



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

**Evaluación de los Cambios en la Respuesta
Linfocitaria en el Microambiente Tumoral como Factor
Pronóstico y Predictivo de Respuesta a la
Quimioterapia Neoadyuvante del Cáncer de Mama**

D^a. M^a Elena García Martínez

2013

Evaluación de los cambios en la respuesta linfocitaria en el microambiente tumoral como factor pronóstico y predictivo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante del cáncer de mama.

FINANCIACIÓN

Beca Ana Balil- 2011

GEICAM (Grupo Español Cáncer de Mama)

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos:

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

En primer lugar a mi director de tesis el Dr Francisco Ayala de la Peña. Gracias por darme la oportunidad de profundizar en el estudio de tan apasionante materia. Gracias por guiarme en todo el camino, por hacer que aprendiera estadística y otras cosas que no sabía. Gracias por decir siempre lo que piensas, por el boli rojo y sobre todo gracias por creer que yo podía hacerlo.

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

A Ginés Luengo por su inestimable contribución y apoyo.

Al S^o de Análisis de imagen de la Universidad de Murcia (Dra. F. Sáez - Belmonte) por su colaboración en el desarrollo de algoritmos de análisis de imagen para el análisis de la infiltración linfoide.

A Dña. Lorena Velázquez por su trabajo técnico en la realización de cortes histológicos para este estudio.

Al Biobanco del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Dña. Rosario Martínez) por su ayuda en la realización de cortes histológicos y tinciones inmunohistoquímicas.

Al S^o de Histología del CNIO por la realización del microarray de tejidos.

A la Dra Asunción Chaves por facilitarnos las muestras de las pacientes.

En tercer lugar quiero agradecer a GEICAM (Grupo Español Cáncer de Mama) su apoyo en este trabajo mediante la concesión de la Beca Ana Balil.

En cuarto lugar con todo mi cariño agradezco la ayuda que mis compañeras y amigas, la Dra M^a Luz Amigo y la Dra Cristina Castilla me han dado en este tiempo. Por animarme en los momentos de flaqueza, por compartir su tiempo conmigo para ensayar las charlas que este trabajo ha generado durante su desarrollo y por sus sabios consejos. Gracias chicas.

En quinto lugar agradezco a la Dra Ana Lluch su ilusión y apoyo que ha demostrado en todo momento por este proyecto y a la Dra Teresa García su ayuda para ponerlo en marcha.

En sexto lugar doy las gracias a todos mis compañeros del servicio por comprender esos malos días que de vez en cuando he tenido. Y a nuestro jefe el Profesor Vicente Vicente.

Por último y no por ello menos importante doy a las gracias a las PACIENTES, que todos los días nos dan una lección de valentía y humanidad, nos dan la energía para seguir con nuestro trabajo asistencial y nos despiertan la inquietud investigadora para poder ofrecer mejores tratamientos.

Esta tesis está dedicada a mis padres, a mi hermana y a Santiago

Gracias por velar todos mis sueños y ayudarme a que se vayan haciendo realidad.

ÍNDICE

Índice

Introducción	5
1. Fundamentos del tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama	9
2. Bases de la clasificación molecular y la clasificación inmunohistoquímica del cáncer de mama	15
3. Fundamentos para el estudio del valor pronóstico biológico de la infiltración linfocitaria tumoral en el tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama.....	21
3.1. La respuesta inmune en el microambiente tumoral	21
3.2. Infiltración linfocitaria en cáncer de mama.....	26
3.3. Valor pronóstico de subpoblaciones linfocitarias y subtipo tumoral	30
3.4. Relación del infiltrado linfocitario tumoral (TIL) y firmas génicas del cáncer de mama.....	32
3.5. Relación de TIL y respuesta a la quimioterapia	33
Hipótesis y objetivos del estudio	37
Material y métodos	41
1. Descripción de la población a estudio	44
2. Diseño del estudio.....	46
3. Estudio de la infiltración linfocitaria	51
4. Análisis estadístico de los datos	51
Resultados	53
1. Estudio descriptivo de la serie	57
1.1. Estudio descriptivo de las características tumorales.....	57
1.2. Estudio del valor predictivo de respuesta de las características tumorales	61
1.3. Estudio del valor pronóstico de las características tumorales	62
1.4. Conclusiones del estudio de las características tumorales	65
2. Estudio de la infiltración linfocitaria basal	67
2.1. Estudio descriptivo de la infiltración linfocitaria basal.....	67
2.2. Estudio del valor predictivo de respuesta de la infiltración linfocitaria basal	69
2.3. Estudio del valor pronóstico de la infiltración linfocitaria basal	73
2.4. Conclusiones del estudio de la infiltración linfocitaria basal	76
3. Estudio de la variación de la infiltración linfocitaria con la quimioterapia.....	79
3.1. Estudio descriptivo de la variación de la infiltración linfocitaria con la quimioterapia	79
3.2. Estudio del valor predictivo de respuesta de la variación de la infiltración linfocitaria con la quimioterapia	80
3.3. Estudio del valor pronóstico de la variación de la infiltración linfocitaria con la quimioterapia	84
3.4. Conclusiones del estudio de la variación de la infiltración linfocitaria con la quimioterapia	85
4. Estudio de la infiltración linfocitaria tras la quimioterapia	87
4.1. Estudio descriptivo de la infiltración linfocitaria tras la quimioterapia	87
4.2. Estudio del valor pronóstico de la infiltración linfocitaria tras la quimioterapia	90
4.3. Conclusiones del estudio de la infiltración linfocitaria tras la quimioterapia	93
Discusión	95
1. Factores predictivos de respuesta y pronósticos dependientes del tumor.....	99
2. Factores predictivos de respuesta y pronósticos dependientes de la infiltración linfocitaria	101
2.1 Determinación de la infiltración linfocitaria basal	101
2.2 Infiltración linfocitaria elevada inicial como marcador de buen pronóstico y marcador de respuesta.....	102
2.3 Variación inducida por la quimioterapia en la población linfocitaria con la respuesta al tratamiento como factor pronóstico y predictivo de respuesta	105
2.4 Análisis de la relevancia pronóstica del infiltrado linfocitario en el tumor residual..	106
2.5 Perspectivas de futuro. Implicaciones clínicas y terapéuticas	107

