en sTIL, cT, cN, RH, HER2 y G3 como el óptimo para predecir RCp en la cohorte, se evaluó la fiabilidad o reproducibilidad del mismo. Al no disponer de una cohorte de validación externa, se aplicaron técnicas de validación interna, en la misma muestra de los sujetos.

En primer lugar, se realizó una validación cruzada. Los datos fueron para ello divididos al azar en 5 grupos de igual tamaño muestral. De forma repetida, cada grupo fue empleado para validar el modelo de regresión estimado a partir de los 4 grupos restantes. Este proceso fue repetido para cada uno de los 5 grupos, de los cuales se obtuvieron valores pseudo-R<sup>2</sup>, que miden capacidad predictiva del modelo y se pueden comparar con el valor pseudo-R<sup>2</sup> de la cohorte global. Los valores pseudo-R<sup>2</sup> obtenidos para los 5 grupos generados aleatoriamente oscilaron entre 0,13 y 0,31. El valor pseudo-R<sup>2</sup> medio de las estimaciones fue de 0,20, comparable al valor de la cohorte global (pseudo-R<sup>2</sup> global: 0,20).

Asimismo, se empleó un segundo procedimiento mediante remuestreo bootstrap. Para ello, a partir de la cohorte original, se generaron 1000 subgrupos distintos mediante muestro aleatorio con reposición. En cada una de ellos, se estimó el AUC, de manera que al disponer de cientos de estimaciones se pudo obtener de manera empírica un AUC promedio y un intervalo de confianza, que se pudo comparar también con el de la cohorte global. Con este método, se obtuvo un AUC medio de 0,80 (IC95% 0,76-0,85), equiparable al AUC obtenido en la cohorte original (AUC=0,81, IC95% 0,76-0,86).

### **4.6.2.2. ANÁLISIS DE SUBGRUPOS**

De manera complementaria a las técnicas de validación interna basadas en el muestro aleatorio de la cohorte global, para analizar la fiabilidad del modelo seleccionado y analizar su capacidad predictiva con mayor precisión, se realizó un análisis por subgrupos, basándose en el subtipo molecular. Con la finalidad de no comprometer la potencia estadística, la cohorte global se dividió en dos subgrupos únicamente, colapsando la variable subtipo molecular en las categorías luminal/RH+ (que incluía los

tumores RH+/HER2- y RH+/HER2+, n=267) y no luminal/RH- (que incluía los subtipos RH-/HER2+ y CMTN, n=109).

En ambos subgrupos, se analizaron todas las variables incluidas en el modelo seleccionado, salvo el subtipo molecular (criterio de estratificación). Sin embargo, tanto en el subgrupo de neoplasias luminales como en el subgrupo de no luminales se añadió la variable HER2 para controlar la heterogeneidad asociada al sistema de agrupación (en este último grupo, la positividad para HER2 se correspondería con tumores RH-/HER2+ vs. CMTN).

#### 4.6.2.2.1. Subgrupo luminal

En el subtipo luminal, el modelo de regresión logística correspondiente al modelo seleccionado se muestra en la tabla 34. Al igual que en la cohorte global, en este subgrupo, los sTIL, no así la RNL, mostraron valor pronóstico independiente al de los parámetros clínico-patológicos (tabla 33).

Tabla 33. Análisis multivariable para la RCp (subtipo luminal)

Variables	RCp		
	OR	IC 95%	P
sTIL*	1,56	1,02-2,37	<b>0,040</b>
RNL*	1,37	0,46-4,08	0,569
Edad_40	0,57	0,21-1,57	0,276
Premenop.	1,10	0,46-2,60	0,837
ECOG	2,84	1,18-6,79	<b>0,019</b>
HER2+	6,36	2,94-13,78	<b>&lt; 0,001</b>
cT (cm)	0,86	0,71-1,04	0,128
cN2-3	0,65	0,29-1,47	0,303
G3	3,14	1,41-7,00	<b>0,005</b>

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. Edad\_40: edad ≤40 vs > 40 años. G3: grado 3. IC95%: intervalo de confianza al 95%. Premenop: premenopáusica (vs postmenopáusica). RCp: respuesta completa patológica. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

Tabla 34. Análisis multivariable para la RCp (subtipo luminal)

Variables	RCp		
	OR	IC 95%	P
<b>sTIL*</b>	1,56	1,07-2,27	<b>0,022</b>
<b>HER2+</b>	5,23	2,56-10,68	<b>&lt; 0,001</b>
<b>cT (cm)</b>	0,87	0,71-1,03	0,094
<b>cN2-3</b>	0,65	0,31-1,35	0,250
<b>G3</b>	2,97	1,42-6,21	<b>0,004</b>

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. G3: grado 3. IC95%: intervalo de confianza al 95%. RCp: respuesta completa patológica. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

La capacidad de discriminación del modelo seleccionado se muestra en la tabla 35. Al igual que lo observado en el análisis de la cohorte global, para el subgrupo de tumores luminales se confirmó que éste era el modelo óptimo. En la tabla se presenta también el análisis comparativo frente al modelo total, así como frente a dos submodelos de interés basados en el modelo seleccionado: uno que añade la estimación de la RNL y otro que presenta exclusivamente las variables clínicas, eliminando los sTIL. Antes de comparar los modelos, se comprobó mediante el comando *confound* que, frente al modelo total, ni en el modelo seleccionado, ni en los diferentes submodelos, los efectos de las variables sTIL y RNL diferían de manera relevante.

En comparación con el modelo total y el submodelo que incluía la RNL, el modelo seleccionado presentaba similares AUC (AUC=0,81, IC95% 0,75-0,87), con el menor AIC (AIC=201,4). En el caso de la comparación con el submodelo carente de sTIL, basado exclusivamente en factores clínicos, este presentó también una menor capacidad predictiva que el modelo seleccionado. El LLRT evidenció que las diferencias objetivadas entre el modelo seleccionado y el modelo clínico eran estadísticamente significativas (p=0,005) (tabla 35).

Tabla 35. Análisis de la capacidad predictiva de los diferentes modelos para la RCp (subtipo luminal)

Modelos	RCp								
	AIC	AUC	IC 95%	LLR†	P†	LLR‡	P‡	LLR†‡	P†‡
<b>Submodelo clínico</b>	207,2	0,78	0,71-0,85	14,63 (gl: 5)	<b>0,012</b>	8,21 (gl: 2)	0,017	7,76 (gl: 1)	<b>0,005</b>
<b>Submodelo seleccionado</b>	201,4	0,81	0,75-0,87	6,87 (gl: 4)	0,143	0,45 (gl:1)	0,503	REFERENCIA	n/a
<b>Submodelo seleccionado + RNL</b>	203,0	0,81	0,76-0,87	6,42 (gl:3)	0,093	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a
<b>Modelo total</b>	202,5	0,83	0,78-0,89	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

†Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del modelo total (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados (todos).

‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados.

†‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado (categoría de referencia) y el submodelo clínico anidado.

- Modelo total: sTIL\*, RNL\*, Edad\_40, Premenop, ECOG, HER2+, cT (cm), cN2-3 y G3

- Modelo seleccionado: sTIL\*, HER2+, cT (cm), cN2-3 y G3

- Modelo clínico: HER2+, cT (cm), cN2-3 y G3

AIC: Criterio de Información de Akaike. AUC: area under the curve. LLRT: likelihood-ratio test.

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. Edad\_40: edad ≤40 vs > 40 años. G3: grado 3. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. Premenop: premenopáusica (vs postmenopáusica). RCp: respuesta completa patológica. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

#### 4.6.2.2.2. Subgrupo no luminal

En el subgrupo de tumores no luminales, el modelo seleccionado se muestra en la tabla 37. A diferencia de lo observado en la cohorte global y en el subgrupo luminal, ni los sTIL ni la RNL presentaron odds ratios ajustadas estadísticamente significativas para la predicción de la RCp ( $p=0,216$  y  $p=0,145$ , respectivamente). La tabla 36 muestra el análisis multivariable en el modelo total y la tabla 37 se refiere al modelo seleccionado.

La capacidad de discriminación del modelo seleccionado en el subgrupo no luminal se muestra en la tabla 38. Se presenta también el análisis comparativo frente al modelo total, así como frente a tres submodelos de interés anidados en el modelo seleccionado: dos que eliminan alternativamente los sTIL o la RNL, preservando el otro en la ecuación, y un tercero que suprime ambas variables, y que presenta exclusivamente los factores clínicos. Antes de comparar los modelos, se comprobó mediante el comando *confound* que, frente al modelo total, ni en el modelo seleccionado, ni en los diferentes submodelos, los efectos de las variables sTIL y RNL diferían de manera relevante.

En este caso, a diferencia de los análisis previos, para el subgrupo de tumores no luminales no se comprobó de forma robusta la superioridad del modelo seleccionado frente a la de otros modelos. De hecho, el modelo óptimo en este subgrupo fue el que combinaba los sTIL y la RNL junto a los parámetros clínicos. Este modelo presentaba el menor AIC (AIC=147,9), con una adecuada capacidad de discriminación en términos de AUC (AUC=0,70, IC95% 0,60-0,80), similar a la del modelo total y levemente superior a la de los distintos submodelos anidados, incluido el modelo seleccionado, pero sobre todo frente al modelo clínico exclusivo. En este último caso, el LLRT se encontraba en el límite de la significación estadística ( $p=0,071$ ) (tabla 38).

Tabla 36. Análisis multivariable para RCp (subtipo no luminal)

Variables	RCp		
	OR	IC 95%	P
sTIL*	1,25	0,88-1,77	0,216
RNL*	0,32	0,07-1,48	0,145
Edad_40	2,20	0,35-4,07	0,769
Premenop.	0,73	0,28-1,89	0,522
ECOG	0,45	0,16-1,21	0,116
cT (cm)	0,84	0,68-1,05	0,128
cN2-3	0,41	0,16-1,09	0,075
HER2+	0,94	0,35-2,50	0,901
G3	1,59	0,58-4,37	0,368

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. Edad\_40: edad ≤40 vs > 40 años. G3: grado 3. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. Premenop: premenopáusica (vs postmenopáusica). RCp: respuesta completa patológica. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

Tabla 37. Análisis multivariable para RCp (subtipo no luminal)

Variables	RCp		
	OR	IC 95%	P
sTIL*	1,27	0,93-1,73	0,139
RNL*	0,41	0,15-1,11	0,078
cT (cm)	0,85	0,69-1,03	0,103
cN2-3	0,33	0,14-0,81	<b>0,016</b>
HER2+	0,91	0,39-2,16	0,835
G3	1,50	0,61-3,68	0,380

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. G3: grado 3. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. RCp: respuesta completa patológica. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

Tabla 38. Análisis de la capacidad predictiva de los diferentes modelos para la RCp (subtipo no luminal)

Modelos	RCp										
	AIC	AUC	IC 95%	LLR†	P†	LLR‡	P‡	LLR†‡	P†‡	LLR‡‡	P‡‡
<b>Submodelo clínico</b>	149,5	0,66	0,55-0,76	7,99 (gl: 5)	0,157	5,27 (gl: 2)	0,071	3,56 (gl: 1)	0,059	1,82 (gl: 1)	0,178
<b>Submodelo seleccionado -RNL</b>	148,2	0,68	0,58-0,78	6,17 (gl: 4)	0,187	1,72 (gl: 1)	0,190	n/a	n/a	REFERENCIA	n/a
<b>Submodelo seleccionado -sTIL</b>	149,7	0,68	0,58-0,78	4,33 (gl: 4)	0,350	3,46 (gl: 1)	0,063	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a
<b>Submodelo seleccionado</b>	147,9	0,70	0,60-0,80	2,72 (gl: 3)	0,437	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<b>Modelo total</b>	151,5	0,72	0,62-0,82	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

†Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del modelo total (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados (todos).

‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados.

†‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado sin sTIL (categoría de referencia) y el submodelo clínico.

‡‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado sin RNL (categoría de referencia) y el submodelo clínico.

- Modelo total: sTIL\*, RNL\*, Edad\_40, Premeno, ECOG, HER2+, G3, cT (cm), cN2-3.

- Modelo seleccionado: sTIL\*, RNL\*, HER2+, G3, cT (cm), cN2-3.

AIC: Criterio de Información de Akaike. AUC: area under the curve. LLRT: likelihood-ratio test. cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico.

Edad\_40: edad ≤40 vs > 40 años. G3: grado 3. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. Premenop: premenopáusica (vs postmenopáusica). RCp: respuesta completa patológica. Ref: referencia. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

## **4.7. OBJETIVO 5: GENERACIÓN DE UN MODELO PRONÓSTICO MULTIVARIABLE DE CÁNCER DE MAMA TRATADO CON QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE CON INCLUSIÓN DE BIOMARCADORES INMUNES**

### **4.7.1. GENERACIÓN Y SELECCIÓN DEL MODELO PRONÓSTICO**

Para la generación de modelos multivariantes pronósticos, predictivos de eventos de supervivencia (SLE, SG y SGCM), además de los sTIL y la RNL, se seleccionaron inicialmente todas las variables clínico-patológicas de relevancia, atendiendo a criterios clínicos y/o estadísticos ( $p < 0.20$  en el análisis univariable), así como potenciales factores de confusión. Las variables incluidas fueron: edad, estatus menstrual, ECOG, RH, HER2, grado histológico, estadiaje clínico al diagnóstico (cT cN), la consecución de RCp, la invasión extracapsular y la detección de márgenes quirúrgicos positivos.

En la serie global, los modelos de regresión de Cox multivariantes para SLE, SG y SGCM se muestran en la tabla 39. Cabe mencionar que, en el modelo completo, ni los sTIL ni la RNL mostraron valor pronóstico independiente al de los parámetros clínico-patológicos.

Tabla 39. Análisis multivariable para la supervivencia

Variables	SLE			SG			SGCM		
	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P	HR	IC95%	P
<b>sTIL*</b>	1,17	0,84-1,63	0,348	0,86	0,56-1,31	0,478	1,07	0,65-1,74	0,997
<b>RNL*</b>	0,41	0,14-1,19	0,101	0,92	0,23-3,78	0,913	1,19	0,26-5,49	0,823
<b>Edad_40</b>	1,29	0,47-3,55	0,623	1,60	0,34-7,47	0,547	1,56	0,33-7,32	0,576
<b>Premeno.</b>	1,17	0,59-2,35	0,654	1,47	0,56-3,87	0,440	1,89	0,65-5,51	0,243
<b>ECOG</b>	0,75	0,37-1,52	0,424	1,27	0,54-3,00	0,589	1,13	0,40-3,21	0,819
<b>RH+</b>	0,39	0,18-0,84	<b>0,017</b>	0,41	0,15-1,16	0,093	0,39	0,13-1,21	0,102
<b>HER2+</b>	1,01	0,48-2,13	0,971	0,93	0,34-2,53	0,889	0,42	0,12-1,42	0,163
<b>G3</b>	1,10	0,57-2,15	0,774	1,72	0,67-4,42	0,261	2,40	0,83-7,00	0,108
<b>cT (cm)</b>	1,24	1,10-1,38	<b>&lt;0,001</b>	1,10	0,94-1,30	0,229	1,08	0,90-1,29	0,421
<b>cN2-3</b>	2,40	1,17-4,90	<b>0,016</b>	4,62	1,43-14,9	<b>0,011</b>	6,21	1,67-23,1	<b>0,007</b>
<b>RCp</b>	0,37	0,13-1,07	0,066	0,15	0,02-1,26	0,081	0,13	0,02-1,15	0,066
<b>Inv. Extrac.</b>	3,06	1,41-6,66	<b>0,005</b>	2,33	0,85-6,37	0,099	2,45	0,82-7,32	0,108
<b>Margen +</b>	1,87	0,42-8,40	0,416	2,43	0,48-12,3	0,285	2,68	0,47-15,4	0,271

CMTN: carcinoma de mama triple negativo. cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. Edad\_40: edad ≤40 vs > 40 años. G3: grado 3. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. HR: hazard ratio. Premenop: premenopáusica (vs postmenopáusica). RCp: respuesta completa patológica. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica

Con la finalidad de seleccionar el mejor modelo a partir de todas las posibles ecuaciones derivadas del modelo total, se aplicó el comando de STATA *allsets*. Se estimaron y evaluaron un total de 8191 submodelos jerárquicos para predecir SLE, SG y SGCM.

A diferencia de lo observado en el análisis de la RCp, para los tres eventos de supervivencia evaluados el modelo seleccionado fue aquel que incluía variables exclusivamente clínicas (tamaño tumoral y afectación ganglionar al diagnóstico) y patológicas (RH, HER2, consecución de RCp e invasión nodal extracapsular post-

tratamiento), que permanecieron como variables pronósticas independientes de forma estadísticamente significativa o en el límite de la significación (tabla 40).

Tabla 40. Modelos multivariable para la SLE, SG y SGCM.

Variables	SLE		
	HR	IC 95%	P
RCp	0,45	0,18-1,14	0,091
cT (cm)	1,20	1,08-1,33	<b>0,001</b>
cN2-3	2,19	1,19-4,05	<b>0,012</b>
RH+	0,45	0,24-0,87	<b>0,017</b>
HER2+	1,07	0,56-2,05	0,833
Inv. Extracap.	3,04	1,54-6,00	<b>0,001</b>
Variable	SG		
	HR	IC 95%	P
RCp	0,11	0,01-0,82	<b>0,032</b>
cT (cm)	1,07	0,93-1,24	0,359
cN2-3	4,30	1,66-11,12	<b>0,003</b>
RH+	0,31	0,14-0,70	<b>0,005</b>
HER2+	0,91	0,38-2,14	0,822
Inv. Extracap.	2,29	0,97-5,43	0,060
Variable	SGCM		
	HR	IC 95%	P
RCp	0,11	0,01-0,84	<b>0,033</b>
cT (cm)	1,05	0,89-1,23	0,570
cN2-3	5,00	1,79-14,0	<b>0,002</b>
RH+	0,29	0,12-0,68	<b>0,004</b>
HER2+	0,58	0,22-1,55	0,279
Inv. Extracap.	2,13	10,86-5,24	0,100

CMTN: carcinoma de mama triple negativo. cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. HR: hazard ratio. RCp: respuesta completa patológica. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica

La capacidad de discriminación del modelo seleccionado, en términos de índice C de Harrell y AIC se muestra en las tablas 41, 42 y 43. Se presenta también el análisis comparativo de estos parámetros frente al modelo total, que incluye todas las variables (demográficas, clínico-patológicas, sTIL y RNL); así como frente a los diferentes submodelos que se pueden construir entre ambos, añadiendo al modelo seleccionado los parámetros sTIL y/o RNL. Además del índice C y el AIC, se han estimado las razones de verosimilitud entre los distintos modelos y el LLRT. Antes de comparar los modelos entre sí, se comprobó mediante el comando *confound* que, frente al modelo total, ni en el modelo seleccionado, ni en los diferentes submodelos, los efectos de las variables sTIL y RNL diferían de manera relevante.

En comparación con el modelo total, los modelos seleccionados presentaban un estadístico C de Harrell igual o mínimamente inferior en los tres casos (SLE: 0,79 vs. 0,77; SG: 0,82 vs. 0,82; SGCM: 0,85 vs. 0,84), indicando una misma capacidad de discriminación a pesar de no incluir las variables inmunológicas. Al requerirse un menor número de parámetros para estimar el modelo, el AIC fue inferior (SLE: 459,4 vs. 450,0; SG: 243,3 vs. 253,8; SGCM: 198,6 vs. 206,5), de manera que el modelo seleccionado demostró una mayor bondad del ajuste. El análisis comparativo del índice C y del AIC de los submodelos intermedios, generados mediante la incorporación de sTIL y/o RNL al modelo seleccionado, ilustra el escaso valor añadido de estos parámetros para la predicción de SLE, SG y SGCM en la serie. Las comparaciones mediante LLRT no fueron estadísticamente significativas (tablas 41, 42 y 43).

Tabla 41. Análisis de la capacidad predictiva de los diferentes modelos para la SLE

Modelos	SLE										
	AIC	C-Harrell	IC 95%	LLR†	P†	LLR‡	P‡	LLR†‡	P†‡	LLR‡‡	P‡‡
Submodelo seleccionado	450,0	0,77	0,69-0,85	4,74 (gl: 7)	0,692	2,76 (gl: 2)	0,252	0,50 (gl: 1)	0,479	2,02 (gl: 1)	0,156
Submodelo seleccionado + RNL	450,2	0,78	0,70-0,85	2,72 (gl: 6)	0,843	0,74 (gl: 1)	0,389	n/a	n/a	REFERENCIA	n/a
Submodelo seleccionado + sTIL	451,7	0,78	0,71-0,85	4,25 (gl: 6)	0,643	2,27 (gl: 1)	0,132	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a
Submodelo seleccionado + RNL+ sTIL	451,4	0,79	0,72-0,86	1,98 (gl: 5)	0,851	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Modelo total	459,4	0,79	0,72-0,86	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

†Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del modelo total (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados (todos).

‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL + sTIL (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados.

†‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + sTIL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

‡‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

- Modelo total: sTIL\*, RNL\*, Edad\_40, Premeno, ECOG, RH+, HER2+, G3, cT (cm), cN2-3, RCp, Inv. Extrac., Margen +

- Modelo seleccionado: RH+, HER2+, cT (cm), cN2-3, RCp, Inv. Extrac.

AIC: Criterio de Información de Akaike. AUC: area under the curve. LLRT: likelihood-ratio test.

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. Edad\_40: edad ≤40 vs > 40 años. G3: grado 3. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. OR: odds ratio. Premenop: premenopáusica (vs postmenopáusica). RCp: respuesta completa patológica.

RH: receptor hormonal. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

Tabla 42. Análisis de la capacidad predictiva de los diferentes modelos para la SG

Modelos	SG										
	AIC	C-Harrell	IC 95%	LLR†	P†	LLR‡	P‡	LLR†‡	P†‡	LLR‡‡	P‡‡
Submodelo seleccionado	243,3	0,82	0,74-0,90	3,73 (gl: 7)	0,832	0,34 (gl: 2)	0,842	0,30 (gl: 1)	0,587	0,06 (gl: 1)	0,810
Submodelo seleccionado + RNL	245,3	0,82	0,74-0,90	3,47 (gl: 6)	0,747	0,29 (gl: 1)	0,593	n/a	n/a	REFERENCIA	n/a
Submodelo seleccionado + sTIL	245,0	0,82	0,73-0,90	3,23 (gl: 6)	0,778	0,05 (gl: 1)	0,825	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a
Submodelo seleccionado + RNL+ sTIL	247,0	0,81	0,73-0,90	3,19 (gl: 5)	0,671	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Modelo total	253,8	0,82	0,73-0,92	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

†Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del modelo total (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados (todos).

‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL + sTIL (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados.

†‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + sTIL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

‡‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

- Modelo total: sTIL\*, RNL\*, Edad\_40, Premeno, ECOG, RH+, HER2+, G3, cT (cm), cN2-3, RCp, Inv. Extrac., Margen +

- Modelo seleccionado: RH+, HER2+, cT (cm), cN2-3, RCp, Inv. Extrac.

AIC: Criterio de Información de Akaike. AUC: area under the curve. LLRT: likelihood-ratio test.

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. Edad\_40: edad ≤40 vs > 40 años. G3: grado 3. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. OR: odds ratio. Premenop: premenopáusica (vs postmenopáusica). RCp: respuesta completa patológica.

RH: receptor hormonal. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

Tabla 43. Análisis de la capacidad predictiva de los diferentes modelos para la SGCM

Modelos	SGCM										
	AIC	C-Harrell	IC 95%	LLR†	P†	LLR‡	P‡	LLR†‡	P†‡	LLR‡‡	P‡‡
Submodelo seleccionado	198,6	0,84	0,76-0,92	6,11 (gl: 7)	0,527	0,24 (gl: 2)	0,886	0,15 (gl: 1)	0,695	0,09 (gl: 1)	0,760
Submodelo seleccionado + RNL	200,5	0,84	0,77-0,92	6,02 (gl: 6)	0,421	0,15 (gl: 1)	0,699	n/a	n/a	REFERENCIA	n/a
Submodelo seleccionado + sTIL	200,5	0,85	0,78-0,92	5,96 (gl: 6)	0,427	0,09 (gl: 1)	0,764	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a
Submodelo seleccionado + RNL+ sTIL	202,4	0,85	0,78-0,92	5,87 (gl: 5)	0,319	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Modelo total	206,5	0,85	0,77-0,94	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

†Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del modelo total (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados (todos).

‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL + sTIL (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados.

†‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + sTIL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

‡‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

- Modelo total: sTIL\*, RNL\*, Edad\_40, Premeno, ECOG, RH+, HER2+, G3, cT (cm), cN2-3, RCp, Inv. Extrac., Margen +

- Modelo seleccionado: RH+, HER2+, cT (cm), cN2-3, RCp, Inv. Extrac.

AIC: Criterio de Información de Akaike. AUC: area under the curve. LLRT: likelihood-ratio test. cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico.

Edad\_40: edad ≤40 vs > 40 años. G3: grado 3. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. OR: odds ratio.

Premenop: premenopáusica (vs postmenopáusica). RCp: respuesta completa patológica. RH: receptor hormonal. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica

#### **4.7.2. ANÁLISIS DE SUBGRUPOS**

Con la finalidad de evaluar si el modelo pronóstico seleccionado se beneficiaba de la adición de los sTIL y/o la RNL en alguna subpoblación de pacientes, se realizó un análisis exploratorio por subgrupos, basado en el status del RH y HER2. Al igual que para la RCp y con la finalidad última de no comprometer la potencia estadística, la cohorte global se dividió en dos subgrupos, colapsando la variable subtipo molecular en las categorías luminal/RH+ (que incluía los tumores RH+/HER2- y RH+/HER2+, n=267) y no luminal/RH- (que incluía los subtipos RH-/HER2+ y CMTN, n=109).

En ambos subgrupos, se analizaron todas las variables incluidas en el modelo seleccionado, salvo el subtipo molecular (criterio de estratificación). Tanto en el subgrupo de neoplasias luminales como no luminales se añadió la variable HER2 para controlar la heterogeneidad asociada al sistema de agrupación (en este último grupo, la positividad para HER2 se correspondería con tumores RH-/HER2+ vs. CMTN).

##### **4.7.2.1. Subgrupo luminal**

En el subtipo luminal, el modelo de Cox correspondiente al modelo seleccionado se muestra en la tabla 44. Cabe destacar que la RCp no mostró diferencias estadísticamente significativas para la SLE, SG ni SCM, en probable relación con los escasos eventos en este subgrupo de pacientes.

Tabla 44. Modelos multivariable para la SLE, SG y SGCM (subtipo luminal)

Variables	SLE		
	HR	IC 95%	P
RCp	0,39	0,09-1,74	0,217
cT (cm)	1,14	1,01-1,29	<b>0,037</b>
cN2-3	2,41	1,15-5,07	<b>0,022</b>
HER2+	0,78	0,33-1,87	0,582
Inv. Extracap.	1,93	0,90-4,12	0,091
Variable	SG		
	HR	IC 95%	P
RCp	0,01	0,00-n/e	1,000
cT (cm)	1,05	0,87-1,25	0,564
cN2-3	7,01	1,93-25,41	<b>0,003</b>
HER2+	0,64	0,19-2,09	0,458
Inv. Extracap.	0,98	0,35-2,70	0,966
Variable	SGCM		
	HR	IC 95%	P
RCp	0,01	0,00-n/e	1,00
cT (cm)	1,04	0,87-1,24	0,688
cN2-3	6,45	1,74-23,85	<b>0,005</b>
HER2+	0,49	0,13-1,84	0,290
Inv. Extracap.	0,90	0,31-2,61	0,843

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza al 95%. Inv. Extracap: invasión extracapsular. RCp: respuesta completa patológica.

La capacidad de discriminación del modelo seleccionado se muestra en las tablas 45, 46 y 47. En las tablas se presenta también el análisis comparativo frente a otros modelos basados en el modelo seleccionado, pero que incorporan sTIL, RNL o ambos parámetros. Antes de comparar los modelos, se comprobó mediante el comando *confound* que, frente al modelo total, ni en el modelo seleccionado, ni en los diferentes submodelos, los efectos de las variables sTIL y RNL diferían de manera relevante.

Al igual que lo observado en el análisis de la cohorte global, para el subgrupo de tumores luminales se confirmó que el modelo seleccionado era el óptimo. El análisis comparativo del índice C y del AIC de los distintos modelos generados mediante la incorporación de sTIL y/o RNL ilustra el escaso valor añadido de estos parámetros para la predicción de SLE, SG y SGCM en la serie. Las comparaciones mediante LLRT no fueron significativas (tablas 45, 46 y 47).

Tabla 45. Análisis de la capacidad predictiva de los diferentes modelos para la SLE (subtipo luminal)

Modelos	SLE								
	AIC	C-Harrell	IC 95%	LLR†	P†	LLR‡	P‡	LLR†‡	P†‡
<b>Submodelo seleccionado</b>	302,0	0,75	0,66-0,84	2,03 (gl: 2)	0,362	1,75 (gl: 1)	0,186	0,11 (gl: 1)	0,739
<b>Submodelo seleccionado + RNL*</b>	305,3	0,75	0,66-0,84	1,92 (gl: 1)	0,166	n/a	n/a	REFERENCIA	n/a
<b>Submodelo seleccionado + sTIL</b>	303,7	0,76	0,68-0,85	0,28 (gl: 1)	0,595	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a
<b>Submodelo seleccionado + RNL+ sTIL</b>	305,3	0,76	0,68-0,85	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

†Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del modelo total (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados (todos).

‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL + sTIL (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados.

†‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + sTIL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

‡‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

- Modelo seleccionado: RH+, cT (cm), cN2-3, RCp, Inv. Extrac.

AIC: Criterio de Información de Akaike. AUC: area under the curve. LLRT: likelihood-ratio test.

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. Inv. Extrac: invasión extracapsular ganglionar. RCp: respuesta completa patológica.

IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. OR: odds ratio. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

Tabla 46. Análisis de la capacidad predictiva de los diferentes modelos para la SG (subtipo luminal)

Modelos	SG								
	AIC	C-Harrell	IC 95%	LLR†	P†	LLR‡	P‡	LLR†‡	P†‡
<b>Submodelo seleccionado</b>	157,7	0,80	0,71-0,89	0,80 (gl: 2)	0,669	0,08 (gl: 1)	0,774	0,78 (gl: 1)	0,376
<b>Submodelo seleccionado + RNL</b>	159,1	0,80	0,72-0,89	0,02 (gl: 1)	0,885	n/a	n/a	REFERENCIA	n/a
<b>Submodelo seleccionado + sTIL</b>	159,6	0,80	0,72-0,88	0,72 (gl: 1)	0,396	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a
<b>Submodelo seleccionado + RNL+ sTIL</b>	161,1	0,81	0,73-0,89	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

†Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del modelo total (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados (todos).

‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL + sTIL (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados.

†‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + sTIL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

‡‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

- Modelo seleccionado: RH+, cT (cm), cN2-3, RCp, Inv. Extrac.

AIC: Criterio de Información de Akaike. AUC: area under the curve. LLRT: likelihood-ratio test.

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. Inv. Extrac: invasión extracapsular ganglionar. RCp: respuesta completa patológica.

IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. OR: odds ratio. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

Tabla 47. Análisis de la capacidad predictiva de los diferentes modelos para la SGCM (subtipo luminal)

Modelos	SGCM								
	AIC	C-Harrell	IC 95%	LLR†	P†	LLR‡	P‡	LLR†‡	P†‡
Submodelo seleccionado	138,0	0,79	0,70-0,89	3,04 (gl: 2)	0,219	2,65 (gl: 1)	0,103	0,83 (gl: 1)	0,362
Submodelo seleccionado + RNL	139,7	0,81	0,72-0,90	2,21 (gl: 1)	0,137	n/a	n/a	REFERENCIA	n/a
Submodelo seleccionado + sTIL¶	138,0	0,83	0,76-0,91	0,39 (gl: 1)	0,534	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a
Submodelo seleccionado + RNL+ sTIL	139,5	0,84	0,77-0,92	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

†Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del modelo total (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados (todos).

‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL + sTIL (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados.

†‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + sTIL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

‡‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

¶ Modelo no elegible, en el que los sTIL presentan variación de la HR cruda vs ajustada con variación  $\geq$  al 10%.

- Modelo seleccionado: HER2+, cT (cm), cN2-3, RCp, Inv. Extrac.

AIC: Criterio de Información de Akaike. AUC: area under the curve. LLRT: likelihood-ratio test.

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. Inv. Extrac: invasión extracapsular ganglionar. RCp: respuesta completa patológica.

IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. OR: odds ratio. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

#### 4.7.2.2. Subgrupo no luminal

En el subtipo no luminal (que incluía los subtipos RH-/HER2+ y CMTN), el modelo de regresión logística correspondiente al modelo seleccionado se muestra en la tabla 48. La invasión extracapsular permaneció como factor pronóstico independiente para la SLE, SG y SGCM.

Tabla 48. Modelos multivariable para la SLE, SG y SGCM (subtipo no luminal)

Variables	SLE		
	HR	IC 95%	P
RCp	0,78	0,21-2,91	0,708
cT (cm)	1,54	1,20-1,97	<b>0,001</b>
cN2-3	1,64	0,47-5,71	0,438
HER2+	0,80	0,27-2,38	0,683
Inv. Extracap.	14,88	3,48-63,60	<b>&lt; 0,001</b>
Variable	SG		
	HR	IC 95%	P
RCp	0,26	0,03-2,42	0,237
cT (cm)	1,25	0,92-1,70	0,150
cN2-3	1,57	0,29-8,35	0,597
HER2+	0,91	0,24-3,43	0,895
Inv. Extracap.	18,56	3,24-106,46	<b>&lt; 0,001</b>
Variable	SGCM		
	HR	IC 95%	P
RCp	0,30	0,03-2,95	0,300
cT (cm)	1,20	0,85-1,70	0,311
cN2-3	2,73	0,44-17,07	0,282
HER2+	0,47	0,10-2,13	0,328
Inv. Extracap.	14,69	2,65-81,38	<b>0,002</b>

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza al 95%. Inv. Extracap: invasión extracapsular. RCp: respuesta completa patológica.

La capacidad de discriminación del modelo seleccionado para la SLE, SG y SGCM se muestra en las tablas 49, 50 y 51. En las tablas se presenta también el análisis comparativo frente a otros modelos basados en el modelo seleccionado, pero que incorporan sTIL, RNL o ambos parámetros. Antes de comparar los modelos, se comprobó mediante el comando *confound* que, frente al modelo total, ni en el modelo seleccionado, ni en los diferentes submodelos, los efectos de las variables sTIL y RNL diferían de manera relevante.

Al igual que lo observado en el análisis de la cohorte global, para el subgrupo de tumores no luminales se confirmó que el modelo seleccionado era el óptimo. El análisis comparativo del índice C y del AIC de los distintos modelos generados mediante la incorporación de sTIL y/o RNL ilustra el escaso valor añadido de estos parámetros para la predicción de SLE, SG y SGCM en la serie. Las comparaciones mediante LLRT no mostraron diferencias estadísticamente significativas (tablas 49, 50 y 51).

Tabla 49. Análisis de la capacidad predictiva de los diferentes modelos para la SLE (subtipo no luminal)

Modelos	SLE								
	AIC	C-Harrell	IC 95%	LLR†	P†	LLR‡	P‡	LLR†‡	P†‡
Submodelo seleccionado	100,0	0,87	0,78-0,96	2,23 (gl: 2)	0,328	0,16 (gl: 1)	0,694	2,20 (gl: 1)	0,138
Submodelo seleccionado + RNL	100,2	0,89	0,82-0,97	0,04 (gl: 1)	0,847	n/a	n/a	REFERENCIA	n/a
Submodelo seleccionado + sTIL	102,1	0,87	0,79-0,96	2,08 (gl: 1)	0,150	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a
Submodelo seleccionado + RNL+ sTIL	101,9	0,89	0,82-0,97	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

†Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del modelo total (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados (todos).

‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL + sTIL (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados.

†‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + sTIL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

‡‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

- Modelo seleccionado: HER2+, cT (cm), cN2-3, RCp, Inv. Extrac.

AIC: Criterio de Información de Akaike. AUC: area under the curve. LLRT: likelihood-ratio test.

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. Inv. Extrac: invasión extracapsular ganglionar. OR: odds ratio. RCp: respuesta completa patológica. Ref: referencia. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

Tabla 50. Análisis de la capacidad predictiva de los diferentes modelos para la SG (subtipo no luminal)

Modelos	SG								
	AIC	C-Harrell	IC 95%	LLR†	P†	LLR‡	P‡	LLR†‡	P†‡
Submodelo seleccionado	56,6	0,90	0,81-0,99	1,79 (gl: 2)	0,409	0,14 (gl: 1)	0,713	1,47 (gl: 1)	0,225
Submodelo seleccionado + RNL	57,5	0,92	0,86-0,98	0,32 (gl: 1)	0,574	n/a	n/a	REFERENCIA	n/a
Submodelo seleccionado + sTIL	58,5	0,90	0,81-0,99	1,66 (gl: 1)	0,198	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a
Submodelo seleccionado + RNL+ sTIL	59,2	0,92	0,85-0,98	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

†Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del modelo total (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados (todos).

‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL + sTIL (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados.

†‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + sTIL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

‡‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

- Modelo seleccionado: HER2+, cT (cm), cN2-3, RCp, Inv. Extrac.

AIC: Criterio de Información de Akaike. AUC: area under the curve. LLRT: likelihood-ratio test.

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. Inv. Extrac: invasión extracapsular ganglionar. OR: odds ratio. RCp: respuesta completa patológica. Ref: referencia. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

Tabla 51. Análisis de la capacidad predictiva de los diferentes modelos para la SGCM (subtipo no luminal)

Modelos	SGCM								
	AIC	C-Harrell	IC 95%	LLR†	P†	LLR‡	P‡	LLR†‡	P†‡
Submodelo seleccionado	45,9	0,94	0,88-1,00	0,81 (gl: 2)	0,667	0,06 (gl: 1)	0,807	0,62 (gl: 1)	0,432
Submodelo seleccionado + RNL¶	47,3	0,95	0,91-0,99	0,19 (gl: 1)	0,660	n/a	n/a	REFERENCIA	n/a
Submodelo seleccionado + sTIL	47,9	0,95	0,89-1,00	0,75 (gl: 1)	0,386	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a
Submodelo seleccionado + RNL+ sTIL	49,2	0,95	0,91-1,00	REFERENCIA	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

†Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del modelo total (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados (todos).

‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL + sTIL (categoría de referencia) y el resto de submodelos anidados.

†‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + sTIL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

‡‡ Prueba de razón de verosimilitud (LLRT) y valor P para la comparación del submodelo seleccionado + RNL (categoría de referencia) y el submodelo seleccionado.

¶ Modelo no elegible, en el que los sTIL presentan variación de la HR cruda vs ajustada con variación  $\geq$  al 10%.

- Modelo seleccionado: HER2+, cT (cm), cN2-3, RCp, Inv. Extrac.

AIC: Criterio de Información de Akaike. AUC: area under the curve. LLRT: likelihood-ratio test.

cN: afectación ganglionar al diagnóstico. cT: tamaño tumoral al diagnóstico. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. IC95%: intervalo de confianza al 95%. N/a: no aplicable. Inv. Extrac: invasión extracapsular ganglionar. OR: odds ratio. RCp: respuesta completa patológica. Ref: referencia. RNL: ratio neutrófilo-linfocito. sTIL: linfocitos infiltrantes de tumor estromales.

\* Esta variable se evaluó previa transformación logarítmica.

## DISCUSIÓN

---



La RCp representa el factor pronóstico más potente conocido hasta el momento, para las pacientes con CM tratadas con QTN. Actualmente, se acepta su empleo como marcador subrogado de SLE y SG, especialmente en los subtipos HER2+ y CMTN.(229) Sin embargo, algunas pacientes recaen o mueren, incluso tras alcanzar RCp, mientras que otras sin RCp presentan una evolución favorable. Además, no todas las pacientes se benefician de la QTN.(227) Por lo tanto, la RCp no parece un indicador único adecuado para pronosticar la supervivencia a largo plazo y se requieren nuevos biomarcadores que mejoren la predicción de resultados, tanto en términos de tasa de respuestas como en supervivencia. En este contexto, el mejor conocimiento de la correlación biológica de factores pronósticos relacionados con la inmunidad podría permitir la identificación de biomarcadores más complejos que ayuden a guiar el tratamiento.

Este trabajo tiene el objetivo de estudiar la correlación, implicaciones predictivas y pronósticas de los sTIL, como biomarcador inmune del microambiente tumoral, y de la RNL, como biomarcador inmune periférico, así como de su combinación, en pacientes con CM tratadas con QTN. En definitiva, se ha intentado mejorar el sistema de predicción de la RCp explorando tanto variables clínico-patológicas, como marcadores del microambiente inmune tumoral (sTIL) y periférico (RNL), con la finalidad última de generar hipótesis que puedan ser validadas en investigación básica o estudios prospectivos aleatorizados, a pesar de algunas limitaciones que se discutirán posteriormente. Además, algunos de los datos obtenidos permitirán poder continuar y generar nuevas líneas de investigación.

Para ello se han estudiado un total de 466 pacientes diagnosticadas de CM (estadios IB-IIIc) tratadas con QTN entre 2009 y 2019. Si bien nuestra serie tiene un carácter retrospectivo y unicéntrico, lo cual puede suponer una debilidad del estudio, el hecho de que las pacientes fueran seleccionadas de forma consecutiva y recibieran la mayoría tratamiento estándar secuencial con antraciclinas y taxanos, dota a la serie de homogeneidad, lo que supone una fortaleza.

El hallazgo más relevante de esta tesis ha sido la generación de un modelo predictivo con variables clínicas (tamaño tumoral y afectación ganglionar al diagnóstico) y patológicas (subtipo molecular y grado 3), junto a la cuantificación de sTIL, que se mostró como el modelo óptimo, tras analizar 1023 submodelos jerárquicos, para la

predicción de RCp, manteniéndose dicha predicción en el análisis exploratorio según el subtipo molecular.

En la discusión que sigue se abordarán los datos más relevantes, presentados en los apartados previos, iniciando por las características basales de la muestra y finalizando con el desarrollo de modelos predictivos de respuesta a QTN, así como de modelos pronósticos para SLE, SG y SGCM.

### **Características y comparabilidad de la muestra de pacientes**

Las pacientes incluidas en la cohorte presentaban características demográficas, clínicas y anatómo-patológicas comparables a las de otras series de pacientes con CM tratadas con QTN.(229) La distribución de subtipos incluyó un 73,0% de tumores con RH+ (24,7% HER2+), 10,9% RH-/HER2+ y 16,1% de CMTN. En cuanto a la estrategia terapéutica, cabe destacar que las pacientes fueron homogéneamente tratadas con esquemas basados en antraciclinas y taxanos o, cuando era pertinente, en esquemas basados en taxanos sin antraciclinas, lo cual permite, como se ha mencionado, la extracción de conclusiones más fiables. Los esquemas de quimioterapia utilizados son esquemas en vigor en la práctica clínica actual. Durante los años en los que se han tratado las pacientes incluidas en la serie, se debe tener en cuenta la modificación en la indicación de BSGC pre y post-QTN en el manejo neoadyuvante de las pacientes, así como la introducción del concepto de adyuvancia en pacientes con enfermedad residual.(57) En pacientes con CMTN, con capecitabina (6/32; 18,75%) y una paciente con CM HER2+ que fue tratada con TD-M1 en el año 2019.(243,244) En este contexto, el intervalo desde el diagnóstico oncológico hasta el inicio del tratamiento fue aceptable, con una mediana de 21 días, y de 28 días desde el fin de la QTN hasta la intervención quirúrgica. Todos estos datos soportan una cohorte de pacientes con CM, estadio localizado o localmente avanzado, que se ajusta de forma fiable a las características de las pacientes en práctica clínica habitual y que permite, por tanto, la generación de hipótesis predictivas y pronósticas.