Conclusiones	109
Anexo. Publicaciones	113
1. García-Martínez E, Luengo G, Chaves Benito A, García García T, Vicente AM, Zafra M, García Garre E, Vicente, V, Ayala de la Peña F.. Baseline CD4/CD8 tumor infiltrating lymphocytes (TIL) ratio predicts pathologic response to neoadjuvant chemotherapy (NC)in breast cancer. Clin Cancer Research 2012;72 (24 Suppl): P3-06-15	115
2. Elena Garcia-Martinez, Gines Luengo-Gil, Asuncion Chaves, Lorena Velazquez Enrique Gonzalez-Billalabeitia, Maria Angeles Vicente-Conesa, Teresa Garcia, Elisa Garcia-Garre, Vicente Vicente, Francisco Ayala; Predictive value of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) for response to breast cancer to neoadjuvant chemotherapy (NC)in breast cancer. J Clin Oncol 2013; 31 (Suppl) ID 585	117
Bibliografía	119

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Fundamentos del tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama.
2. Bases de la clasificación molecular y la clasificación inmunohistoquímica del cáncer de mama.
3. Fundamentos para el estudio del valor pronóstico biológico de la infiltración linfocitaria tumoral en el tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama.
 - 3.1. La respuesta inmune en el microambiente tumoral.
 - 3.2. Infiltración linfocitaria en cáncer de mama.
 - 3.3. Valor pronóstico de subpoblaciones linfocitarias y subtipo tumoral.
 - 3.4. Relación del infiltrado linfocitario tumoral (TIL) y firmas génicas del cáncer de mama
 - 3.5. Relación de TIL y respuesta a la quimioterapia

1. FUNDAMENTOS DEL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE DEL CÁNCER DE MAMA.

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en la mujer, siendo la segunda causa de muerte por cáncer, tras el cáncer de pulmón. Se estima que en EEUU en el 2012 se diagnosticarían 1,638,910 de casos nuevos y habrá 577,190 muertes por cáncer de mama¹. La incidencia de cáncer de mama en España ha aumentado en los últimos años debido a la eficacia de los programas de screening, y se estima que en el 2012 habrá unos 27000 casos nuevos de cáncer de mama. Sin embargo, la mortalidad por cáncer de mama está disminuyendo: se estima que en el 2012 habrá unas 6200 muertes². Esta disminución en la tasa de mortalidad es debida a los diagnósticos precoces, así como a los avances en los tratamientos del cáncer de mama; se calcula una disminución de un 1,8% anual de 1997 a 2006. El descenso en la mortalidad es más patente en mujeres jóvenes y de mediana edad que en pacientes mayores³.

Se han descrito diversos factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama: ser mujer (el riesgo aumenta con la edad), edad precoz de menarquía, menopausia tardía, edad avanzada en el primer embarazo, tratamiento hormonal sustitutivo prolongado, enfermedades proliferativas benignas de la mama, aumento de densidad mamaria en la mamografía y mutaciones de los genes BRCA 1/2. A pesar de ello, sólo una minoría de los cánceres de mama diagnosticados se asocia a estos factores de riesgo.

La cirugía es el tratamiento de elección en el cáncer de mama precoz. En estadios I-II se ha demostrado que la cirugía conservadora y linfadenectomía seguida de radioterapia (RT) adyuvante es equivalente a la mastectomía radical^{4,5}. En los últimos años la realización de la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama NO clínico reduce las complicaciones de la linfadenectomía, siendo equivalente a ésta en términos de efectividad⁶. Recientemente se ha demostrado que no es necesaria la realización de linfadenectomía en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama cT1/T2, con BSGC positiva, sometidas a cirugía conservadora y RT adyuvante⁷.