La mediana de seguimiento se situó en 5,79 años, con una SLE a 5 años del del 88,0% y SGCM a 5 años del 93,8%. De las 65 (13,9%) pacientes que presentaron recaída, más de un 70% presentaron enfermedad a distancia, por tanto, no susceptibles de tratamiento con intención curativa. Además, casi la mitad de las mismas presentaban enfermedad

visceral, con las consiguientes implicaciones pronosticas. El porcentaje de exitus en el momento de analizar los datos fue inferior al 10%, la mayoría de ellos secundarios a progresión de la enfermedad oncológica conocida.

### **Definición de los factores clínicos y patológicos con valor predictivo y pronóstico en el contexto del cáncer de mama tratado con quimioterapia neoadyuvante**

El análisis anatomopatológico de la pieza quirúrgica tras QTN objetivó un 26,4% de RCp, un 5% superior al porcentaje evidenciado en el metaanálisis de Spring, et al.(229) En línea con la evidencia disponible, las pacientes que alcanzaron mayor tasa de RCp fueron aquellas con CM HER2+ y CMTN. En nuestra cohorte, para el subtipo RH-/HER2+, la tasa de RCp fue de 49,0%, superior al 36,4% la descrito en el metaanálisis de Spring, et al. En cambio, para el CMTN, la tasa de RCp fue inferior al descrito (32,6% vs 53,3% respectivamente). Finalmente, los tumores RH+/HER2- fueron los que presentaron menores tasa de RCp (8,4%), acorde a los datos comunicados por el grupo de Spring (9,3%).(229) Por tanto, la tasa de RCp global y por subtipos es muy similar a los datos de metaanálisis basados en ensayos clínicos de neoadyuvancia y hace nuestra serie comparable también en cuanto a la sensibilidad al tratamiento.

El análisis de las variables clínico-patológicas que se asociaban a la RCp en nuestra serie, mostró como variables predictoras significativas el subtipo molecular, el G3 y el KI67. Estos resultados son concordantes con la mayoría de estudios sobre predicción de respuesta en pacientes con CM tratadas con QTN. El subtipo molecular se identificó como el factor con mayor capacidad predictiva, siendo mayor precisamente, para los subtipos RH-/HER2+ y CMTN.(229) El grado tumoral y el KI67, relacionados a su vez con el subtipo molecular, se han propuesto también como predictores de RCp, siendo ésta proporción mayor en tumores G3 y con mayor porcentaje de KI67, al igual que en nuestra serie.(36,219) Es relevante identificar adecuadamente estas variables, ya que como se ha comentado, la RCp es el indicador con mayor capacidad pronostica en este contexto. Por tanto, los hallazgos identificados en nuestra cohorte fueron coherentes con la evidencia comunicada hasta el momento.

En nuestra serie, la RCp fue un factor pronóstico positivo para la SLE, SG y SGCM. Gran parte de la evidencia disponible identifica además esta ganancia en supervivencia, predominantemente para los subtipos HER2+ y CMTN, que alcanzan mayor tasa de RCp con la QTN.(229) En el análisis estratificado por subtipos de nuestra serie, la RCp mostró una tendencia a comportarse como variable protectora consistente en todos los subtipos moleculares, si bien, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, probablemente por el tamaño muestral de cada subgrupo. En un análisis exploratorio adicional, simplificando dichos subgrupos según status de RH y HER2, sí que se identificaron diferencias estadísticamente significativas para la SLE, en las pacientes con RH+. De forma similar a lo publicado en el estudio de Cortazar et al., estas diferencias fueron a expensas de los tumores RH+/HER2-. Similares hallazgos han sido publicados en la serie de Von G, et al. que describieron una asociación significativa entre la RCp y la SLE para los subtipos luminal B/HER2-, HER2+ y CMTN, pero no en los tumores luminales A y luminal B/HER2+.(45)

Del mismo modo, la enfermedad residual tras QTN, medida a partir del índice RCB, también se fue un factor pronóstico significativo, a pesar de que los datos disponibles eran más limitados (hasta en un 34,6% de pacientes con valores desconocidos). Globalmente, no hubo diferencias significativas entre las pacientes RCB 0 y RCB I, similar a lo comunicado en series independientes.(236) Sin embargo, el riesgo aumentó progresivamente y de forma significativa para las pacientes con RCB II y RCB III. Específicamente en las pacientes con tumores RH+, se objetivaron diferencias significativas en términos de SLE y SGCM, para las pacientes con RCB 3 vs RCB 0-I. Symmans et al. realizaron un estudio que incluía cinco cohortes e informaron que el índice RCB se asoció significativamente con el pronóstico a largo plazo en todos los subtipos moleculares.(37) Esta comprobación, acorde con nuestros datos, podría justificar su empleo en algunos subtipos de CM, en los que la evidencia sobre el pronóstico de la RCp es más limitado, como el luminal A, si bien, su capacidad para identificar con precisión a las pacientes de alto riesgo continúa siendo conflictiva.(227)

Este estudio incluyó también un análisis de las variables clínico-patológicas con potencial impacto pronóstico. Como era esperable, se encontró que las pacientes con estadio I-II presentaron un mejor pronóstico que las pacientes con estadio III. Algunas series amplias como la presentada en este trabajo, que incluyeron todos los subtipos de CM, encontraron la afectación axilar como factor pronóstico independiente para la recaída.(230–232) En una serie de pacientes con CM HER2+, tratadas con QTN y anti-HER2, el tamaño tumoral fue un significativo para la SLE.(232) Asimismo, en nuestra cohorte y, a diferencia de los resultados publicados por otros autores, las pacientes con CM HER2+ presentaron mayor SLE.(230,231) Aunque estos hallazgos podrían justificarse por el tratamiento óptimo actualizado de las pacientes con quimioterapia y anti-HER2, se debe hacer una interpretación cauta. Los resultados no se confirmaron para la SG ni SGCM, también en el contexto de un limitado número de eventos.

Tras QTN, se confirmaron el tamaño tumoral residual (ypT0 vs ypT3-4) y la afectación ganglionar (máximo para ypN3) como factores significativos en la predicción de supervivencia de las pacientes. Estos resultados confirman el valor pronóstico de la respuesta al tratamiento, tal y como se expone a lo largo de este trabajo.(229) Por último, las pacientes con invasión extracapsular presentaron peor evolución, en términos de SLE, SG y SGCM. Al igual que para la respuesta patológica axilar, se ha descrito un pobre pronóstico en base al tamaño y número de ganglios axilares afectados tras QTN.(246) Por tanto, todos estos son factores clínico-patológicos clásicos que pueden influir en el pronóstico de las pacientes, más allá de la RCp. Considerando de forma conjunta los resultados del análisis de factores pronósticos y predictivos, podemos concluir que los datos de nuestra serie, aunque condicionados todavía por un seguimiento y número de eventos limitados, son concordantes con los publicados previamente e identifican la muestra elegida como válida para realizar otro tipo de estudios traslacionales o clínicos.

## **Infiltración linfocitaria en el cáncer de mama**

En nuestra cohorte, y como ya se ha reflejado previamente, la cuantificación de sTIL se realizó por el método propuesto por Salgado, et al.(106) Este abordaje resulta fundamental, por varios aspectos, entre los que cabe destacar la reproducibilidad metodológica que permite la comparación entre series. Dado que la intención de detallar el método por el grupo de Salgado era facilitar la validación de los hallazgos predictivos y pronósticos en CM precoz, nuestro trabajo puede contribuir a tal fin, siendo el objetivo último la potencial incorporación de los sTIL como biomarcador a la práctica clínica habitual.

De los estudios que evaluaron la asociación entre la infiltración linfocitaria en las biopsias antes del tratamiento y la probabilidad de respuesta terapéutica neoadyuvante, la serie más amplia fue la comunicada por Denkert et al. que incluía 3771 pacientes.(79) Los TIL se evaluaron de acuerdo a los métodos estandarizados propuestos por el “sTIL Working Group”, pudiendo los autores sugerir hipótesis predictivas y pronósticas, que series más pequeñas confirmaron parcialmente, por ejemplo, en CMTN.(142)(143) Adicionalmente a su valor predictivo y pronóstico para la terapia estándar, los sTIL ya se están incluyendo como potencial biomarcador en algunos ensayos clínicos. En este sentido, cabe destacar el estudio GeparNuevo, en el que 174 pacientes con CMTN recibieron tratamiento con nab-paclitaxel y epirubicina/ciclofosfamida concomitante a durvalumab o placebo. Los autores informan los sTIL como un biomarcador predictivo de RCp en ambos brazos del ensayo, es decir, para la inmunoterapia combinada con quimioterapia y para la quimioterapia sola.(144) Nuevamente, para su cuantificación se empleó el método estandarizado propuesto en 2014.(106)

El CM se considera un tumor inmunológicamente “frío”, y en general, presenta una baja infiltración linfocitaria.(247) Los resultados del análisis de los sTIL en nuestra serie están, por tanto, en consonancia con lo publicado siendo la mediana global del 10%. Pese a lo referido, el análisis con perfiles de poblaciones linfocitarias o con firmas de expresión inmune muestra una importante heterogeneidad y permite identificar una proporción relevante de perfiles con activación inmune alta e intermedia.(68–70) En el mismo sentido, el CM de predominio linfocitario comprende un subgrupo minoritario de

tumores caracterizados por sTIL > 50%, con características pronósticas diferenciales. Una revisión sistemática reciente comunicó una prevalencia de CM de predominio linfocítico de aproximadamente el 10%, entre los diferentes subtipos, algo superior a la encontrada en nuestra serie (5%), lo que quizá se podría explicar por un porcentaje alto de tumores luminales.(248) Dado que el CMTN es aquel con mayor probabilidad de presentar predominio linfocitario, los estudios de caracterización se han realizado en este subtipo. Estudios de caracterización molecular recientes han identificado la pérdida frecuente del supresor tumoral PTEN y alta expresión de PD-L1 en el CMTN de predominio linfocitario, sugiriendo que la mutación de PTEN podría ser un biomarcador de respuesta a ICI.(249,250) Sin embargo, otros grupos no han encontrado mayor inestabilidad de microsatélites en las pacientes con CMTN de predominio linfocitario.(251) En cualquier caso, la caracterización biológica y molecular de este subgrupo de pacientes es heterogénea, sin resultados concluyentes, por lo que se deben realizar mayores esfuerzos en este sentido.

En cuanto a las características clínicas, en nuestra serie encontramos una relación estadísticamente significativa entre la mayor infiltración linfocitaria y la edad menor de 40 años. La relación inversamente proporcional entre los sTIL y la edad ha sido comunicada previamente para el CMTN.(252) En términos de subtipo histológico, en el carcinoma lobulillar, histología habitualmente menos explorada probablemente por su menor incidencia, se ha comunicado un perfil diferente en sTIL en las pacientes tratadas con cirugía primaria.(253) Estos resultados son similares a los encontrados en nuestra cohorte, si bien no son completamente comparables por la diferente estrategia terapéutica. El estudio de la asociación entre los sTIL y el grado de diferenciación tumoral en nuestra cohorte demostró que dicha asociación era directamente proporcional, a mayor grado histológico mayor infiltración linfocitaria y estadísticamente significativa. Resultados similares se han publicado en la literatura, para el CMTN y RH+/HER2-.(252,254)

Existen datos muy interesantes en cuanto a la relación entre la infiltración linfocitaria y el subtipo molecular. Por ejemplo, el grupo de Denkert et al., tras analizar biopsias al diagnóstico de 3771 pacientes con CM tratadas con QTN, objetivó que los tumores con mayor infiltración linfocitaria eran el CM HER2+ y CMTN.(79) En nuestra serie hallamos

resultados similares para el análisis de sTIL, siendo mayor la infiltración en el CM HER2+, aunque en comparación con el estudio referido, en el CMTN no encontramos la misma tasa de sTIL.(79) En los tumores luminales de nuestras pacientes se evidenció una proporción significativamente menor de sTIL, al igual que lo publicado en la literatura.

De forma interesante, los estudios dinámicos de seguimiento de la respuesta inmunitaria durante la QTN mostraron que durante el tratamiento, los TIL se asociaron significativamente con el estado inmunitario de las muestras previas a la QTN, con pequeñas diferencias según los subtipos.(145) La mayoría de los tumores RH+/HER2- que eran inmunológicamente fríos al inicio del tratamiento siguieron siendo fríos tras el tratamiento.(145) En este sentido, una de las limitaciones de nuestro estudio es la proporción significativamente alta de pacientes sin determinación de KI67 en la biopsia de la enfermedad residual tras completar QTN. Sin embargo, la mayoría de ellas, sí disponían de determinación de RH y HER2, por lo que, aunque se analizaron ambos sistemas de clasificación, se presentaron los datos correspondientes a la clasificación que incluía status de RH y HER2.

- **Significado predictivo de la infiltración linfocitaria**

En el estudio de la asociación entre el biomarcador sTIL y la respuesta a QTN, se encontró que los sTIL analizados como variable continua en la serie global, se asociaron significativamente a RCp. La mayoría de los estudios publicados han comunicado los resultados del valor predictivo de respuesta de los sTIL basados en puntos de corte. A pesar de esta limitación metodológica es en la predicción de respuesta a QTN, donde los sTIL han demostrado mayor valor, habiendo constatado varios estudios una correlación entre los sTIL y la RCp, en especial para el CMTN y el CM HER2+, resultados en línea con los obtenidos en nuestra serie.(79)

A pesar de que el tamaño muestral en los carcinomas de predominio linfocitario era limitado, se encontró que el valor predictivo para la RCp era significativo ( $p < 0,001$ ). En una serie independiente, en la que se analizó una cohorte de 57 pacientes con CM sTIL > 50%, todos los subtipos IHQ, se objetivó independencia de los sTIL para la predicción de RCp.(240)

Además, en el análisis estratificando por las variables determinantes para el recuento de sTIL, se encontró que en las pacientes > 40 años, los sTIL se mostraron como variable predictora de RCp, sin diferencias para las pacientes  $\leq$  40 años, dato muy interesante teniendo en cuenta que había una asociación estadísticamente significativa entre la infiltración linfocitaria y la edad menor de 40 años, no existiendo dicha asociación en mayores de 40 años. Una publicación de este mismo año, en el contexto neoadyuvante, sugiere que las pacientes de menor edad presentan mayor porcentaje de sTIL, y a su vez, mayor tasa de RCp, con implicaciones pronósticas.(255) Todo ello es similar a los hallazgos en nuestra cohorte.

El valor predictivo se mantuvo para el CM NST y para el G2-G3. Aunque la asociación con grado histológico se ha comunicado para todos los subtipos, continúa siendo el CMTN el que dispone de mayor evidencia. En el metaanálisis de Loi, et al., tras analizar una cohorte de 2148 pacientes CMTN, los sTIL fueron significativamente menores a mayor edad, al igual que en nuestra cohorte, y a menor grado histológico.(252) Asimismo, los resultados de nuestro estudio sugieren que en los estadios localmente avanzados (III), los sTIL son capaces de orientar la predicción de la RCp, lo que finalmente supondría una herramienta adicional para identificar a las pacientes de mayor riesgo, pero a su vez, con mayor probabilidad de respuesta a la QTN.

Los resultados de nuestra serie, para la cohorte global, son concordantes con la evidencia disponible, habiendo demostrado varios estudios una correlación entre los sTIL y la RCp.(79) Dado que esta asociación es mayor para CMTN y el CM HER2+, se realizó un análisis estratificado por subtipo, en el que no se encontraron diferencias significativas, en probable relación con el tamaño muestral del análisis por subgrupos. Sin embargo, sí que se comprobó una asociación significativa entre los sTIL y la RCp para el subtipo RH+/HER2- que, a su vez, era el más numeroso. La biología del infiltrado inmunológico en el CM RH+ aún no se conoce por completo, habiéndose asociado una mayor infiltración linfocitaria a mayor probabilidad de respuesta al tratamiento citostático.(79,141)

Una proporción significativa de estudios que evalúan, tanto el significado predictivo como pronóstico de los sTIL, han comunicado los datos estableciendo puntos de corte, que a priori, pueden ser ficticios, a excepción tal vez del CM de predominio linfocitario

sugerido por Salgado, et al.(106) En este sentido, el análisis de nuestro estudio presenta una fortaleza, y es que para todas las estimaciones (a excepción de las representaciones gráficas), se ha empleado la variable sTIL como cuantitativa continua. Otras series independientes han informado de una proporción significativamente mayor del CM de predominio linfocitario, en comparación con nuestra serie, para el subtipo RH+/HER2- (12,1% vs 1,6%, respectivamente).(146)

El análisis del valor predictivo de los sTIL para el RCB también merece una mención. En nuestra serie, los carcinomas con mayor recuento sTIL, presentaron más tasas de RCB 0-1, de forma significativa. Aunque se han comunicado varios estudios analizando las implicaciones pronósticas de los sTIL en RCB, tras completar QTN, la evidencia sobre su papel predictivo es más limitada.(239) El grupo de McLemore, et al. analizaron la capacidad predictiva de los sTIL, y de éstos asociados a otros parámetros inmunes (PD-L1 y CD-68), concluyendo que la combinación de biomarcadores presentaba mayor sensibilidad para la predicción de RCB.(256)

- **Significado pronóstico de la infiltración linfocitaria**

En el análisis univariable del biomarcador sTIL, como variable continua, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la serie global, en cuanto a SLE (HR=0,77; IC95% 0,57-1,05), SG ni SGCM (HR=0,74; IC95% 0,47-1,15). Para las pacientes con CMTN, los sTIL se mostraron como factor pronóstico significativo, en términos de SG y SGCM, manteniendo la tendencia para SLE. No se encontraron diferencias significativas para el resto de subtipos, si bien, la tendencia se mantenía como protectora para los tres objetivos de supervivencia, en la serie global y por subtipo IHQ.

En nuestra cohorte, al igual que en la bibliografía, merece especial mención el subtipo RH+. En primer lugar, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, la tendencia para la SLE, SG y SGCM de la cohorte RH+ (HER2- o HER2+) no fue claramente protectora, con HR que oscilaban entre 1,02 y 1,51, a diferencia del CM HER2+ y el CMTN. Este hallazgo se confirmó al analizar el status de receptores hormonales, de forma independiente al HER2. Como se ha referido en el apartado anterior, las concentraciones de sTIL se han asociado con la RCp en todos los subtipos

de CM.(79) Sin embargo, algunos estudios han comunicado diferencias pronosticas según el subtipo molecular. Paradójicamente, se ha objetivado un comportamiento opuesto entre los subtipos de CM con una asociación positiva entre los niveles crecientes de sTILs, la SLE y la SG para el CMTN y HER2+, mientras que las concentraciones bajas de sTIL se asociaron con una mayor SG en los tumores luminales.(79,141) Otras series independientes no han confirmado el significado pronóstico del sTIL basales para el subtipo RH+/HER2-.(146) Lo que es claro es que parecen existir diferencias significativas, tanto a nivel del infiltrado inmune como de su significado pronóstico, entre las pacientes con CM luminal y el resto de subtipos. Con el fin de intentar explicar este comportamiento dispar, se han propuesto varias hipótesis, como la asociación entre resistencia endocrina, mayores concentraciones de sTIL y genes relacionados con el sistema inmunológico.(79) Algunos autores han propuesto la determinación combinada de sTIL y PD-L1 para tratar de precisar mejor el pronóstico de las pacientes con CM luminal.(257)

Como ya se ha presentado previamente, la proporción de pacientes con CM de predominio linfocitario en nuestra corte fue pequeña (5,0%), lo que limita la extracción de conclusiones. Sin embargo, el significado pronóstico se mantuvo para todos los subtipos IHQ, sugiriendo la existencia de un subgrupo de pacientes con especial buen pronóstico. En una revisión sistemática, se objetivó que los CMTN, además de ser el subtipo con mayor probabilidad de presentar tumores con un infiltrado linfocítico superior al 50%, eran el que obtenía el mayor beneficio de supervivencia por cada aumento en el 10% de TIL. La mayoría de los CM HER2+ tenían un nivel de infiltrado inmunitario similar al del CMTN, pero sin demostrar el mismo beneficio en supervivencia. Los resultados fueron más controvertidos para el CM RH+, encontrando que aquellas pacientes con RH+/HER2- podían presentar peor supervivencia con cifras más elevadas de TIL.(248)

Por tanto, en el estudio de sTIL en nuestra cohorte, se han objetivado diferencias significativas en el recuento según edad, tipo histológico, G3 y subtipo molecular. Se ha confirmado su significado predictivo de RCp en la serie global y el subtipo RH+/HER2-; aunque sin diferencias significativas para el resto de subgrupos, en probable relación

con el tamaño muestral. En cuanto a su significado pronóstico, el recuento de sTIL fue un factor protector para SG y SGCM en CMTN, sin diferencias para el resto de subtipos, pero la tendencia se mantenía como protectora, excepto para el subtipo RH+.

Si bien los TIL representan el primer biomarcador pronóstico para el CMTN en fase precoz, para el resto de subtipos los datos indican que los TIL son un biomarcador dinámico y encontrar una forma pragmática de incorporar su determinación a la práctica clínica sigue siendo un reto.(258) A día de hoy el verdadero papel del microambiente inmunitario en los tumores luminales sigue bajo investigación, sin embargo, parece claro en nuestra serie que el hallazgo de niveles altos de sTIL parece constituir un factor predictivo de sensibilidad y beneficio de QTN en este subgrupo.

### **La relación neutrófilo-linfocito en el cáncer de mama tratado con quimioterapia neoadyuvante y su significado predictivo y pronóstico**

En el análisis descriptivo del biomarcador RNL, algunas series como la publicada por Dan, et al., que incluyó 242 pacientes con diferentes subtipos de CM tratadas con QTN, han comunicado medianas de RNL (3,1) superiores a la de nuestra muestra (1,9).(259) Este aspecto es especialmente relevante, ya que, los autores basaron sus resultados para el análisis del valor predictivo en dicha mediana, lo cual resalta la marcada heterogeneidad derivada de emplear puntos de corte. Como aspecto diferencial respecto a nuestra serie, cabe mencionar un mayor porcentaje de CMTN (24,8% vs 16,1%) y HER2+ (16,9% vs 10,9%), no realizando los autores un análisis por subgrupos dada la limitación de tamaño muestral.(259)

En el estudio de la asociación entre la RNL y factores clínico-patológicos, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos, incluyendo: edad, status menstrual, obesidad, subtipo histológico, grado de diferenciación, estadio clínico, invasión vascular, así como, clasificación IHQ. En el estudio de Graziano, et al. no se encontraron diferencias para la RNL (punto de corte: 2,42, basado en curvas ROC), según grado de diferenciación histológico, estadio al diagnóstico ni clasificación IHQ.(191) Curiosamente, los autores informaron de diferencias significativas para la RNL, según edad menor o mayor de 50 años, con una ratio inferior para las pacientes de mayor

edad.(191) El grupo no propuso ninguna hipótesis que justificara tales resultados, que no se validaron en nuestra cohorte. Específicamente para el CM luminal, el grupo de Grassadonia, et al. tampoco encontró diferencias para los subgrupos RNL alta/baja (punto de corte: 2,12, basado en curvas ROC), según edad ( $\leq$  ó  $>$  50 años), subtipo histológico, grado de diferenciación, tamaño tumoral ni subtipo (luminal A, luminal B y luminal B/HER2-).(260) Aunque la evidencia es muy limitada, algunos estudios han evaluado la potencial asociación entre RNL, obesidad y el desarrollo de CM, con resultados interesantes aunque pendientes de validar, en contraste con nuestra serie en la que no encontramos diferencias significativas según el IMC.(261)

En nuestra cohorte, los resultados objetivados sugieren que no existe una clara asociación entre la RNL, medida como variable continua, y la RCp. Estos datos son consistentes con los reportados en series independientes, que incluían todos los subtipos IHQ de CM.(159,162,180) En estos estudios, los puntos de corte oscilaron entre 2,15-3,33, superiores a la mediana de nuestra muestra (1,92). El grupo de Suppan et al., que analizó pacientes tratados con antraciclinas y taxanos, no encontró ninguna correlación entre la RNL y la RCp.(180)

Curiosamente, tras realizar un análisis exploratorio con la RNL como variable dicotómica en nuestra serie, encontramos que las pacientes con RCp axilar presentaron una mediana de RNL basal mayor que aquellas que no consiguieron RCp (mediana RNL 2,06 vs 1,89), rozando la significación estadística ( $p=0,053$ ). Un metaanálisis reciente ha sugerido asociación entre una RNL alta y la ausencia de RCp. Esta comunicación identificó, a su vez, múltiples limitaciones, como las diferencias de resultados según el año de publicación de los estudios, la población asiática vs no, el tamaño muestral y los diferentes puntos de corte establecidos en cada estudio.(262)

En la evaluación del valor predictivo para la RCp de la RNL, estratificando por distintas variables, no se encontraron diferencias significativas. En cuanto a la estratificación por subtipo IHQ, en nuestra muestra tampoco se encontraron diferencias significativas. Aunque la RNL rozaba la significación estadística en su análisis predictivo de RCp para el subtipo RH+/HER2- (OR=1,34; IC95% 1,00-1,78,  $p=0,050$ ), el sentido era inverso a la mayoría de los datos comunicados hasta el momento. Es el subtipo CMTN, donde más se ha estudiado tal asociación, habiendo comunicado algunos autores una asociación

positiva entre RNL y RCp.(178,179,184,262) Cabe mencionar que la mayoría de estudios, propusieron puntos de corte, basados en la mediana o curvas ROC, para su estimación pronóstica.(178,179) En el estudio de Ocaña A, et al. en el que se analizaron datos de 308 pacientes con CMTN, procedentes de los ensayos clínicos ETNA y GEICAM/2006-03, los valores altos de RNL derivada, al final del tratamiento, como variable continua o utilizando cuartiles se asociaron a una menor tasa de RCp en el análisis multivariable.(184) Sin embargo, la mayoría de estudios no han encontrado asociación significativa para otros subtipos moleculares, incluyendo en CM RH+/HER2-.(180,262)

En cuanto al significado pronóstico de la RNL, en nuestra cohorte, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la serie global, en términos de SLE, SG ni SGCM. En el análisis por subtipo IHQ, tampoco se objetivaron diferencias significativas. En un análisis exploratorio empleando la mediana como punto de corte, la RNL baja se mostró como factor pronóstico asociado a una peor SLE, sin diferencias significativas para la SGCM. Al igual que los resultados presentados, la evidencia disponible hasta el momento, aunque es muy limitada, no sustenta una clara correlación entre RNL y supervivencia en el entorno del CM tratado con QTN. Algunos resultados positivos fueron los comunicados por Chen et al., que encontraron asociación entre la RNL elevada ( $RNL \geq 2.1$ ) y la SLE, permaneciendo como variable independiente en un análisis multivariable.(178) Marín et al. describieron una asociación significativa de la RNL para la SG, pero ésta no permaneció como factor pronóstico independiente.(162) El metaanálisis por Chou, et al., de nuevo, identificó las limitaciones referentes al año de publicación, la población asiática vs no, el tamaño muestral y los diferentes puntos de corte establecidos en cada estudio.(262) Cabe destacar que, para la SLE, las diferencias no fueron significativas en población no asiática, al contrario que en población asiática, donde los niveles elevados de RNL se asociaron a menor SLE. Los autores sugirieron la RNL como un factor pronóstico para SG, tras ajustar por un modelo de efectos fijos e incluir un análisis de subgrupos.(262) Estos datos no se han comprobado en otros metaanálisis.(263)

Teniendo en cuenta el subtipo molecular, los resultados continúan siendo poco informativos en el entorno neoadyuvante. Asano et al. mostraron que en el subgrupo de pacientes con CMTN, la RNL estaba correlacionada con la SLE en el análisis

univariable, pero no se confirmó como factor pronóstico independiente.(183) Para el CM RH+/HER2-, se ha informado la RNL como factor pronóstico independiente para la SLE y SG, lo que no se ha confirmado en estudios más amplios.(182,263)

Por tanto, en el estudio de la RNL en nuestra cohorte, no se encontraron diferencias significativas en su recuento, según las principales características clínico-patológicas, incluyendo el subtipo IHQ. No se ha confirmado el valor predictivo de la RNL para la RCp. Aunque las pacientes con CM RH+/HER2- presentaron una asociación significativa con la RCp, de sentido inverso, estos resultados se deben interpretar con cautela, dado el carácter univariable del análisis. En el estudio del significado pronóstico de la RNL, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la serie global, para la SLE, SG ni SGCM, incluyendo el análisis estratificado por subtipo. Por tanto, nuestros datos no apoyan el uso predictivo o pronóstico de la RNL en el contexto del CM localmente avanzado tratado con QT neoadyuvante.

En el entorno neoadyuvante del CM, los resultados sobre el significado predictivo y pronóstico de la RNL, continúan siendo contradictorios. Aunque algunos estudios han comunicado resultados positivos, la marcada heterogeneidad de estos, dificulta la extracción de conclusiones firmes y, por tanto, su aplicabilidad clínica. Puesto que es un biomarcador de especial interés clínico debido a su accesibilidad y facilidad de cálculo, estaría justificada la realización de estudios más homogéneos que ayuden a entender su base biológica y potencial asociación con factores clínico-patológicos y del sistema inmune tumoral.

### **Correlación y valoración combinada de la infiltración linfocitaria y la RNL en el cáncer de mama**

El subgrupo estudiado para la correlación entre los sTIL y la RNL (un 80,9% de las pacientes) era representativo de la muestra total con características clínicas y patológicas prácticamente superponibles. De forma muy clara, y este resultado es relevante para la interpretación general de nuestros resultados, el análisis de correlación no evidenció asociación entre la RNL basal y los sTIL de la biopsia

pretratamiento ni en la serie global ni en el análisis por subtipo molecular. Los hallazgos descritos en nuestra cohorte están en línea con la limitada evidencia publicada hasta ahora, no habiéndose descrito ningún estudio con correlación entre ambos biomarcadores.(190,212–215) Sin embargo, hasta el momento, no había datos más allá del CMTN, que establecieran una relación entre la infiltración linfocitaria y la RNL, en el contexto neoadyuvante, para el CM localmente avanzado de cualquier subtipo. Algunos aspectos diferenciales de nuestra serie son el hecho de incluir todos los subtipos IHQ de CM, evaluados de forma global y estratificada, la inclusión de pacientes con CM enfermedad localizada o localmente avanzada, tratadas homogéneamente con QTN basada en antraciclinas y taxanos, y habiéndose realizado la cuantificación de sTIL mediante el método estandarizado. Además, la ausencia de correlación evidenciada es un aspecto clave para su posible integración en sistemas predictivos o pronósticos de uso clínico.

La ausencia de correlación entre ambas variables justificó su análisis combinado. Desde el punto de vista predictivo de la RCp, los sTIL permanecieron como factor predictivo independiente, sin diferencias significativas para la RNL. En el análisis por subtipo molecular, a excepción de las pacientes con CM RH+/HER2-, en el que los sTIL permanecieron como variable independiente para la predicción de la RCp, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos.

Aunque varios estudios han explorado la combinación de biomarcadores inmunes locales asociados a factores clínicos clásicos, el significado predictivo y pronóstico de la combinación de biomarcadores inmunitarios del TME y circulantes, más concretamente la combinación de TIL y RNL, permanece poco explorada.(238) El significado predictivo de la combinación sTIL y RNL, se ha comunicado en un único estudio por Lusho, et al. Los autores analizaron retrospectivamente 120 pacientes con CMTN tratadas con QTN basada en FEC/taxano. Para el análisis de la capacidad predictiva, emplearon la RCp asociada a enfermedad residual de pequeño tamaño (ypT0/Tis/T1ab, ypN0), no objetivando superioridad de la RNL respecto a los sTIL, de forma similar a lo encontrado en nuestra serie.(190)

En cuanto al análisis del significado pronóstico conjunto de ambos biomarcadores, ni los sTIL ni la RNL mostraron valor pronóstico independiente para la SLE, SG o la SGCM, de

nuevo sin diferencias por el subtipo molecular. Al igual que para su valor predictivo, el significado pronóstico de la combinación de TIL y RNL, permanece poco explorada. En series que incluyeron todos los subtipos IHQ de CM, el grupo de Lee et al., en el que se analizaron una minoría de pacientes con CM tratadas con QTN (44/145; 30,34%), ni los TIL-CD8+ ni la RNL mostraron valor pronóstico en el análisis univariable ni multivariable para SLE y SG.(214) Estos resultados son difícilmente comparables con los de nuestra serie, dada la heterogeneidad terapéutica, la metodología para la cuantificación de TIL y la ausencia de un análisis por subtipos.

Específicamente para el CMTN, Dong et al., realizaron un análisis con pacientes tratadas con QTN, encontrando que una RNL elevada y bajos sTIL, junto con la afectación ganglionar ( $\geq 10$ ), el mayor grado histológico y la no RCp se mostraron como indicadores pronósticos independientes de mal pronóstico para SLE.(215) En una cohorte posterior por Pang et al., se comunicó la independencia de la RNL (alta vs baja) y la cifra de sTIL (alta vs baja) en un análisis multivariable para la SLE, incluyendo afectación ganglionar (pN0 vs pN2-3) y el G3 (vs G1-2).(213) Es importante resaltar que el estudio incluía pacientes tratadas en neoadyuvancia y adyuvancia. Aunque en las pacientes con CMTN incluidas en esta cohorte, no se validaron estos resultados, el establecimiento puntos de corte (TIL: 0-10%; 11-20%; >20% y RNL: 1,928) dificulta la reproducibilidad de los datos. De forma interesante, la mediana de RNL comunicada por el grupo coincidió con la de nuestra serie. Finalmente, la serie anteriormente citada de Lusho, que también evaluaba pacientes con CMTN e incluía la RCp como principal objetivo, no demostró superioridad de la RNL respecto a los TIL para la predicción de la recaída a distancia.(190)

### **Modelos predictivos con incorporación de variables inmunes**

Todo el análisis anterior se dirigía a la generación de nuevos modelos predictivos y pronósticos que, integrando variables de inmunidad tumoral y periférica, pudieran mejorar los modelos basados únicamente en variables clínico-patológicas clásicas. La generación de un modelo predictivo de RCp se completó tras estimar y evaluar un total de 511 submodelos para predecir RCp, de los cuales el modelo óptimo fue aquel que incluía variables clínicas (cT y cN) y patológicas (RH, HER2 y G3), junto a la cuantificación de sTIL, que permaneció como variable pronóstica independiente. La RNL no contribuyó

a la predicción del modelo global. En el análisis del subtipo luminal, el modelo óptimo fue el mismo que para la cohorte global: los sTIL, no así la RNL, mostraron valor pronóstico independiente al de los parámetros clínico-patológicos. Frente al modelo basado exclusivamente en variables clínicas, el modelo seleccionado presentaba similar AUC, con el menor AIC y diferencias estadísticamente significativas para el LLRT ( $p < 0,001$ ).

De forma interesante, en el subgrupo de tumores no luminales, y a diferencia de lo observado en la cohorte global y en el subgrupo luminal, el modelo óptimo fue el que combinaba los sTIL y la RNL junto a los parámetros clínicos. Este modelo presentaba el menor AIC, con una adecuada capacidad de discriminación en términos de AUC, superior frente al modelo clínico exclusivo, encontrándose el LLRT en el límite de la significación estadística ( $p = 0,062$ ). Por tanto, los datos de nuestra cohorte apoyan la integración de parámetros del sistema inmune local y periférico como forma de mejorar la capacidad predictiva frente al empleo de variables clínico-patológicas de forma aislada, que es la práctica habitual. Si bien varios estudios han demostrado una correlación entre los sTIL y la RCp, muy pocos evalúan el beneficio de su combinación con otras variables clínico-patológicas en términos de capacidad predictiva.(79,240)

Es en el CMTN, donde el significado predictivo y pronóstico de los sTIL más se ha evaluado. La principal razón es que el CMTN, junto al subtipo RH-/HER2+, se caracteriza por un mayor y más activo infiltrado inmunitario, en comparación con otros subtipos de CM.(66,79) En nuestro análisis, precisamente para el subgrupo de CM no luminal, y a diferencia de lo observado en la cohorte global y en el subgrupo luminal, el modelo óptimo fue el que combinaba los sTIL y la RNL junto a los parámetros clínicos. Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, un hecho posiblemente derivado de las limitaciones de tamaño muestral, la valoración combinada de sTIL y RNL, es decir, de los compartimentos tumoral y periférico de la respuesta inmune, en los subtipos de CM con activación inmune más importante, podría tener implicaciones clínicas que sería interesante seguir explorando. En el único estudio publicado hasta la fecha, que explora el significado predictivo de la combinación sTIL y RNL para la RCp, los autores no encontraron superioridad de la RNL respecto a los sTIL en un grupo de pacientes con CMTN.(190)

### **Incorporación de variables inmunes a modelos pronósticos**

En este apartado, se generó un modelo pronóstico para SLE, SG y SGCM que complementara las variables clínico-patológicas clásicas. Tras estimar y evaluar un total de 4095 submodelos, el modelo óptimo fue aquel que incluía variables exclusivamente clínicas (cT y cN) y patológicas (RH, HER2, consecución de RCp e invasión nodal extracapsular post-tratamiento), que permanecieron como variables pronosticas independientes. La adición de las variables inmunológicas no mejoró significativamente la capacidad de discriminación del modelo. En el análisis por subgrupos, para el subtipo luminal, al igual que en la cohorte global, el modelo seleccionado era el óptimo, con escaso valor añadido de los parámetros inmunológicos. En este subgrupo, la RCp no alcanzó significación estadística, en probable relación al escaso número de eventos. Lo mismo ocurrió con el subtipo no luminal, sin valor añadido de los sTIL y la RNL para la predicción de SLE, SG y SGCM. La invasión extracapsular permaneció como variable independiente en un análisis multivariable.

Por tanto, en nuestra cohorte, la integración de parámetros del sistema inmune local y periférico no mejoraron la capacidad pronostica para SLE, SG y SGCM frente al empleo de variables clínico-patológicas de forma aislada. Los factores clínico-patológicos identificadas coinciden con los descritos previamente como pronosticas para las pacientes con CM tratadas con QTN, incluyendo el estadio clínico localmente avanzado, la positividad de HER2, la consecución de RCp y la afectación ganglionar.(230–232) El limitado número de eventos y la mediana de seguimiento de la muestra han podido influir en los resultados objetivados. En nuestro conocimiento, no existe ningún estudio hasta el momento, que explore el valor pronóstico de la combinación sTIL y RNL en el contexto neoadyuvante del CM. Aunque no se ha encontrado un claro beneficio de incluir ambos biomarcadores inmunes en el modelo tradicional basado en factores clínico-patológicos, un mayor seguimiento o la ampliación del tamaño muestral podría acabar de confirmar estos resultados.

## **Limitaciones y fortalezas del estudio**

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones. En primer lugar, se trata de una cohorte unicéntrica y retrospectiva con moderado tamaño muestral y cierta limitación a la hora de plantear un análisis por subgrupos, en base al subtipo tumoral, con suficiente poder estadístico. En este contexto, algunas pacientes carecen de datos relevantes, como pueden ser la determinación del grado tumoral y el KI67, por ejemplo, en el subtipo luminal. Algunas aproximaciones que podrían mejorar la extracción de conclusiones serían precisamente, el diseño prospectivo y mayor tamaño muestral. Otro hecho importante se refiere al tiempo de seguimiento. Dado que se trata de una cohorte de pacientes con CM tratadas con intención radical, el número de eventos de recaída y muerte es escaso. En cualquier caso, se trata de una serie reflejo de la práctica habitual y está prevista la actualización del estudio con mayor tiempo de seguimiento. En tercer lugar, la RNL es un marcador accesible y sencillo, pero probablemente limitado en cuanto a su significado biológico, por lo que no es suficiente para descartar totalmente la contribución del compartimento de células inmunes periféricas a la respuesta o la evolución de la neoplasia. Por ello, un aspecto interesante sería la posibilidad de cuantificar subpoblaciones celulares inmunes tanto en tejido como en sangre periférica, más allá de los sTIL y RNL, lo que probablemente permitirían una aproximación inmunológicamente más precisa y una mejor comprensión de la interrelación entre el sistema inmune del TME y periférico.

No obstante, nuestra serie también tiene una serie de fortalezas que la hacen muy interesante. Iniciando por la selección consecutiva de pacientes, es una serie muy homogénea en cuanto al manejo clínico, incluyendo el diagnóstico, el tratamiento de QTN y la determinación de la respuesta, hechos de vital importancia para la obtención e interpretación de datos en el contexto del CM precoz. La determinación de sTIL se realizó por un patólogo especializado, mediante un método estandarizado. Además, para el análisis de resultados, se ha empleado una metodología estadística robusta, que ha permitido la validación interna de los hallazgos. En este sentido, una fortaleza de nuestro estudio es el análisis cuantitativo de los biomarcadores inmunes, sTIL y RNL, sin establecer puntos de corte ad hoc, que aumentan la tendencia a obtener resultados positivos y limitan la interpretación y reproducibilidad de resultados.

Asimismo, la selección del mejor modelo predictivo y pronóstico a partir de variables clínico-patológicas relevantes, biomarcadores inmunes y teniendo en cuenta potenciales factores de confusión, se realizó mediante dos comandos de análisis sistemático de STATA: *allsets* y *confound*. La utilización de ambos comandos, basados en el análisis masivo y automatizado de modelos de regresión, permitió la estimación y evaluación de un total de 511 submodelos para predecir RCp y 4095 submodelos para predecir SLE, SG y SGCM. La selección del modelo óptimo se realizó de forma objetiva, empleando los principales índices de discriminación y bondad del ajuste, tales como el área bajo la curva ROC, el índice C de Harrell o AIC.

El aspecto clave que confirmó la consistencia de los resultados en nuestra serie (global y por subtipos), fue el análisis de la fiabilidad o reproducibilidad del mismo, mediante una validación interna cruzada y remuestreo Bootstrap. Dicha metodología permitió la comparación de pseudo-R<sup>2</sup> y AUC, generados de forma aleatoria, con el obtenido para la cohorte global, confirmando su fiabilidad.

De manera complementaria a las técnicas de validación interna basadas en el muestro aleatorio de la cohorte global, para analizar la fiabilidad del modelo seleccionado y su capacidad predictiva con mayor precisión, se realizó un análisis por subgrupos, basado en el subtipo molecular. Cabe mencionar que, con la finalidad de no comprometer la potencia estadística, la cohorte global se dividió en las categorías luminal (que incluía los tumores RH+/HER2- y RH+/HER2+) y no luminal (que incluía los subtipos RH-/HER2+ y CMTN). Sin embargo, para controlar la heterogeneidad asociada al sistema de agrupación, en el subgrupo de tumores luminales se añadió la variable G3 (que haría referencia a los subtipos luminal B y que, a su vez, presentaba interacción con la variable KI67) y en el subgrupo de neoplasias no luminales, se añadió la variable HER2 (en este grupo, la positividad para HER2 se correspondería con tumores RH-/HER2+ vs. CMTN).

## **Perspectivas de futuro**

El hallazgo más relevante de esta tesis doctoral ha sido la generación de un modelo predictivo con variables clínicas y patológicas, junto a la cuantificación de sTIL, que se mostró como el modelo óptimo para la predicción de RCp, por encima de los modelos que no incorporan biomarcadores inmunes, manteniéndose dicha predicción en el análisis exploratorio según subtipo molecular. Aunque este hallazgo no se ha confirmado para el análisis de la supervivencia, limitado por el bajo número de eventos, la predicción de la RCp podría acabar finalmente teniendo impacto en objetivos más tardíos, como la recaída, una posibilidad que solo un seguimiento más prolongado podrá establecer.

En este estudio, se ha puesto de manifiesto que la infiltración linfocitaria pre-QTN tiene un valor predictivo independiente de forma global y en el análisis por subtipos. En el contexto neoadyuvante, el hallazgo de un biomarcador de respuesta sencillo, como es la determinación de sTIL en muestras de hematoxilina y eosina, podría permitir considerar la posibilidad de plantear estrategias de escalada/desescalada terapéutica, si bien, estos hallazgos deben ser confirmados previamente en series más amplias de carácter prospectivo. Además, este biomarcador podría ayudar a identificar a las pacientes con mayor probabilidad de respuesta a nuevas estrategias terapéuticas, como la inmunoterapia. La identificación en los tumores más inmunológicos, como son el CMTN y el CM HER2+, de un modelo predictivo de RCp que incluye la RNL, como el óptimo, abre la posibilidad de mayores esfuerzos de investigación en este sentido, de nuevo previa comprobación en estudios prospectivos.

En resumen, la neoadyuvancia es el contexto ideal para la exploración de nuevos factores predictivos de respuesta y pronósticos en pacientes con CM. Dado que la RCp resulta un marcador insuficiente, la identificación y caracterización de nuevos biomarcadores puede facilitar la selección de las pacientes candidatas tanto a estrategias de intensificación, como de desescalada terapéutica. Dada la evidente importancia del sistema inmune en CM, y de la necesidad de su integridad periférica para asegurar una respuesta antitumoral eficaz, un mayor conocimiento sobre la conexión TME-ambiente inmune circulante resulta obligatoria. Nuestros resultados apoyan la posible contribución de ambos compartimentos a la predicción de la

respuesta, especialmente en los subtipos no luminales, y a la vez amplían la visión del cáncer de mama luminal, mostrando que la integración de la infiltración linfocitaria con las variables clínico-patológicas podría ser una estrategia válida para predecir la respuesta y seleccionar a las pacientes para tratamiento neoadyuvante basado en quimioterapia.



## CONCLUSIONES

---



1. En la evaluación basal de los linfocitos infiltrantes de tumor estromales (sTIL) en una cohorte de pacientes con cáncer de mama precoz y localmente avanzado tratadas con quimioterapia neoadyuvante se encontró mayor infiltración linfocitaria para el cáncer de mama HER2+ y triple negativo. También se observó mayor porcentaje de sTIL en las pacientes pre- y perimenopáusicas, en el cáncer de mama sin tipo especial y en los tumores con grado 3.
2. Los sTIL, como variable continua, se asociaron significativamente con la respuesta completa patológica. Esta asociación fue consistente en el subgrupo de pacientes con cáncer de mama receptor hormonal positivo/HER2 negativo. Se comprobó, a su vez, en las pacientes mayores de 40 años, en el cáncer de mama sin tipo especial, con grado 3 y para aquellas con estadio clínico III. En la serie global, la asociación de los sTIL con el índice de carga tumoral residual también fue significativa.
3. El biomarcador sTIL, como variable continua, no se comportó como un factor pronóstico significativo para la supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global ni supervivencia global específica de cáncer de mama en la serie global. Para las pacientes con cáncer de mama triple negativo, los sTIL se comportaron como un factor protector de supervivencia global, de forma significativa.
4. En la misma serie de cáncer de mama precoz tratada con quimioterapia neoadyuvante, la ratio neutrófilo-linfocito (RNL) al diagnóstico, no mostró diferencias significativas, según el subtipo molecular ni otras características clínicas o patológicas.
5. La RNL, como variable continua, no se asoció de forma significativa con la respuesta completa patológica o la carga tumoral residual ni de forma global ni cuando se realizó un análisis diferencial de acuerdo al subtipo molecular, estadio u otras características clínicas y patológicas. El biomarcador RNL, como variable continua, tampoco fue un factor pronóstico significativo para la supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global ni supervivencia global específica de cáncer de mama en la serie global ni en el análisis según subtipo molecular.
6. En esta cohorte de pacientes con cáncer de mama precoz tratadas con quimioterapia neoadyuvante, no se encontró correlación entre la cantidad de sTIL y la RNL al diagnóstico.

7. En el análisis de la capacidad predictiva de respuesta completa patológica de los biomarcadores sTIL y RNL, de forma conjunta, los sTIL permanecieron como factor predictivo independiente, sin diferencias para la RNL. Estos resultados se reprodujeron en la serie global y para el CM con receptor hormonal positivo, sin diferencias en el resto de subtipos.
8. En el análisis de la capacidad pronóstica de los biomarcadores sTIL y RNL, de forma conjunta, ni los sTIL ni la RNL mostraron valor pronóstico independiente para la supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global y supervivencia global específica de cáncer de mama. Estos resultados no mostraron cambios en el análisis por subtipo molecular.
9. Un modelo predictivo que incluía variables clínicas (tamaño tumoral y afectación ganglionar al diagnóstico) y patológicas (subtipo molecular y grado 3), junto a la cuantificación de sTIL, se mostró como el modelo óptimo para la predicción de respuesta completa patológica a la quimioterapia neoadyuvante, sin pérdida en la capacidad de discriminación. La validación interna del modelo mediante técnicas de muestreo aleatorio y *bootstrapping* mostró la robustez del modelo conjunto.
10. El análisis por subgrupos del modelo predictivo seleccionado, basado en variables clínico-patológicas y de la respuesta inmune tumoral (sTIL), mostró su validez en el cáncer de mama luminal. En el cáncer de mama no luminal, el modelo predictivo óptimo incluyó, además de la amplificación de HER2, la combinación de las dos variables inmunes relacionadas con la respuesta inmune tumoral y sistémica (sTIL y RNL), si bien la diferencia con el modelo de referencia no alcanzó la significación estadística.
11. Para los tres eventos de supervivencia, el modelo óptimo para la predicción pronóstica fue aquel que incluía variables exclusivamente clínicas (tamaño tumoral y afectación ganglionar al diagnóstico) y patológicas (subtipo molecular, consecución de RCp e invasión nodal extracapsular post-tratamiento). La inclusión de biomarcadores inmunes (sTIL y RNL) no demostró mejorar la capacidad de discriminación del modelo clínico-patológico.

## **ANEXO - PUBLICACIONES**

---



**CEIC Hospital General Universitario José María Morales Meseguer**

Dr.ª María Dolores Nájera Pérez  
Presidenta del CEIC Hospital General Universitario José María Morales Meseguer

**CERTIFICA**

1º. Que el CEIC Hospital General Universitario José María Morales Meseguer en su reunión del día 28/01/2015, acta ORDINARIA ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

**Título:** "EVALUACIÓN DE FACTORES CLÍNICOS Y BIOLÓGICOS PREDICTIVOS DEL BALANCE ENTRE RESPUESTA Y TOXICIDAD DEL TRATAMIENTO ANTINEOPLÁSICO". Proyecto de Investigación.

**Código Promotor:** **Código Interno:** EST: 07/15

**Promotor:** Otros (académico)

**Monitor/CRD:** Otros (académico)

**Versión Protocolo Evaluada:** Diciembre 2014

**Versión Hoja Información al Paciente Evaluada:** GENERAL / Diciembre 2014

**Fecha Entrada:** 19/12/2014

**Investigador Principal:** Dr. Francisco Ayala de la Peña, Oncología, H.G.U. "Morales Meseguer".

1º. Considera que:

- El ensayo se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica. Se cumplen los requisitos necesarios para la gestión de muestras.

2º. Por lo que este CEIC, actuando como comité externo al biobanco, emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

3º. Este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado en los siguientes CEIC/Centros por los Investigadores:

CEIC Hospital General Universitario José María Morales Meseguer

Dr. Francisco Ayala de la Peña  
(Oncología Médica) Hospital General Universitario J.M. Morales Meseguer

Lo que firmo en Murcia, a 28 de enero de 2015.



Dr.ª María Dolores Nájera Pérez  
Presidenta del CEIC Hospital General Universitario José María Morales Meseguer

Aprobación del estudio por la Comisión de Ensayos e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Morales Meseguer (código interno: EST07/15).

# Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes and neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy

Esmeralda García-Torralba, Francisco Ayala de la Peña, Beatriz Alvarez-Abril, Pilar de la Morena Barrio, Alejandra Ivars Rubio, Elisa García-Garre, Gema Marin Zafra, Alberto Carmona-Bayonas and Elena García Martínez.  
Hospital General Universitario Morales Meseguer, Murcia, Spain

## ABSTRACT

### Introduction and objectives:

Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) play a prognostic role in early stage breast cancer (BC). There is no evidence about the combined effect of both factors.

Our aim was to evaluate the integrated clinical significance of TILs and NLR in patients with early BC treated with neoadjuvant therapy.

### Materials and methods:

Retrospective, single-center analysis of a cohort of patients with early BC treated with neoadjuvant chemotherapy between 2001-2010. Pre-treatment TILs (CD3+TIL count) was evaluated using a tumor tissue microarray. NLR was calculated within one month of cancer diagnosis. TILs (logarithmic transformed) and NLR were analyzed as continuous variables. Survival analysis was performed using multivariable Cox regression models.

### Results:

A total of 121 patients were included. Median age: 56 years. Cancer stage at diagnosis: 16% IIA, 28% IIB, 33% IIIA, 7% IIIB and 16% IIIC. Molecular subtype: 64% hormone receptor(HR)-positive (12% HER2-positive), 11% HER2-positive HR-negative and 22% triple-negative. Pathological complete response (pCR): 16.5%. Median follow-up: 12 years.

Pre-treatment TIL analysis was available in 71 patients (59%) and NLR in 101 (83%). There was no correlation between both variables (Spearman's Rho: 0.03, p=0.98).

In the univariable analysis the NLR showed a negative prognostic value for overall survival (OS) (HR 1.23, 95%CI 1.11-1.36; p<0.001, C-index: 0.64 95%CI 0.52-0.77, p=0.69). The effect was opposite for TILs (HR: 0.76 95%CI 0.61-0.95, p=0.02, C-index: 0.69 95%CI 0.57-0.81, p=0.69). The linear approximation was adequate, and there was no suspicion of non-proportionality of the hazards.

In the multivariable analysis, including or not cancer staging after neoadjuvant therapy, NLR remained as an independent variable (HR 1.18, 95%CI 1.04-1.33; p=0.01) and a statistic trend for TILs was also observed (HR 0.83, 95%CI 0.65-1.07; p=0.16). Given the limited sample size, the multivariate analysis did not provide clear evidence of an additive effect. Nevertheless, the combined analysis of both parameters showed a better fit with respect to the two variables separately (Akaike Information Criterion for the combined model, for TILs and for NLR: 106, 133 and 214, respectively).

### Conclusion:

The integrated characterization of TILs and NLR identifies different prognostic subgroups in early BC patients receiving neoadjuvant chemotherapy. Future validation of these findings in large, multicenter cohorts might allow treatment optimization by means of new strategies such as immunotherapy.



### CONTACT

esmeraldagarciaorralba5@gmail.com

## INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) constitute prognostic biomarkers in early stage breast cancer (BC). Prior to starting neoadjuvant chemotherapy, pre-treatment TIL levels and NLR determination predict pathological complete response (pCR). Nevertheless, the prognostic value of the combination of both markers of antitumoral immune response has not been evaluated yet.

Our objective was to evaluate the integrated clinical significance of TILs and NLR in patients with early BC treated with neoadjuvant chemotherapy.

## MATERIALS AND METHODS

Retrospective, single-center analysis of a cohort of patients with early BC treated with neoadjuvant chemotherapy between 2001-2010.

For the evaluation of pre-treatment TILs (CD3+TIL count) we used a tumor tissue microarray. NLR was calculated based on laboratory analysis of blood samples collected within 1 month of cancer diagnosis.

TILs (logarithmic transformation) and NLR were analyzed as continuous variables. Survival analysis was performed using multivariable Cox regression models.

Harrell's concordance index (C-index) and Akaike information criterion (AIC) were calculated for the comparison of different predictive models. A higher C-index value indicates better concordance of survival times and a smaller AIC value indicates a more goodness-of-fit for predicting outcomes.

## RESULTS

A total of 121 patients were included. The median follow-up was 12 years. At the final follow-up date, overall survival was 75% and disease-free survival was 73%.

Patients' baseline characteristics are shown in Table 1.

Pre-treatment TIL analysis was available in 71 patients (59%) and NLR in 101 (83%). There was no correlation between both variables (Spearman's Rho: 0.03, p=0.98). Although TILs (logarithmic transformed) and NLR were analyzed as continuous variables, in order to represent Kaplan-Meier curves, we selected the cut-off value of 35.19/mm<sup>3</sup> (percentile 50 in our cohort) for TILs and the previously reported cut-off value of 3 (percentile 80 in our cohort) for NLR. Subgroup characteristics are shown in Table 2.

In the univariable analysis, the NLR showed a negative prognostic value for overall survival (OS) (HR 1.23, 95%CI 1.11-1.36; p<0.001, C-index: 0.64 95%CI 0.52-0.77, p=0.69). The effect was opposite for TILs (HR: 0.76 95%CI 0.61-0.95, p=0.02; C-index: 0.69 95%CI 0.57-0.81, p=0.69). The linear approximation was adequate, and there was no suspicion of non-proportionality of the hazards. Results based on binary subgroups for TILs and NLR are shown in Figure 1.

In a subgroup analysis of patients with high TILs and low NLR (N=15; 25%) compared to the rest of patients (N=46; 75%), we did not find significant differences in baseline characteristics, except for a higher proportions of patients with HR-HER2+ tumours in the first subgroup (33 vs 8%) and a higher proportions of patients with triple negative tumours in the rest of subgroups (13 vs 22%). Kaplan-Meier analysis is shown in Figure 2.

In the multivariable analysis, including or not cancer staging after neoadjuvant therapy, NLR remained as an independent variable (HR 1.18, 95%CI 1.04-1.33; p=0.01) and a statistic trend for TILs was also observed (HR 0.83, 95%CI 0.65-1.07; p=0.16). Given the limited sample size, the multivariable analysis did not provide clear evidence of an additive effect. Nevertheless, the combined analysis of both parameters showed a better fit with respect to the two variables separately (Akaike Information Criterion for the combined model, for TILs and for NLR: 106, 133 and 214, respectively).

Table 1. Patients' baseline characteristics

Characteristic	N (%)
Age	Median: 56 years old
Cancer stage at diagnosis	
IIA	19 (16%)
IIB	34 (28%)
IIIA	40 (33%)
IIIB	9 (7%)
IIIC	19 (16%)
Molecular subtype	
HR+HER2-	63 (52%)
HR+HER2+	15 (12%)
HR-HER2-	13 (11%)
Triple negative	27 (22%)
Not available	3 (3%)
Pathological complete response	20 (16.5%)

Table 2. NLR & TIL subgroup characteristics

Characteristic	N (%)
TILs available	71 (59%)
NLR available	101 (83%)
TILs	
Quantitative	Median: 35.19/mm <sup>3</sup> (Range: 0-2322.1)
Binary	
•High TILs (>35.19/mm <sup>3</sup> )	35 (49%)
•Low TILs (≤ 35.19/mm <sup>3</sup> )	36 (51%)
NLR	
Quantitative	Median: 1.9 (Range: 0.76-17.5)
Binary	
•Low NLR (≤ 3)	83 (82%)
•High NLR (>3)	18 (18%)

Figure 1. Univariable analysis

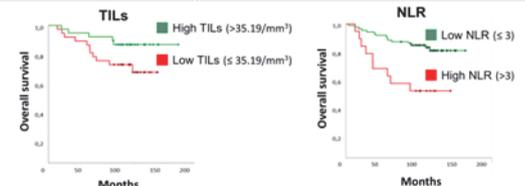
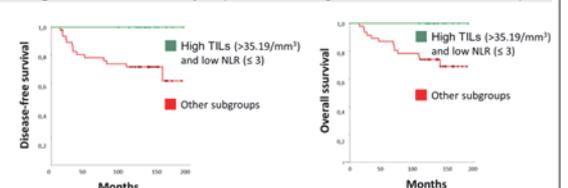


Figure 2. Univariable analysis (Patients with High TILs and low NLR vs others)



## CONCLUSIONS

The integrated characterization of TILs and NLR identifies different prognostic subgroups in early BC patients receiving neoadjuvant chemotherapy.

Future validation of these findings in large, multicenter cohorts might allow treatment optimization by means of new strategies such as immunotherapy.

## REFERENCES

1. Carsten Denkert, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018; 2. Sasha E Stanton, et al. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer.* 2016; 3. Jose-Luis Etxar, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Research.* 2017; 4. Jiaqing Dan, et al. The dynamic change of neutrophil to lymphocyte ratio is predictive of pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer.* 2020; 5. Ivars Rubio, A., et al. Neutrophil-lymphocyte ratio in metastatic breast cancer is not an independent predictor of survival, but depends on other variables. *So Rep.* 9. 2019.

Esmeralda García-Torralba, Francisco Ayala de la Peña, Beatriz Alvarez-Abril, et al.; Abstract PS6-45: Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes and neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Res* 15 February 2021; 81 (4\_Supplement): PS6-45. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS20-PS6-45>

## Development of prognostic models based on clinical, immune-related and proliferation factors in early breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy

Esmeralda García-Torralba<sup>1,2,3</sup>, Beatriz Álvarez-Abril<sup>1,2,3</sup>, Carlos Bravo-Pérez<sup>1,2,3</sup>, Esther Navarro Manzano<sup>2,3</sup>, Pilar de la Morena Barrio<sup>1,2,3</sup>, Alejandra Ivars Rubio<sup>1,2,3</sup>, Elísa García-Garre<sup>1,2,3</sup>, Gema Marin Zafra<sup>1,2,3</sup>, Francisco Ayala de la Peña<sup>1,2,3</sup> and Elena García Martínez<sup>1,2,3</sup>  
1. Servicio de Hematología y Oncología. Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia (España). 2. Universidad de Murcia. 3. IMIB-Arrixaca

### ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Up to 30% of early breast cancer (BC) patients treated with neoadjuvant chemotherapy will have systemic relapse during the follow-up. The integration of clinical, analytical and molecular parameters associated to tumor biology or host immune response could help to better stratify the prognosis of these patients. The aim of this study was to analyze the prognostic ability of immune-related and proliferation markers in combination with clinical parameters in patients with early BC treated with neoadjuvant chemotherapy.

**Materials and methods:** Retrospective and single-center cohort of BC patients treated with neoadjuvant chemotherapy between 2001 and 2010. We analyzed the following pre-treatment biological markers: neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in peripheral blood and CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), interferon-gamma and Interleukin-10 in tumor samples by using a tissue microarray. Gene expression of *AURKA*, *MYBL2*, *MKI67* and *CTNNB1* in RNA from tumor samples was also evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Survival analysis was performed using Cox regression. The predictive capacity of the regression models was evaluated using AIC (Akaike Information Criterion) index, ROC curves and Harrell's C statistics.

**Results:** A total of 121 patients were included. Median age: 56 years. Cancer stage at diagnosis: 16% IA, 28% IB, 33% IIA, 7% IIB and 16% IIIC. Molecular subtype: 64% hormone receptor-positive (12% HER2-positive), 11% HER2-positive and 22% triple-negative. Pathological complete response (pCR): 16.5%. Median follow-up: 12 years.

In the univariate analysis, NLR (HR 1.23, 95% CI 1.11-1.36; p<0.001), TIL (HR 0.89, CI95% 0.81-0.98; p=0.02), *AURKA* (HR 1.02, 95% CI 1.01-1.04; p<0.001) and *MYBL2* (HR 1.10, 95% CI 1.03-1.19; p=0.007) showed prognostic value for overall survival (OS).

In the multivariate analysis, including staging after neoadjuvant therapy (HR 6.54, 95% CI 1.38-31.49; p=0.02), NLR (HR 1.33, 95% CI 1.08-1.64; p=0.008), TIL (HR 0.84, 95% CI 0.73-0.97; p=0.21), *AURKA* (HR 1.05, 95% CI 0.99-1.10; p=0.055) and *MYBL2* (HR 1.14, 95% CI 1.00-1.31; p=0.04) remained as independent predictive variables in a regression analysis.

Consecutive addition of these biomarkers to a regression model based on staging after neoadjuvant treatment progressively increased the discrimination accuracy of the models. These differences were more marked for the predictive model that included the four biological parameters identified in the multivariate analysis: NLR, TIL, *AURKA* and *MYBL2* (Table 2).

**Conclusion:** In our cohort, the creation of a prognostic model integrated by clinical factors together with proliferation and both tissue and circulating immune biomarkers demonstrated high predictive capacity for OS. The validation of these findings in independent cohorts could impact in patient's management.

### CONTACT

esmeralda.garciat@um.es

### INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Up to 30% of early breast cancer (BC) patients treated with neoadjuvant chemotherapy will have systemic relapse during the follow-up. The integration of clinical, analytical and molecular parameters related to tumor biology and the immune system could make it possible to stratify the prognosis of these patients in more detail.

The objective of this study was to analyze the predictive capacity of biological and genetic markers in combination with clinical parameters in patients with early BC treated with neoadjuvant chemotherapy.

### MATERIALS AND METHODS

Retrospective and single-center analysis of a cohort of patients with early BC treated with neoadjuvant chemotherapy between 2001 and 2010 at Morales Meseguer University Hospital.

Pre-treatment biological and genetic markers that were analyzed comprised: peripheral blood neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), tumor tissue cytokines Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and Interleukin-10 (IL-10), and tumor tissue *AURKA*, *MYBL2*, *MKI67* and *CTNNB1* gene expression.

NLR was calculated based on laboratory analysis of blood samples collected within 1 month of cancer diagnosis. For the evaluation of pre-treatment TIL (CD3+TIL count), IFN- $\gamma$  and IL-10 we used a tumor tissue microarray.

Gene expression analysis of *AURKA*, *MYBL2*, *MKI67* and *CTNNB1* genes was determined by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in RNA.

Biological and genetic markers were analyzed as continuous variables. Survival analysis was performed using multivariable Cox regression models. The predictive capacity of the regression models was evaluated using the Akaike Information Criterion (AIC) index, Receiver Operating Characteristic (ROC) curves and Harrell's concordance index (C-index).

### RESULTS

#### Patients

A total of 121 patients were included. Patients' baseline characteristics are shown in Table 1. The median follow-up was 12 years. At the final follow-up date, overall survival (OS) was 75% and disease-free survival (DFS) was 73%.

#### Univariate analysis:

- DFS: NLR (HR 1.17, 95% CI 1.05-1.29; p=0.003), TIL (HR 0.93, CI95% 0.86-0.98; p=0.52), *AURKA* (HR 1.27, 95% CI 1.08-1.49; p=0.004), *MYBL2* (HR 1.41, 95% CI 1.05-1.89; p=0.021), and *CTNNB1* (HR 1.08, 95% CI 1.0-1.15; p=0.013) showed prognostic value.

- OS: NLR (HR 1.23, 95% CI 1.11-1.36; p<0.001), TIL (HR 0.89, CI95% 0.81-0.98; p=0.02), IL-10 (HR 1.0, CI95% 1.0-1.0; p=0.004), *AURKA* (HR 1.02, 95% CI 1.01-1.04; p<0.001), *MYBL2* (HR 1.10, 95% CI 1.03-1.19; p=0.007), *MKI67* (HR 1.0, 95% CI 1.0-1.0; p=0.034), and *CTNNB1* (HR 1.06, 95% CI 1.0-1.13; p=0.03) showed prognostic value.

#### Multivariate analysis:

- DFS: including staging after neoadjuvant therapy (HR 75.5, 95% CI 3.15-1808.6; p=0.008), NLR (HR 1.85, 95% CI 1.2-1.2.86; p=0.006) and *MYBL2* (HR 1.06, 95% CI 1.01-1.11; p=0.02) remained as independent variables for DFS in a regression analysis.

- OS: including staging after neoadjuvant therapy (HR 6.54, 95% CI 1.36-31.49; p=0.02), NLR (HR 1.33, 95% CI 1.08-1.64; p=0.008), TIL (HR 0.84, 95% CI 0.73-0.97; p=0.21), *AURKA* (HR 1.05, 95% CI 0.99-1.10; p=0.055) and *MYBL2* (HR 1.14, 95% CI 1.00-1.31; p=0.04) remained as independent variables for OS in a regression analysis.

The analysis of models based on the consecutive addition of these biomarkers implied a greater prognostic capacity compared to staging after neoadjuvant treatment alone. The differences were more marked for the model that included the four parameters. Analysis of prognostic capacity with the consecutive addition of biomarkers is reported in Figure 1 and Table 2.

Table 1. Patients' baseline characteristics

Characteristic	N (%)
Age (mean, range) years	56,4 (21 - 79)
Menstrual status	
Postmenopausal	60 (49,6%)
Premenopausal	61 (50,4%)
Histologic subtype	
Invasive ductal carcinoma	113 (93,4%)
Other subtypes	8 (6,6%)
Cancer stage at diagnosis	
IIA	19 (16%)
IIB	34 (28%)
IIIA	40 (33%)
IIIB	9 (7%)
IIIC	19 (16%)
Molecular subtype	
HR+HER2-	63 (52%)
HR+HER2+	15 (12%)
HR+HER2-	13 (11%)
Triple negative	27 (22%)
Not available	3 (3%)
Pathological complete response (pCR)	20 (16,5%)

Figure 1. Analysis of prognostic capacity with the consecutive addition of biomarkers

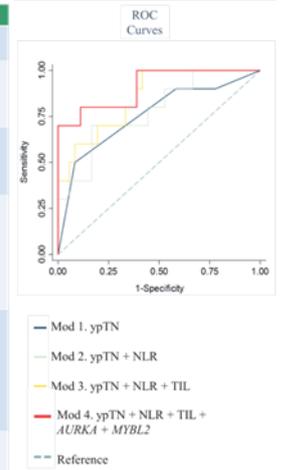


Table 2. Analysis of prognostic capacity with the consecutive addition of biomarkers

Models	AIC	AUC ROC (95% CI)	p	Harrell's C-index (95% CI)	p
Model 1: ypTN	274	0,76 (0,58-0,94)	ref	0,74 (0,57-0,91)	ref
Model 2: ypTN + NLR	187	0,78 (0,61-0,95)	0,83	0,80 (0,67-0,93)	0,53
Model 3: ypTN + NLR + TIL	85	0,85 (0,73-0,98)	0,30	0,83 (0,73-0,94)	0,30
Model 4: ypTN + NLR + TIL + AURKA + MYBL2	57	0,91 (0,80-1)	0,11	0,89 (0,81-0,97)	0,13

\* AUC ROC: Area Under The Curve ROC. Ref: comparison reference versus which the p-values of the comparisons of the AUC ROC and C-index are reported.

### CONCLUSIONS

In our cohort, the creation of a prognostic model integrated by clinical factors together with proliferation and both tissue and circulating immune biomarkers demonstrated high predictive capacity for OS.

The validation of these findings in independent cohorts could impact in patient's management.

### REFERENCES

1. Ayala F et al. SEOM clinical guidelines in early stage breast cancer. Clin Transl Oncol. 2018; 2. Gonzalez-Esteban, et al. The path to a better biomarker. J Pathol. 2020; 3. Derkari C, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer. Lancet Oncol. 2018; 4. Garcia-Martinez E, et al. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. Breast Cancer Res. 2014; 5. Cuzco MA, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and cancer prognosis. BMC Med. 2020; 6. Maitland B, et al. Safety and activity of alectinib, an investigational anaplastic kinase inhibitor. Lancet Oncol. 2015; 7. Luongo-Gil G, et al. Clinical and biological impact of multi-file expression in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. Cell Oncol. 2019; 8. Garcia-Torralba, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes and neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. SABCS 2020.

Esmeralda García-Torralba, Beatriz Álvarez-Abril, Carlos Bravo-Pérez, et al.; Abstract P4-07-03: Development of prognostic models based on clinical, immune-related and proliferation factors in early breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. Cancer Res 15 February 2022; 82 (4\_Supplement): P4-07-03. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS21-P4-07-03>

## Prognostic significance of changes in tumor infiltrating lymphocytes and neutrophil-to-lymphocyte ratio after neoadjuvant chemotherapy in early breast cancer patients

Esmeralda García-Torralba<sup>1,2,3</sup>, Beatriz Álvarez-Abril<sup>1,2,3</sup>, Carlos Bravo-Pérez<sup>1,2,3</sup>, Esther Navarro Manzano<sup>2,3</sup>, Pilar de la Morena Barrio<sup>1,2,3</sup>, Alejandra Ivars<sup>1,2,3</sup>, Elisa García-Garre<sup>1,2,3</sup>, Gema Marín<sup>1,2,3</sup>, Francisco Ayala de la Peña<sup>1,2,3</sup> and Elena García Martínez<sup>1,2,3</sup>  
1. Servicio de Hematología y Oncología. Hospital Morales Meseguer, Murcia (España). 2. Universidad de Murcia. 3. IMIB-Arrixaca

### ABSTRACT

#### Introduction and objectives:

Biomarkers that could identify patients with early breast cancer (BC) most likely to benefit from new therapeutic strategies are mandatory. Current evidence shows that both markers of antitumor local and systemic immune response, such as tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), respectively, have prognostic value in early BC. However, not only baseline levels, but also after neoadjuvant chemotherapy (NAC) as well as the pre-post variation of these markers, should be explored. The aim of this study was to simultaneously investigate the prognostic significance of the pre-post-NAC variation of TIL and NLR in patients with early BC.

#### Materials and methods:

Retrospective, single-center cohort of patients with early BC treated with NAC between 2001 and 2010. Pre- and post-NAC TIL (CD3+TIL counts) were assessed by tumor tissue microarrays performed in both diagnostic core-needle biopsy and surgical excision specimens, respectively. Pre- and post-NAC NLR were calculated based on blood tests collected within 1 month of cancer diagnosis and at the moment of breast surgery, respectively.

The variations of TIL and NLR after NAC were estimated by the absolute post-pre difference. We examined the association between the post-pre change of TIL and NLR (stratified into deciles, D1-D10) and survival outcomes by using Cox regression models.

#### Results:

Forty-seven (40%) out of 121 patients had pre- and post-NAC values of both NLR and TIL. Patients' baseline characteristics are shown in Table 1. The median follow-up of this group was 11.5 years (IQR: 10.5-12.5 years). At the final follow-up date, overall survival (OS) was 87.2 %.

In the univariable analysis, the increase in TIL and NLR after NAC among deciles showed a negative prognostic value for OS (TIL: HR 1.54, 95%CI 1.05-2.26, p=0.026; NLR: HR 1.32, 95%CI 0.98-1.79, p=0.070). In the multivariable analysis, both the increase of TIL and NLR after NAC among deciles add independent predictive value (TIL: HR 1.53, 95%CI 1.00-2.34, p=0.049; NLR: HR 1.42, 95%CI 0.95-2.12, p=0.09).

To represent in Kaplan-Meier curves the combined effect of the change of TIL and NLR in OS, we divided patients into four groups, depending on the sign of the absolute difference of post-pre values of TIL and NLR. The subgroup of patients with no increment in TIL (TIL post-pre diff ≤ 0, N=25) showed the best prognosis, with no deaths registered during the follow-up. As regards patients with any grade of TIL increment (TIL post-pre diff > 0, N=22), the subgroup of patients with no increment in NLR (NLR post-pre diff ≤ 0, N=5) showed an intermediate prognosis (20% of deaths), whereas patients with concurrent increment in NLR (NLR post-pre diff > 0, N=17) had the lowest OS (29.4% of deaths). Differences observed between groups were statistically significant (Log Rank p=0.042).

#### Conclusion:

The integrated characterization of the variations of TIL and NLR after NAC identifies different prognostic subgroups in early BC patients. In our cohort, both the increment of TIL and/or NLR after NAC are associated to a worse prognosis. Future validation of these findings in large, multicenter cohorts might allow treatment optimization by means of new strategies such as immunotherapy.

### CONTACT

esmeralda.garcia@um.es

### INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Despite continuous attempts to improve therapeutic options, there is still 30-40% of patients with early breast cancer (BC) that relapse. Biomarkers that could identify patients most likely to benefit from new therapeutic strategies are mandatory. Current evidence shows that both markers of antitumor local and systemic immune response, such as tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), respectively, have prognostic value in early BC. However, not only baseline levels, but also after neoadjuvant chemotherapy (NAC), as well as the pre-post variation of these markers, should be explored.

The objective of this study was to simultaneously investigate the prognostic significance of the pre-post-NAC variation of TIL and NLR in patients with early BC.

### MATERIALS AND METHODS

Retrospective and single-center analysis of a cohort of patients with early BC treated with neoadjuvant chemotherapy between 2001 and 2010 at Morales Meseguer University Hospital.

Pre- and post-NAC TIL (CD3+TIL counts) were assessed by tumor tissue microarrays performed in both diagnostic core-needle biopsy and surgical excision specimens, respectively. Pre- and post-NAC NLR were calculated based on laboratory analysis of blood samples collected within 1 month of cancer diagnosis and at the moment of breast surgery, respectively.

The variations of TIL and NLR after NAC were estimated by the absolute post-pre difference. We examined the association between the post-pre change of TIL and NLR (stratified into deciles, D1-D10) and survival outcomes by using Cox regression models.

To represent the combined effect of the change of TIL and NLR on OS in Kaplan-Meier curves, based on the sign of the absolute difference of post-pre values of TIL and NLR we divided patients into four groups: 1) TIL post-pre diff ≤ 0 and NLR post-pre diff ≤ 0 2) TIL post-pre diff ≤ 0 and NLR post-pre diff > 0 3) TIL post-pre diff > 0 and NLR post-pre diff ≤ 0 4) TIL post-pre diff > 0 and NLR post-pre diff > 0.

### RESULTS

Forty-seven (40%) out of 121 patients had pre- and post-NAC values of both NLR and TIL. Patients' baseline characteristics are shown in Table 1. The median follow-up of this group was 11.5 years (IQR: 10.5 - 12.5 years). At the final follow-up date, overall survival (OS) was 87.2 %. Correlation analysis revealed that only pre- and post-NAC values of NLR were correlated (Spearman's Rho: 0.44, p<0.001).

In the univariable analysis, the increase in TIL and NLR after NAC among deciles showed a negative prognostic value for OS (TIL: HR 1.54, 95%CI 1.05-2.26, p=0.026; NLR: HR 1.32, 95%CI 0.98-1.79, p=0.070).

Figure 1 represents the Kaplan-Meier curve for OS in the cohort study according to the change of TIL and NLR after NAC. The subgroup of patients with no increment in TIL (TIL post-pre diff ≤ 0 and NLR post-pre diff ≤ 0; TIL post-pre diff ≤ 0 and NLR post-pre diff > 0, N=25) showed the most favorable prognosis, with no deaths registered during the follow-up. In this subgroup, 9/25 (36%) patients achieved pathological complete response (pCR). As regards patients with any grade of TIL increment (TIL post-pre diff > 0, N=22), the subgroup of patients with no increment in NLR (NLR post-pre diff ≤ 0, N=5) showed an intermediate prognosis (20% of deaths), whereas patients with concurrent increment in NLR (NLR post-pre diff > 0, N=17) had the poorest OS (29.4% of deaths). No patient with TIL increment achieved pCR. Differences observed between groups were statistically significant (Log Rank p=0.042).

In the multivariable analysis, adjusted by cancer restaging after NAC (Table 2), both the increase of TIL and NLR after NAC among deciles add independent predictive value (TIL: HR 1.53, 95%CI 1.00-2.34, p=0.049; NLR: HR 1.42, 95%CI 0.95-2.12, p=0.09).

Table 1. Patients' baseline characteristics

	N=47
Age (median, range)	56 (21, 78)
Menstrual status	
Postmenopausal	25 (53,2%)
Premenopausal	22 (46,8%)
Histologic subtype	
Invasive ductal carcinoma	42 (91,5%)
Other subtypes	4 (8,5%)
Histologic grade	
Grade 1	2 (4,3%)
Grade 2	18 (38,3%)
Grade 3	23 (48,9%)
Unknown	4 (8,6%)
cT	
cT2	21 (44,7%)
cT3	24 (51,1%)
cT4a-d	2 (4,2%)
cN	
cN0	18 (38,3%)
cN1	14 (29,8%)
cN2	6 (12,8%)
cN3	9 (19,1%)
Molecular subtype	
HR+ HER2-	22 (46,8%)
HER2+ HR+	8 (17,0%)
HER2+ ER-	6 (12,8%)
TN	10 (21,3%)
Breast surgery	
Conservative	26 (55,3%)
Mastectomy	21 (44,7%)
Nodal surgery	
SLN biopsy	12 (25,5%)
ALND	35 (74,5%)
Relapse type	
Metastasis	7 (14,9%)
Local/contralateral	1 (0,83%)
Deaths	6 (12,8%)

Figure 1. OS according to the change of TIL and NLR after NAC

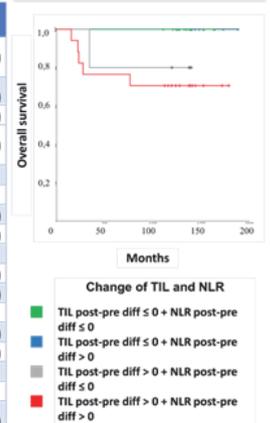


Table 2. Multivariable analysis

Variable	Sig.(p)	HR	95%CI HR
Cancer restaging after NAC	0,034	1,40	1,03 – 1,91
Increase of TIL	0,049	1,53	1,00 – 2,34
Increase of NLR	0,09	1,42	0,95 – 2,12

### CONCLUSIONS

- The integrated characterization of the variations of TIL and NLR after NAC identifies different prognostic subgroups in early BC patients. In our cohort, both the increment of TIL and/or NLR after NAC are associated to a worse prognosis.
- Future validation of these findings in large, multicenter cohorts might allow treatment optimization by means of new strategies such as immunotherapy.

### REFERENCES

- Ayala de la Peña, F. et al. SEOM clinical guidelines in early stage breast cancer. Clin Transl Oncol. 2019; 2. Dentert C, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer. Lancet Oncol. 2018; 3. García-Martínez E, et al. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. Breast Cancer Res. 2014; 4. Cuzco MA, et al. NLR and cancer prognosis. BMC Med. 2020; 8. Xu J, et al. Association of NLR with ER and PR in BC patients and their changes after NAC. Clin Transl Oncol. 2017; Aug;19(8):989-99. 6. García-Torralba, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes and neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. SABCS 2020.

Esmeralda García-Torralba, Beatriz Álvarez-Abril, Carlos Bravo-Pérez, et al.; Abstract P4-07-11: Prognostic significance of changes in tumor infiltrating lymphocytes and neutrophil-to-lymphocyte ratio after neoadjuvant chemotherapy in early breast cancer patients. Cancer Res 15 February 2022; 82 (4\_Supplement): P4-07-11. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS21-P4-07-11>

## BIBLIOGRAFÍA

---



1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jan 1;71(1):7–33.
2. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España. 2021. Available from: [https://seom.org/images/Cifras\\_del\\_cancer\\_en\\_Espnaha\\_2021.pdf](https://seom.org/images/Cifras_del_cancer_en_Espnaha_2021.pdf)
3. World Health Organization. Global Health Estimates 2019: Disease Burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2019. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/global-health-estimates-leading-causes-of-dalys>
4. Ferlay J, Laversanne M, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery, L, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>
5. Porter P. “Westernizing” women’s risks? Breast cancer in lower-income countries. *N Engl J Med*. 2008 Jan;358(3):213–6.
6. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug;13(17).
7. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LFA, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. 2008 Oct;216(2):141–50.
8. World Health Organisation. WHO Classification of Tumours of the Breast, 5th Edition. World Heal Organ. 2019. Available from: <https://www.iarc.who.int/news-events/who-classification-of-tumours-5th-edition-volume-2-breast-tumours/>
9. Erber R, Hartmann A. Histology of Luminal Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*. 2020 Aug;15(4):327–36.
10. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2019 Sep;5(1):66.
11. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug;406(6797):747–52.
12. 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 U S A*. 2001 Sep;98(19):10869–74.
13. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012 Oct;490(7418):61–70.
14. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8(5):R76.
15. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013 Sep;24(9):2206–23.
16. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015;8:23–31.

17. Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.* 2012 Oct;38(6):698–707.
18. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 May;101(10):736–50.
19. Raj-Kumar P-K, Liu J, Hooke JA, Kovatich AJ, Kvecher L, Shriver CD, et al. PCA-PAM50 improves consistency between breast cancer intrinsic and clinical subtyping reclassifying a subset of luminal A tumors as luminal B. *Sci Rep.* 2019 May;9(1):7956.
20. Prat A, Carey LA, Adamo B, Vidal M, Tabernero J, Cortés J, et al. Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014 Aug;106(8).
21. Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. *Lancet (London, England).* 2021 May;397(10286):1750–69.
22. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010 Nov;363(20):1938–48.
23. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol.* 2010 Jun;4(3):192–208.
24. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68.
25. Dias K, Dvorkin-Gheva A, Hallett RM, Wu Y, Hassell J, Pond GR, et al. Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics. *PLoS One.* 2017;12(1):e0168669.
26. Amin M, Edge S, Greene F, Eds. *AJCC (American Joint Committee on Cancer). Cancer Staging Manual.* 8th ed. Chicago, IL, USA; 2018.
27. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Nov;373(21):2005–14.
28. Zhang X, Yang J, Cai H, Ye Y. Young age is an independent adverse prognostic factor in early stage breast cancer: a population-based study. *Cancer Manag Res.* 2018;10:4005–18.
29. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991 Nov;19(5):403–10.
30. Houvenaeghel G, Cohen M, Classe JM, Reyat F, Mazouni C, Chopin N, et al. Lymphovascular invasion has a significant prognostic impact in patients with early breast cancer, results from a large, national, multicenter, retrospective cohort study. *ESMO open.* 2021 Dec;6(6):100316.
31. Nayyar A, Gallagher KK, McGuire KP. Definition and Management of Positive Margins for Invasive Breast Cancer. *Surg Clin North Am.* 2018 Aug;98(4):761–71.
32. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017 Aug;28(8):1700–12.

33. Ayala de la Peña F, Andrés R, Garcia-Sáenz JA, Manso L, Margelí M, Dalmau E, et al. SEOM clinical guidelines in early stage breast cancer (2018). *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Spanish Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. 2019 Jan;21(1):18–30.
34. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2019 Aug;30(8):1194–220.
35. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst*. 2021 Jul;113(7):808–19.
36. 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 (London, England)*. 2014 Jul;384(9938):164–72.
37. 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 Apr;35(10):1049–60.
38. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Erratum to “Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up”: *Annals of Oncology* 30; 2019: 1194-1220. Vol. 32, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. England; 2021. p. 284.
39. Gradishar WJ, Moran MS, Abraham J, Aft R, Agnese D, Allison KH, et al. NCCN Guidelines® Insights: Breast Cancer, Version 4.2021. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021 May;19(5):484–93.
40. Torrìs R, Marrazzo E, Agostinetto E, De Sanctis R, Losurdo A, Masci G, et al. Neoadjuvant chemotherapy in hormone receptor-positive/HER2-negative early breast cancer: When, why and what? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021 Apr;160:103280.
41. Giorgi Rossi P, Lebeau A, Canelo-Aybar C, Saz-Parkinson Z, Quinn C, Langendam M, et al. Recommendations from the European Commission Initiative on Breast Cancer for multigene testing to guide the use of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer, hormone receptor positive, HER-2 negative. *Br J Cancer*. 2021 Apr;124(9):1503–12.
42. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Jul;379(2):111–21.
43. van Nes JGH, Putter H, Julien J-P, Tubiana-Hulin M, van de Vijver M, Bogaerts J, et al. Preoperative chemotherapy is safe in early breast cancer, even after 10 years of follow-up; clinical and translational results from the EORTC trial 10902. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 May;115(1):101–13.
44. Untch M, Konecny GE, Paepke S, von Minckwitz G. Current and future role of neoadjuvant therapy for breast cancer. *Breast*. 2014 Oct;23(5):526–37.
45. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer J-U, 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 May;30(15):1796–804.

46. Diaz-Botero S, Espinosa-Bravo M, Gonçalves VR, Esgueva-Colmenarejo A, Peg V, Perez J, et al. Different Prognostic Implications of Residual Disease After Neoadjuvant Treatment: Impact of Ki 67 and Site of Response. *Ann Surg Oncol*. 2016 Nov;23(12):3831–7.
47. Untch M, von Minckwitz G. Neoadjuvant chemotherapy: early response as a guide for further treatment: clinical, radiological, and biological. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2011;2011(43):138–41.
48. Colomer R, Saura C, Sánchez-Rovira P, Pascual T, Rubio IT, Burgués O, et al. Neoadjuvant Management of Early Breast Cancer: A Clinical and Investigational Position Statement. *Oncologist*. 2019 May;24(5):603–11.
49. Haque W, Verma V, Hatch S, Suzanne Klimberg V, Brian Butler E, Teh BS. Response rates and pathologic complete response by breast cancer molecular subtype following neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Aug;170(3):559–67.
50. 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2003 Nov;21(22):4165–74.
51. Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Barni S. Neoadjuvant chemotherapy and concomitant trastuzumab in breast cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *Anticancer Drugs*. 2011 Feb;22(2):128–35.
52. Gianni L, Pienkowski T, Im Y-H, Tseng L-M, Liu M-C, Lluch A, et al. 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jun;17(6):791–800.
53. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, Harvey V, Eniu A, Hegg R, et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013 Sep;24(9):2278–84.
54. Sella T, Weiss A, Mittendorf EA, King TA, Pilewskie M, Giuliano AE, et al. Neoadjuvant Endocrine Therapy in Clinical Practice: A Review. *JAMA Oncol*. 2021 Nov;7(11):1700–8.
55. Glück S, de Snoo F, Peeters J, Stork-Sloots L, Somlo G. Molecular subtyping of early-stage breast cancer identifies a group of patients who do not benefit from neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Jun;139(3):759–67.
56. Smith I, Robertson J, Kilburn L, Wilcox M, Evans A, Holcombe C, et al. Long-term outcome and prognostic value of Ki67 after perioperative endocrine therapy in postmenopausal women with hormone-sensitive early breast cancer (POETIC): an open-label, multicentre, parallel-group, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Nov;21(11):1443–54.
57. Classe J-M, Loaec C, Gimbergues P, Alran S, de Lara CT, Dupre PF, et al. Sentinel lymph node biopsy without axillary lymphadenectomy after neoadjuvant chemotherapy is accurate and safe for selected patients: the GANEA 2 study. *Breast Cancer Res Treat*. 2019 Jan;173(2):343–52.

58. Kuehn T, Bauerfeind I, Fehm T, Fleige B, Hausschild M, Helms G, et al. Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective, multicentre cohort study. *Lancet Oncol.* 2013 Jun;14(7):609–18.
59. Barrio A V, Montagna G, Mamtani A, Sevilimedu V, Edelweiss M, Capko D, et al. Nodal Recurrence in Patients With Node-Positive Breast Cancer Treated With Sentinel Node Biopsy Alone After Neoadjuvant Chemotherapy-A Rare Event. *JAMA Oncol.* 2021 Dec;7(12):1851–5.
60. Gálvez MM, Jiménez JA, Gil Izquierdo JI, Alcaraz AC, Benito AC, González LC, et al. Ultrasound staging in breast cancer: A decision-making oriented approach to axillary metastatic burden prediction. *Surg Oncol.* 2020 Dec;35:114–9.
61. Flores-Funes D, Aguilar-Jiménez J, Martínez-Gálvez M, Ibáñez-Ibáñez MJ, Carrasco-González L, Gil-Izquierdo JI, et al. Feasibility and validation of the targeted axillary dissection technique in the axillary staging of breast cancer after neoadjuvant therapy: Definitive results. *Surg Oncol.* 2021 Sep;38:101636.
62. Prowell TM, Pazdur R. Pathological complete response and accelerated drug approval in early breast cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jun;366(26):2438–41.
63. von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M, Fasching PA, Tesch H, Eggemann H, et al. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jan;366(4):299–309.
64. Cameron D, Brown J, Dent R, Jackisch C, Mackey J, Pivot X, et al. Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013 Sep;14(10):933–42.
65. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005 Oct;23(28):7212–20.
66. Luen S, Virassamy B, Savas P, Salgado R, Loi S. The genomic landscape of breast cancer and its interaction with host immunity. *Breast.* 2016 Oct;29:241–50.
67. Hammerl D, Smid M, Timmermans AM, Sleijfer S, Martens JWM, Debets R. Breast cancer genomics and immuno-oncological markers to guide immune therapies. *Semin Cancer Biol.* 2018 Oct;52(Pt 2):178–88.
68. García-Martínez E, Gil GL, Benito AC, González-Billalabeitia E, Conesa MAV, García García T, et al. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014 Nov;16(6):488.
69. Tekpli X, Lien T, Røssevold AH, Nebdal D, Borgen E, Ohnstad HO, et al. An independent poor-prognosis subtype of breast cancer defined by a distinct tumor immune microenvironment. *Nat Commun.* 2019 Dec;10(1):5499.
70. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang T-H, et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity.* 2018 Apr;48(4):812–830.e14.
71. Esteva FJ, Hubbard-Lucey VM, Tang J, Pusztai L. Immunotherapy and targeted therapy combinations in metastatic breast cancer. *Lancet Oncol.* 2019 Mar;20(3):e175–86.

72. Szekely B, Bossuyt V, Li X, Wali VB, Patwardhan GA, Frederick C, et al. Immunological differences between primary and metastatic breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018 Nov;29(11):2232–9.
73. Hutchinson KE, Yost SE, Chang C-W, Johnson RM, Carr AR, McAdam PR, et al. Comprehensive Profiling of Poor-Risk Paired Primary and Recurrent Triple-Negative Breast Cancers Reveals Immune Phenotype Shifts. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2020 Feb;26(3):657–68.
74. Franzoi MA, Romano E, Piccart M. Immunotherapy for early breast cancer: too soon, too superficial, or just right? *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2021 Mar;32(3):323–36.
75. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Feb;11(3):215–33.
76. Heinhuis KM, Ros W, Kok M, Steeghs N, Beijnen JH, Schellens JHM. Enhancing antitumor response by combining immune checkpoint inhibitors with chemotherapy in solid tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2019 Feb;30(2):219–35.
77. Kersten K, Salvagno C, de Visser KE. Exploiting the Immunomodulatory Properties of Chemotherapeutic Drugs to Improve the Success of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2015;6:516.
78. Wanderley CW, Colón DF, Luiz JPM, Oliveira FF, Viacava PR, Leite CA, et al. Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner. *Cancer Res*. 2018 Oct;78(20):5891–900.
79. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018 Jan;19(1):40–50.
80. Mittendorf EA, Philips A V, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*. 2014 Apr;2(4):361–70.
81. Adams S, Schmid P, Rugo HS, Winer EP, Loirat D, Awada A, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2019 Mar;30(3):397–404.
82. Emens LA, Cruz C, Eder JP, Braiteh F, Chung C, Tolaney SM, et al. Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. *JAMA Oncol*. 2019 Jan;5(1):74–82.
83. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Nov;379(22):2108–21.
84. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im S-A, Yusof MM, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet (London, England)*. 2020 Dec;396(10265):1817–28.

85. Miles D, Gligorov J, André F, Cameron D, Schneeweiss A, Barrios C, et al. Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2021 Aug;32(8):994–1004.
86. Nanda R, Liu MC, Yau C, Shatsky R, Pusztai L, Wallace A, et al. Effect of Pembrolizumab Plus Neoadjuvant Chemotherapy on Pathologic Complete Response in Women With Early-Stage Breast Cancer: An Analysis of the Ongoing Phase 2 Adaptively Randomized I-SPY2 Trial. *JAMA Oncol*. 2020 May;6(5):676–84.
87. Loibl S, Untch M, Burchardi N, Huober J, Sinn B V, Blohmer J-U, et al. A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2019 Aug;30(8):1279–88.
88. Gianni L, Huang CS, Egle D, Bermejo B, Zamagni C, Thill M, et al. Pathologic complete response (pCR) to neoadjuvant treatment with or without atezolizumab in triple-negative, early high-risk and locally advanced breast cancer: NeoTRIP Michelangelo randomized study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2022 Feb;
89. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Feb;382(9):810–21.
90. Schmid P, Cortes J, Dent R, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, et al. Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2022 Feb;386(6):556–67.
91. Sobral-Leite M, Van de Vijver K, Michaut M, van der Linden R, Hooijer GKJ, Horlings HM, et al. Assessment of PD-L1 expression across breast cancer molecular subtypes, in relation to mutation rate, BRCA1-like status, tumor-infiltrating immune cells and survival. *Oncoimmunology*. 2018;7(12):e1509820.
92. Haricharan S, Bainbridge MN, Scheet P, Brown PH. Somatic mutation load of estrogen receptor-positive breast tumors predicts overall survival: an analysis of genome sequence data. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Jul;146(1):211–20.
93. Tolaney SM, Barroso-Sousa R, Keenan T, Li T, Trippa L, Vaz-Luis I, et al. Effect of Eribulin With or Without Pembrolizumab on Progression-Free Survival for Patients With Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020 Oct;6(10):1598–605.
94. Yee D, DeMichele AM, Yau C, Isaacs C, Symmans WF, Albain KS, et al. Association of Event-Free and Distant Recurrence-Free Survival With Individual-Level Pathologic Complete Response in Neoadjuvant Treatment of Stages 2 and 3 Breast Cancer: Three-Year Follow-up Analysis for the I-SPY2 Adaptively Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020 Sep;6(9):1355–62.
95. Gall VA, Philips A V, Qiao N, Clise-Dwyer K, Perakis AA, Zhang M, et al. Trastuzumab Increases HER2 Uptake and Cross-Presentation by Dendritic Cells. *Cancer Res*. 2017 Oct;77(19):5374–83.

96. Knutson KL, Clynes R, Shreeder B, Yeramian P, Kemp KP, Ballman K, et al. Improved Survival of HER2+ Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab and Chemotherapy Is Associated with Host Antibody Immunity against the HER2 Intracellular Domain. *Cancer Res.* 2016 Jul;76(13):3702–10.
97. Loi S, Giobbie-Hurder A, Gombos A, Bachelot T, Hui R, Curigliano G, et al. Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b-2 trial. *Lancet Oncol.* 2019 Mar;20(3):371–82.
98. Huober J, Barrios CH, Niikura N, Jarzab M, Chang Y-C, Huggins-Puhalla SL, et al. VP6-2021: IMpassion050: A phase III study of neoadjuvant atezolizumab + pertuzumab + trastuzumab + chemotherapy in high-risk, HER2-positive early breast cancer (EBC). *Ann Oncol.* 2021 Aug 1;32(8):1061–2.
99. Pan H, Gray R, Braybrooke J, Davies C, Taylor C, McGale P, et al. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *N Engl J Med.* 2017 Nov;377(19):1836–46.
100. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med.* 2018 Jan;378(2):158–68.
101. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008 Mar;26(8):1275–81.
102. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1–27.
103. Pruneri G, Vingiani A, Denkert C. Tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer. *Breast.* 2018 Feb;37:207–14.
104. Li JJ, Tsang JY, Tse GM. Tumor Microenvironment in Breast Cancer-Updates on Therapeutic Implications and Pathologic Assessment. *Cancers (Basel).* 2021 Aug;13(16).
105. Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology.* 2015 Sep;82(3–4):142–52.
106. 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 Off J Eur Soc Med Oncol.* 2015 Feb;26(2):259–71.
107. Pereira ER, Jones D, Jung K, Padera TP. The lymph node microenvironment and its role in the progression of metastatic cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Feb;38:98–105.
108. Coleman RE, Gregory W, Marshall H, Wilson C, Holen I. The metastatic microenvironment of breast cancer: clinical implications. *Breast.* 2013 Aug;22 Suppl 2:S50-6.
109. Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb;109(8):2796–801.
110. Borst J, Ahrends T, Bąbała N, Melief CJM, Kastenmüller W. CD4(+) T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2018 Oct;18(10):635–47.
111. Cao Y, Dong L, He Y, Hu X, Hou Y, Dong Y, et al. The direct and indirect regulation of follicular T helper cell differentiation in inflammation and cancer. *J Cell Physiol.* 2021 Aug;236(8):5466–80.

112. Datta J, Rosembli C, Berk E, Showalter L, Namjoshi P, Mick R, et al. Progressive loss of anti-HER2 CD4(+) T-helper type 1 response in breast tumorigenesis and the potential for immune restoration. *Oncoimmunology*. 2015 Oct;4(10):e1022301.
113. Hollern DP, Xu N, Thennavan A, Glodowski C, Garcia-Recio S, Mott KR, et al. B Cells and T Follicular Helper Cells Mediate Response to Checkpoint Inhibitors in High Mutation Burden Mouse Models of Breast Cancer. *Cell*. 2019 Nov;179(5):1191-1206.e21.
114. Nelson BH. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*. 2010 Nov;185(9):4977–82.
115. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4<sup>+</sup> T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res*. 2011 May;71(10):3505–15.
116. Harimoto H, Shimizu M, Nakagawa Y, Nakatsuka K, Wakabayashi A, Sakamoto C, et al. Inactivation of tumor-specific CD8<sup>+</sup> CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunol Cell Biol*. 2013 Oct;91(9):545–55.
117. Qiu S-Q, Waaijer SJH, Zwager MC, de Vries EGE, van der Vegt B, Schröder CP. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? *Cancer Treat Rev*. 2018 Nov;70:178–89.
118. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010 Oct;11(10):889–96.
119. Hedrick CC, Malanchi I. Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted. *Nat Rev Immunol*. 2022 Mar;22(3):173–87.
120. Xie X, Shi Q, Wu P, Zhang X, Kambara H, Su J, et al. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection. *Nat Immunol*. 2020 Sep;21(9):1119–33.
121. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. 2009 Sep;16(3):183–94.
122. Jorch SK, Kuberski P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. 2017 Mar;23(3):279–87.
123. He G, Zhang H, Zhou J, Wang B, Chen Y, Kong Y, et al. Peritumoural neutrophils negatively regulate adaptive immunity via the PD-L1/PD-1 signalling pathway in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015 Nov;34:141.
124. Faget J, Peters S, Quantin X, Meylan E, Bonnefoy N. Neutrophils in the era of immune checkpoint blockade. *J Immunother cancer*. 2021 Jul;9(7).
125. Burugu S, Asleh-Aburaya K, Nielsen TO. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. *Breast Cancer*. 2017 Jan;24(1):3–15.
126. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar;12(4):252–64.
127. Núñez Abad M, Calabuig-Fariñas S, Lobo de Mena M, Torres-Martínez S, García González C, García García JÁ, et al. Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) as Immunotherapy Biomarker in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Jan;14(2).

128. Tu L, Guan R, Yang H, Zhou Y, Hong W, Ma L, et al. Assessment of the expression of the immune checkpoint molecules PD-1, CTLA4, TIM-3 and LAG-3 across different cancers in relation to treatment response, tumor-infiltrating immune cells and survival. *Int J cancer*. 2020 Jul;147(2):423–39.
129. Sahai E, Astsaturon I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020 Mar;20(3):174–86.
130. Aboussekhra A. Role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer development and prognosis. *Int J Dev Biol*. 2011;55(7–9):841–9.
131. Cox TR, Erler JT. Molecular pathways: connecting fibrosis and solid tumor metastasis. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Jul;20(14):3637–43.
132. Longatto Filho A, Lopes JM, Schmitt FC. Angiogenesis and breast cancer. *J Oncol*. 2010;2010.
133. Ritter A, Friemel A, Fornoff F, Adjan M, Solbach C, Yuan J, et al. Characterization of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral adipose tissues and their function in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2015 Oct;6(33):34475–93.
134. Trapp E, Janni W, Schindlbeck C, Jückstock J, Andergassen U, de Gregorio A, et al. Presence of Circulating Tumor Cells in High-Risk Early Breast Cancer During Follow-Up and Prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2019 Apr;111(4):380–7.
135. Núñez NG, Tosello Boari J, Ramos RN, Richer W, Cagnard N, Anderfuhren CD, et al. Tumor invasion in draining lymph nodes is associated with Treg accumulation in breast cancer patients. *Nat Commun*. 2020 Jun;11(1):3272.
136. Li M, Li A, Zhou S, Xu Y, Xiao Y, Bi R, et al. Heterogeneity of PD-L1 expression in primary tumors and paired lymph node metastases of triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2018 Jan;18(1):4.
137. Chen W, Hoffmann AD, Liu H, Liu X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *NPJ Precis Oncol*. 2018;2(1):4.
138. Loi S, Michiels S, Adams S, Loibl S, Budczies J, Denkert C, et al. The journey of tumor-infiltrating lymphocytes as a biomarker in breast cancer: clinical utility in an era of checkpoint inhibition. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2021 Oct;32(10):1236–44.
139. 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Mar;31(7):860–7.
140. Dieci M V, Conte P, Bisagni G, Brandes AA, Frassoldati A, Cavanna L, et al. Association of tumor-infiltrating lymphocytes with distant disease-free survival in the ShortHER randomized adjuvant trial for patients with early HER2+ breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2019 Mar;30(3):418–23.
141. Sobral-Leite M, Salomon I, Opdam M, Kruger DT, Beelen KJ, van der Noort V, et al. Cancer-immune interactions in ER-positive breast cancers: PI3K pathway alterations and tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Res*. 2019 Aug;21(1):90.

142. Ochi T, Bianchini G, Ando M, Nozaki F, Kobayashi D, Criscitiello C, et al. Predictive and prognostic value of stromal tumour-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy in triple negative and HER2-positive breast cancer. *Eur J Cancer*. 2019 Sep;118:41–8.
143. Herrero-Vicent C, Guerrero A, Gavilá J, Gozalbo F, Hernández A, Santiago S, et al. Predictive and prognostic impact of tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ecancermedalscience*. 2017;11:759.
144. Karn T, Denkert C, Weber KE, Holtrich U, Hanusch C, Sinn B V, et al. Tumor mutational burden and immune infiltration as independent predictors of response to neoadjuvant immune checkpoint inhibition in early TNBC in GeparNuevo. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2020 Sep;31(9):1216–22.
145. Park YH, Lal S, Lee JE, Choi Y-L, Wen J, Ram S, et al. Chemotherapy induces dynamic immune responses in breast cancers that impact treatment outcome. *Nat Commun*. 2020 Dec;11(1):6175.
146. Watanabe T, Hida AI, Inoue N, Imamura M, Fujimoto Y, Akazawa K, et al. Abundant tumor infiltrating lymphocytes after primary systemic chemotherapy predicts poor prognosis in estrogen receptor-positive/HER2-negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Feb;168(1):135–45.
147. Davis AA, Patel VG. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother cancer*. 2019 Oct;7(1):278.
148. Barroso-Sousa R, Jain E, Cohen O, Kim D, Buendia-Buendia J, Winer E, et al. Prevalence and mutational determinants of high tumor mutation burden in breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2020 Mar;31(3):387–94.
149. Fusco N, Lopez G, Corti C, Pesenti C, Colapietro P, Ercoli G, et al. Mismatch Repair Protein Loss as a Prognostic and Predictive Biomarker in Breast Cancers Regardless of Microsatellite Instability. *JNCI cancer Spectr*. 2018 Oct;2(4):pky056.
150. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord J-P, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2020 Jan;38(1):1–10.
151. Sinn B V, Loibl S, Hanusch CA, Zahm D-M, Sinn H-P, Untch M, et al. Immune-related Gene Expression Predicts Response to Neoadjuvant Chemotherapy but not Additional Benefit from PD-L1 Inhibition in Women with Early Triple-negative Breast Cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2021 May;27(9):2584–91.
152. Gomarasca M, Maroni P, Banfi G, Lombardi G. microRNAs in the Antitumor Immune Response and in Bone Metastasis of Breast Cancer: From Biological Mechanisms to Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr;21(8).
153. Yi M, Xu L, Jiao Y, Luo S, Li A, Wu K. The role of cancer-derived microRNAs in cancer immune escape. *J Hematol Oncol*. 2020 Mar;13(1):25.
154. Hiam-Galvez KJ, Allen BM, Spitzer MH. Systemic immunity in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2021 Jun;21(6):345–59.

155. Masopust D, Schenkel JM. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol*. 2013 May;13(5):309–20.
156. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep*. 2015 Feb;10(4):562–73.
157. Saraiva DP, Correia BF, Salvador R, de Sousa N, Jacinto A, Braga S, et al. Circulating low density neutrophils of breast cancer patients are associated with their worse prognosis due to the impairment of T cell responses. *Oncotarget*. 2021 Nov;12(24):2388–403.
158. Corbeau I, Jacot W, Guiu S. Neutrophil to Lymphocyte Ratio as Prognostic and Predictive Factor in Breast Cancer Patients: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2020 Apr;12(4).
159. Qian Y, Tao J, Li X, Chen H, Lu Q, Yang J, et al. Peripheral inflammation/immune indicators of chemosensitivity and prognosis in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Onco Targets Ther*. 2018;11:1423–32.
160. Cihan YB, Arslan A, Cetindag MF, Mutlu H. Lack of prognostic value of blood parameters in patients receiving adjuvant radiotherapy for breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(10):4225–31.
161. Cho U, Park HS, Im SY, Yoo CY, Jung JH, Suh YJ, et al. Prognostic value of systemic inflammatory markers and development of a nomogram in breast cancer. *PLoS One*. 2018;13(7):e0200936.
162. Marín Hernández C, Piñero Madrona A, Gil Vázquez PJ, Galindo Fernández PJ, Ruiz Merino G, Alonso Romero JL, et al. Usefulness of lymphocyte-to-monocyte, neutrophil-to-monocyte and neutrophil-to-lymphocyte ratios as prognostic markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Spanish Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. 2018 Apr;20(4):476–83.
163. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol*. 2014 Oct;15(11):e493-503.
164. Manuel M, Tredan O, Bachelot T, Clapisson G, Courtier A, Parmentier G, et al. Lymphopenia combined with low TCR diversity (divpenia) predicts poor overall survival in metastatic breast cancer patients. *Oncoimmunology*. 2012 Jul;1(4):432–40.
165. Verronèse E, Delgado A, Valladeau-Guilemond J, Garin G, Guillemaut S, Tredan O, et al. Immune cell dysfunctions in breast cancer patients detected through whole blood multiparametric flow cytometry assay. *Oncoimmunology*. 2016 Mar;5(3):e1100791.
166. Wang L, Simons DL, Lu X, Tu TY, Solomon S, Wang R, et al. Connecting blood and intratumoral T(reg) cell activity in predicting future relapse in breast cancer. *Nat Immunol*. 2019 Sep;20(9):1220–30.
167. Yuen GJ, Demissie E, Pillai S. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends in cancer*. 2016 Dec;2(12):747–57.
168. Mamessier E, Sylvain A, Thibult M-L, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest*. 2011 Sep;121(9):3609–22.

169. Vicente Conesa MA, Garcia-Martinez E, Gonzalez Billalabeitia E, Chaves Benito A, Garcia Garcia T, Vicente Garcia V, et al. Predictive value of peripheral blood lymphocyte count in breast cancer patients treated with primary chemotherapy. *Breast*. 2012 Aug;21(4):468–74.
170. Fujimoto Y, Ozawa H, Higuchi T, Miyagawa Y, Bun A, Imamura M, et al. Improved prognosis of low baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio is significantly exclusive in breast cancer patients with high absolute counts of lymphocytes. *Mol Clin Oncol*. 2019 Feb;10(2):275–84.
171. Araki K, Ito Y, Fukada I, Kobayashi K, Miyagawa Y, Imamura M, et al. Predictive impact of absolute lymphocyte counts for progression-free survival in human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced breast cancer treated with pertuzumab and trastuzumab plus eribulin or nab-paclitaxel. *BMC Cancer*. 2018 Oct;18(1):982.
172. Vernieri C, Mennitto A, Prisciandaro M, Huber V, Milano M, Rinaldi L, et al. The neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios predict efficacy of platinum-based chemotherapy in patients with metastatic triple negative breast cancer. *Sci Rep*. 2018 Jun;8(1):8703.
173. Cupp MA, Cariolou M, Tzoulaki I, Aune D, Evangelou E, Berlanga-Taylor AJ. Neutrophil to lymphocyte ratio and cancer prognosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies. *BMC Med*. 2020 Nov;18(1):360.
174. Iwase T, Sangai T, Sakakibara M, Sakakibara J, Ishigami E, Hayama S, et al. An increased neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts poorer survival following recurrence for patients with breast cancer. *Mol Clin Oncol*. 2017 Feb;6(2):266–70.
175. Iimori N, Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Takada K, Takahashi K, et al. Clinical Significance of the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Endocrine Therapy for Stage IV Breast Cancer. *In Vivo*. 2018;32(3):669–75.
176. Ivars Rubio A, Yufera JC, de la Morena P, Fernández Sánchez A, Navarro Manzano E, García Garre E, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio in metastatic breast cancer is not an independent predictor of survival, but depends on other variables. *Sci Rep*. 2019 Nov;9(1):16979.
177. Azab B, Shah N, Radbel J, Tan P, Bhatt V, Vonfrolio S, et al. Pretreatment neutrophil/lymphocyte ratio is superior to platelet/lymphocyte ratio as a predictor of long-term mortality in breast cancer patients. *Med Oncol*. 2013 Mar;30(1):432.
178. Chen Y, Chen K, Xiao X, Nie Y, Qu S, Gong C, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is correlated with response to neoadjuvant chemotherapy as an independent prognostic indicator in breast cancer patients: a retrospective study. *BMC Cancer*. 2016 May;16:320.
179. Chae S, Kang KM, Kim HJ, Kang E, Park SY, Kim JH, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio predicts response to chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Curr Oncol*. 2018 Apr;25(2):e113–9.
180. Suppan C, Bjelic-Radisic V, La Garde M, Groselj-Strele A, Eberhard K, Samonigg H, et al. Neutrophil/Lymphocyte ratio has no predictive or prognostic value in breast cancer patients undergoing preoperative systemic therapy. *BMC Cancer*. 2015 Dec;15:1027.

181. Eryilmaz MK, Mutlu H, Salim DK, Musri FY, Tural D, Coskun HS. The neutrophil to lymphocyte ratio has a high negative predictive value for pathologic complete response in locally advanced breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(18):7737–40.
182. Koh YW, Lee HJ, Ahn J-H, Lee JW, Gong G. Prognostic significance of the ratio of absolute neutrophil to lymphocyte counts for breast cancer patients with ER/PR-positivity and HER2-negativity in neoadjuvant setting. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2014 Oct;35(10):9823–30.
183. Asano Y, Kashiwagi S, Onoda N, Noda S, Kawajiri H, Takashima T, et al. Predictive Value of Neutrophil/Lymphocyte Ratio for Efficacy of Preoperative Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2016 Apr;23(4):1104–10.
184. Ocaña A, Chacón JI, Calvo L, Antón A, Mansutti M, Albanell J, et al. Derived Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Front Oncol.* 2021;11:827625.
185. Zhang M, Huang X-Z, Song Y-X, Gao P, Sun J-X, Wang Z-N. High Platelet-to-Lymphocyte Ratio Predicts Poor Prognosis and Clinicopathological Characteristics in Patients with Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9503025.
186. Ramos-Esquivel A, Rodriguez-Porras L, Porras J. Neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio as prognostic factors in non-metastatic breast cancer patients from a Hispanic population. *Breast Dis.* 2017;37(1):1–6.
187. Imamura M, Morimoto T, Egawa C, Fukui R, Bun A, Ozawa H, et al. Significance of baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio for progression-free survival of patients with HER2-positive breast cancer treated with trastuzumab emtansine. *Sci Rep.* 2019 Feb;9(1):1811.
188. Asano Y, Kashiwagi S, Onoda N, Noda S, Kawajiri H, Takashima T, et al. Platelet-Lymphocyte Ratio as a Useful Predictor of the Therapeutic Effect of Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *PLoS One.* 2016;11(7):e0153459.
189. Hu Y, Wang S, Ding N, Li N, Huang J, Xiao Z. Platelet/Lymphocyte Ratio Is Superior to Neutrophil/Lymphocyte Ratio as a Predictor of Chemotherapy Response and Disease-free Survival in Luminal B-like (HER2(-)) Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2020 Aug;20(4):e403–9.
190. Lusho S, Durando X, Mouret-Reynier M-A, Kossai M, Lacrampe N, Molnar I, et al. Platelet-to-Lymphocyte Ratio Is Associated With Favorable Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Triple Negative Breast Cancer: A Study on 120 Patients. *Front Oncol.* 2021;11:678315.
191. Graziano V, Grassadonia A, Iezzi L, Vici P, Pizzuti L, Barba M, et al. Combination of peripheral neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio is predictive of pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast.* 2019 Apr;44:33–8.
192. Kawaguchi K, Sakurai M, Yamamoto Y, Suzuki E, Tsuda M, Kataoka TR, et al. Alteration of specific cytokine expression patterns in patients with breast cancer. *Sci Rep.* 2019 Feb;9(1):2924.

193. Gonda K, Shibata M, Ohtake T, Matsumoto Y, Tachibana K, Abe N, et al. Myeloid-derived suppressor cells are increased and correlated with type 2 immune responses, malnutrition, inflammation, and poor prognosis in patients with breast cancer. *Oncol Lett.* 2017 Aug;14(2):1766–74.
194. Cierna Z, Smolkova B, Cholujoval D, Gronesova P, Miklikova S, Cihova M, et al. Decreased levels of circulating cytokines VEGF, TNF- $\beta$  and IL-15 indicate PD-L1 overexpression in tumours of primary breast cancer patients. *Sci Rep.* 2021 Jan;11(1):1294.
195. Inoue N, Li W, Fujimoto Y, Matsushita Y, Katagiri T, Okamura H, et al. High Serum Levels of Interleukin-18 Are Associated With Worse Outcomes in Patients With Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2019 Sep;39(9):5009–18.
196. Lozito TP, Tuan RS. Endothelial and cancer cells interact with mesenchymal stem cells via both microparticles and secreted factors. *J Cell Mol Med.* 2014 Dec;18(12):2372–84.
197. García Garre E, Luengo Gil G, Montoro García S, Gonzalez Billalabeitia E, Zafra Poves M, García Martínez E, et al. Circulating small-sized endothelial microparticles as predictors of clinical outcome after chemotherapy for breast cancer: an exploratory analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 May;169(1):83–92.
198. Giordano C, La Camera G, Gelsomino L, Barone I, Bonofiglio D, Andò S, et al. The Biology of Exosomes in Breast Cancer Progression: Dissemination, Immune Evasion and Metastatic Colonization. *Cancers (Basel).* 2020 Aug;12(8).
199. Liu C, Yu S, Zinn K, Wang J, Zhang L, Jia Y, et al. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol.* 2006 Feb;176(3):1375–85.
200. Wen SW, Sceneay J, Lima LG, Wong CSF, Becker M, Krumeich S, et al. The Biodistribution and Immune Suppressive Effects of Breast Cancer-Derived Exosomes. *Cancer Res.* 2016 Dec;76(23):6816–27.
201. Rong L, Li R, Li S, Luo R. Immunosuppression of breast cancer cells mediated by transforming growth factor- $\beta$  in exosomes from cancer cells. *Oncol Lett.* 2016 Jan;11(1):500–4.
202. McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol.* 2014 Aug;16(8):717–27.
203. Wu W-C, Sun H-W, Chen H-T, Liang J, Yu X-J, Wu C, et al. Circulating hematopoietic stem and progenitor cells are myeloid-biased in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Mar;111(11):4221–6.
204. Kersten K, Coffelt SB, Hoogstraat M, Verstegen NJM, Vrijland K, Ciampricotti M, et al. Mammary tumor-derived CCL2 enhances pro-metastatic systemic inflammation through upregulation of IL1 $\beta$  in tumor-associated macrophages. *Oncoimmunology.* 2017;6(8):e1334744.
205. Meyer MA, Baer JM, Knolhoff BL, Nywening TM, Panni RZ, Su X, et al. Breast and pancreatic cancer interrupt IRF8-dependent dendritic cell development to overcome immune surveillance. *Nat Commun.* 2018 Mar;9(1):1250.
206. Della Bella S, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, Riva A, et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 2003 Oct;89(8):1463–72.

207. Lau J, Cheung J, Navarro A, Lianoglou S, Haley B, Totpal K, et al. Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice. *Nat Commun.* 2017 Feb;8:14572.
208. Strauss L, Mahmoud MAA, Weaver JD, Tijaro-Ovalle NM, Christofides A, Wang Q, et al. Targeted deletion of PD-1 in myeloid cells induces antitumor immunity. *Sci Immunol.* 2020 Jan;5(43).
209. Valdés-Ferrada J, Muñoz-Durango N, Pérez-Sepulveda A, Muñoz S, Coronado-Arrázola I, Acevedo F, et al. Peripheral Blood Classical Monocytes and Plasma Interleukin 10 Are Associated to Neoadjuvant Chemotherapy Response in Breast Cancer Patients. *Front Immunol.* 2020;11:1413.
210. Axelrod ML, Nixon MJ, Gonzalez-Ericsson PI, Bergman RE, Pilkinton MA, McDonnell WJ, et al. Changes in Peripheral and Local Tumor Immunity after Neoadjuvant Chemotherapy Reshape Clinical Outcomes in Patients with Breast Cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2020 Nov;26(21):5668–81.
211. Polley M-YC, Leon-Ferre RA, Leung S, Cheng A, Gao D, Sinnwell J, et al. A clinical calculator to predict disease outcomes in women with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2021 Feb;185(3):557–66.
212. Van Berckelaer C, Van Geyt M, Linders S, Rypens C, Trinh XB, Tjalma WAA, et al. A high neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio are associated with a worse outcome in inflammatory breast cancer. *Breast.* 2020 Oct;53:212–20.
213. Pang J, Zhou H, Dong X, Wang S, Xiao Z. Relationship Between the Neutrophil to Lymphocyte Ratio, Stromal Tumor-infiltrating Lymphocytes, and the Prognosis and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2021 Dec;21(6):e681–7.
214. Lee KH, Kim EY, Yun JS, Park YL, Do S-I, Chae SW, et al. The prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes and hematologic parameters in patients with breast cancer. *BMC Cancer.* 2018 Oct;18(1):938.
215. Dong X, Liu C, Yuan J, Wang S, Ding N, Li Y, et al. Prognostic Roles of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Relationship in Locally Advanced Triple-Negative Breast Cancer Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. *Breast Care (Basel).* 2021 Aug;16(4):328–34.
216. Livingston-Rosanoff D, Schumacher J, Vande Walle K, Stankowski-Drengler T, Greenberg CC, Neuman H, et al. Does Tumor Size Predict Response to Neoadjuvant Chemotherapy in the Modern Era of Biologically Driven Treatment? A Nationwide Study of US Breast Cancer Patients. *Clin Breast Cancer.* 2019 Dec;19(6):e741–7.
217. Myers SP, Ahrendt GM, Lee JS, Steiman JG, Soran A, Johnson RR, et al. Association of Tumor Molecular Subtype and Stage with Breast and Axillary Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2021 Dec;28(13):8636–42.
218. Kantor O, Sipsy LM, Yao K, James TA. A Predictive Model for Axillary Node Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2018 May;25(5):1304–11.

219. Tao M, Chen S, Zhang X, Zhou Q. Ki-67 labeling index is a predictive marker for a pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Dec;96(51):e9384.
220. Al-Saleh K, Abd El-Aziz N, Ali A, Abo Zeed W, Salah T, Elsamany S, et al. A Multicenter Study of the Impact of Body Mass Index (BMI) on the incidence of Pathologic Complete Response (pCR) Among Saudi Patients with locally advanced Breast cancer (LABC) post Neoadjuvant Chemotherapy (NAC). *Gulf J Oncolog*. 2019 May;1(30):33–42.
221. Van Bockstal MR, Noel F, Guiot Y, Duhoux FP, Mazzeo F, Van Marcke C, et al. Predictive markers for pathological complete response after neo-adjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Ann Diagn Pathol*. 2020 Dec;49:151634.
222. Basmadjian RB, Kong S, Boyne DJ, Jarada TN, Xu Y, Cheung WY, et al. Developing a Prediction Model for Pathologic Complete Response Following Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Comparison of Model Building Approaches. *JCO Clin cancer informatics*. 2022 Feb;6:e2100055.
223. Pardo JA, Fan B, Mele A, Serres S, Valero MG, Emhoff I, et al. The Role of Oncotype DX<sup>®</sup> Recurrence Score in Predicting Axillary Response After Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2021 Mar;28(3):1320–5.
224. Liang X, Yu X, Gao T. Machine learning with magnetic resonance imaging for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Radiol*. 2022 May;150:110247.
225. Tian F, Shen G, Deng Y, Diao W, Jia Z. The accuracy of (18)F-FDG PET/CT in predicting the pathological response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer: a meta-analysis and systematic review. *Eur Radiol*. 2017 Nov;27(11):4786–96.
226. Zhu J, Jiao D, Yan M, Chen X, Wang C, Lu Z, et al. Establishment and Verification of a Predictive Model for Node Pathological Complete Response After Neoadjuvant Chemotherapy for Initial Node Positive Early Breast Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:675070.
227. Li X, Wang M, Wang M, Yu X, Guo J, Sun T, et al. Predictive and Prognostic Roles of Pathological Indicators for Patients with Breast Cancer on Neoadjuvant Chemotherapy. *J Breast Cancer*. 2019 Dec;22(4):497–521.
228. Bossuyt V, Provenzano E, Symmans WF, Boughey JC, Coles C, Curigliano G, et al. Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2015 Jul;26(7):1280–91.
229. Spring LM, Fell G, Arfe A, Sharma C, Greenup R, Reynolds KL, et al. Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2020 Jun;26(12):2838–48.
230. Tanioka M, Shimizu C, Yonemori K, Yoshimura K, Tamura K, Kouno T, et al. Predictors of recurrence in breast cancer patients with a pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy. *Br J Cancer*. 2010 Jul;103(3):297–302.

231. Asaoka M, Narui K, Suganuma N, Chishima T, Yamada A, Sugae S, et al. Clinical and pathological predictors of recurrence in breast cancer patients achieving pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. 2019 Dec;45(12):2289–94.
232. Huober J, Schneeweiss A, Blohmer J-U, Denkert C, Tesch H, Hanusch CA, et al. Abstract P2-08-01: Factors predicting relapse in early breast cancer patients with a pathological complete response after neoadjuvant therapy – Results of a pooled analysis based on the GBG meta-database. *Cancer Res*. 2019 Feb 15;79(4\_Supplement):P2-08-01-P2-08-01.
233. Weiss A, Bashour SI, Hess K, Thompson AM, Ibrahim NK. Effect of neoadjuvant chemotherapy regimen on relapse-free survival among patients with breast cancer achieving a pathologic complete response: an early step in the de-escalation of neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2018 Apr;20(1):27.
234. Bruzas S, Gluz O, Harbeck N, Schmid P, Cortés J, Blohmer J, et al. Gene signatures in patients with early breast cancer and relapse despite pathologic complete response. *NPI breast cancer*. 2022 Mar;8(1):42.
235. 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Oct;25(28):4414–22.
236. Peintinger F, Sinn B, Hatzis C, Albarracin C, Downs-Kelly E, Morkowski J, et al. Reproducibility of residual cancer burden for prognostic assessment of breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc*. 2015 Jul;28(7):913–20.
237. Sammut S-J, Crispin-Ortuzar M, Chin S-F, Provenzano E, Bardwell HA, Ma W, et al. Multi-omic machine learning predictor of breast cancer therapy response. *Nature*. 2022 Jan;601(7894):623–9.
238. Gonzalez-Ericsson PI, Stovgaard ES, Sua LF, Reisenbichler E, Kos Z, Carter JM, et al. The path to a better biomarker: application of a risk management framework for the implementation of PD-L1 and TILs as immuno-oncology biomarkers in breast cancer clinical trials and daily practice. *J Pathol*. 2020 Apr;250(5):667–84.
239. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Hatano T, et al. Prediction of survival after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer by evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden. *BMC Cancer*. 2017 Dec;17(1):888.
240. Hwang HW, Jung H, Hyeon J, Park YH, Ahn JS, Im Y-H, et al. A nomogram to predict pathologic complete response (pCR) and the value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2019 Jan;173(2):255–66.
241. Şahin AB, Cubukcu E, Ocak B, Deligonul A, Oyucu Orhan S, Tolunay S, et al. Low pan-immune-inflammation-value predicts better chemotherapy response and survival in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Sci Rep*. 2021 Jul;11(1):14662.
242. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2018 Jul;36(20):2105–22.

243. von Minckwitz G, Huang C-S, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019 Feb;380(7):617–28.
244. Masuda N, Lee S-J, Ohtani S, Im Y-H, Lee E-S, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N Engl J Med*. 2017 Jun;376(22):2147–59.
245. Tolaney SM, Garrett-Mayer E, White J, Blinder VS, Foster JC, Amiri-Kordestani L, et al. Updated Standardized Definitions for Efficacy End Points (STEEP) in Adjuvant Breast Cancer Clinical Trials: STEEP Version 2.0. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2021 Aug;39(24):2720–31.
246. Klauber-DeMore N, Ollila DW, Moore DT, Livasy C, Calvo BF, Kim HJ, et al. Size of residual lymph node metastasis after neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer patients is prognostic. *Ann Surg Oncol*. 2006 May;13(5):685–91.
247. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science*. 2015 Apr;348(6230):56–61.
248. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol*. 2016 Oct;2(10):1354–60.
249. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother cancer*. 2016;4:59.
250. Sasaki R, Horimoto Y, Yanai Y, Kurisaki-Arakawa A, Arakawa A, Nakai K, et al. Molecular Characteristics of Lymphocyte-predominant Triple-negative Breast Cancer. *Anticancer Res*. 2021 Apr;41(4):2133–40.
251. Horimoto Y, Thinzar Hlaing M, Saeki H, Kitano S, Nakai K, Sasaki R, et al. Microsatellite instability and mismatch repair protein expressions in lymphocyte-predominant breast cancer. *Cancer Sci*. 2020 Jul;111(7):2647–54.
252. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2019 Mar;37(7):559–69.
253. Tille J-C, Vieira AF, Saint-Martin C, Djerroudi L, Furhmann L, Bidard F-C, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are associated with poor prognosis in invasive lobular breast carcinoma. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc*. 2020 Nov;33(11):2198–207.
254. Criscitiello C, Vingiani A, Maisonneuve P, Viale G, Viale G, Curigliano G. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2- breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2020 Sep;183(2):347–54.
255. Takada K, Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Morisaki T, Shibutani M, et al. Differences in tumor-infiltrating lymphocyte density and prognostic factors for breast cancer by patient age. *World J Surg Oncol*. 2022 Feb;20(1):38.
256. McLemore LE, Janakiram M, Albanese J, Shapiro N, Lo Y, Zang X, et al. An Immunoscore Using PD-L1, CD68, and Tumor-infiltrating Lymphocytes (TILs) to Predict Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Invasive Breast Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. 2018 Oct;26(9):611–9.

257. Ni Y, Tsang JY, Shao Y, Poon IK, Tam F, Shea K-H, et al. Combining Analysis of Tumor-infiltrating Lymphocytes (TIL) and PD-L1 Refined the Prognostication of Breast Cancer Subtypes. *Oncologist*. 2022 Apr;27(4):e313–27.
258. Tran WT, Lu F-I, Salgado R. Tumor infiltrating lymphocytes: current pathways to a standard biomarker in breast cancer. Vol. 21, *Expert review of anticancer therapy*. England; 2021. p. 1299–301.
259. Dan J, Tan J, Huang J, Zhang X, Guo Y, Huang Y, et al. The dynamic change of neutrophil to lymphocyte ratio is predictive of pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer*. 2020 Sep;27(5):982–8.
260. Grassadonia A, Graziano V, Iezzi L, Vici P, Barba M, Pizzuti L, et al. Prognostic Relevance of Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) in Luminal Breast Cancer: A Retrospective Analysis in the Neoadjuvant Setting. *Cells*. 2021 Jul;10(7).
261. Gago-Dominguez M, Matabuena M, Redondo CM, Patel SP, Carracedo A, Ponte SM, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and breast cancer risk: analysis by subtype and potential interactions. *Sci Rep*. 2020 Aug;10(1):13203.
262. Zhou Q, Dong J, Sun Q, Lu N, Pan Y, Han X. Role of neutrophil-to-lymphocyte ratio as a prognostic biomarker in patients with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy: a meta-analysis. *BMJ Open*. 2021 Sep;11(9):e047957.
263. Cullinane C, Creavin B, O’Leary DP, O’Sullivan MJ, Kelly L, Redmond HP, et al. Can the Neutrophil to Lymphocyte Ratio Predict Complete Pathologic Response to Neoadjuvant Breast Cancer Treatment? A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Breast Cancer*. 2020 Dec;20(6):e675–81.