El tratamiento adyuvante del cáncer de mama ha demostrado ser eficaz para reducir las recaídas locales y sistémicas de la enfermedad. Dicho tratamiento debe ser individualizado según los diferentes factores pronósticos; edad de la paciente, número de ganglios afectos, hormonosensibilidad, sobreexpresión de Her2neu, grado de diferenciación tumoral, afectación linfovascular, y proliferación (Ki67). Existen nomogramas que predicen el riesgo de recaída y programas como Adjuvant-online, que nos informa del riesgo de recaída y reducción del mismo según las diferentes opciones de tratamiento⁸. La clasificación del cáncer de mama según su perfil de expresión génica puede ser muy útil para la toma de decisiones en la adyuvancia del cáncer de mama, más aún cuando estén finalizados los estudios prospectivos en marcha (TAYLORx Y RxPONDER).

La administración de quimioterapia neoadyuvante (QTn) o preoperatoria en el cáncer de mama, es una opción considerada estándar tanto en tumores localmente avanzados (estadios IIIA, IIIB, IIIC y tumores inflamatorios), como en tumores operables pero no susceptibles de cirugía conservadora inicialmente (Tabla 1). Se han aducido numerosas ventajas para esta modalidad de tratamiento: disminución del tamaño tumoral y aumento de la posibilidad de cirugía conservadora; infraestadificación tumoral y ganglionar, que es además un marcador predictivo de buena evolución posterior, y evaluación de la quimiosensibilidad tumoral. Además, el tratamiento sistémico precoz podría ser más efectivo para la erradicación precoz de las micrometástasis y así disminuir la posibilidad de diseminación de células tumorales al intervenir el tumor. Se ha estudiado la efectividad de la quimioterapia preoperatoria, encontrando tasas de respuesta clínica en torno al 75%, tasas de respuesta completa patológica (RCp) del 3 – 30% en el tumor primario y del 25 – 35% en la enfermedad ganglionar axilar⁹⁻¹³. En los tumores localmente avanzados, en casos seleccionados se puede plantear, según la respuesta objetivada tras el tratamiento QT, cirugía conservadora. En diferentes series las tasas de cirugía conservadora oscilan entre 5 y 25%. En las series más amplias el porcentaje de pacientes que se reconvierte de mastectomía a cirugía conservadora tras la QTn está en torno al 20-25%. Por otro lado en el cáncer de mama operable diversos

estudios han demostrado que la supervivencia libre de enfermedad, así como la supervivencia global, son equivalentes independientemente del manejo neoadyuvante o adyuvante del tumor.

Tabla 1. Indicaciones y contraindicaciones de QTn en Ca mama operable

Indicaciones de QTn	Contraindicaciones de QTn
T3 Infraestadificación Buenos resultados estéticos Asegurar márgenes negativos Tumor unicéntrico No existencia de CDIS extenso adyacente Proporción tamaño tumor/mama No alteración tejido conectivo	Tumor multicéntrico Extensas microcalcificaciones por toda la mama Enfermedades sistémicas con afectación del tejido conectivo (contraindican RT)

Es difícil establecer un esquema óptimo de QTn, pero, al igual que en la adyuvancia, parece claro que el uso de antraciclinas y la adición de taxanos, especialmente de forma secuencial (Tabla 2), produce un aumento significativo en el porcentaje de respuestas, en la tasa de RCp y, por tanto, en la cirugía conservadora^{14, 15}. En pacientes Her2 positivas, la adición del trastuzumab ha supuesto un incremento significativo en la tasa de respuestas patológicas de estos tumores¹⁶. Hoy en día existen estudios con resultados muy prometedores, que incluyen nuevas moléculas que bloquean la vía de Her2, así como otros tratamientos biológicos. En la tabla 3 se resumen los principales estudios en neoadyuvancia con tratamiento antiHer2.

Tabla 2. Taxanos en neoadyuvancia

Estudio	N	Régimen QT	RCp (%)	p
GBG-GEPARDUO ¹⁷	913	AT x4q2w AC x4 – Doc x4	11 22	0,001
GBG-GEPATRIO ^{18, 19}	2050	TAC x6 TAC x2 – NX x4		
AGO ²⁰	631	ET x4 Epi x3 – Tax x3q2w	10 18	0,03
MDACC ²¹	258	T x4 → FAC x4 Tw → FAC x4	14 29	0,01
NSABP B27 ¹⁴	2411	AC x4 AC x4 → QX → Doc x4 AC x4 → Doc x4	13 14 26	0,001
ECTO ²²	451	AT x4 → CMF x4	23	
ABERDEEN ²³	162	CVAP x8 CVAPx4 → Dx4	15 31	0,06
ACCOG ²⁴	632	AC x6 AD x6	24 21	0,61

AT: adriamicina-taxol, AC adriamicina-ciclofosfamida, Doc: docetaxel, TAC: taxotere-adriamicina-ciclofosfamida, NX: vinorelbina, T: taxol, Tw: taxol semanal, FAC: fluoracilo-adriamicina-ciclofosfamida, CMF: ciclofosfamida-metrotexate-fluoracilo, CVAP: D: docetaxel, AD: adriamicina-taxotere.

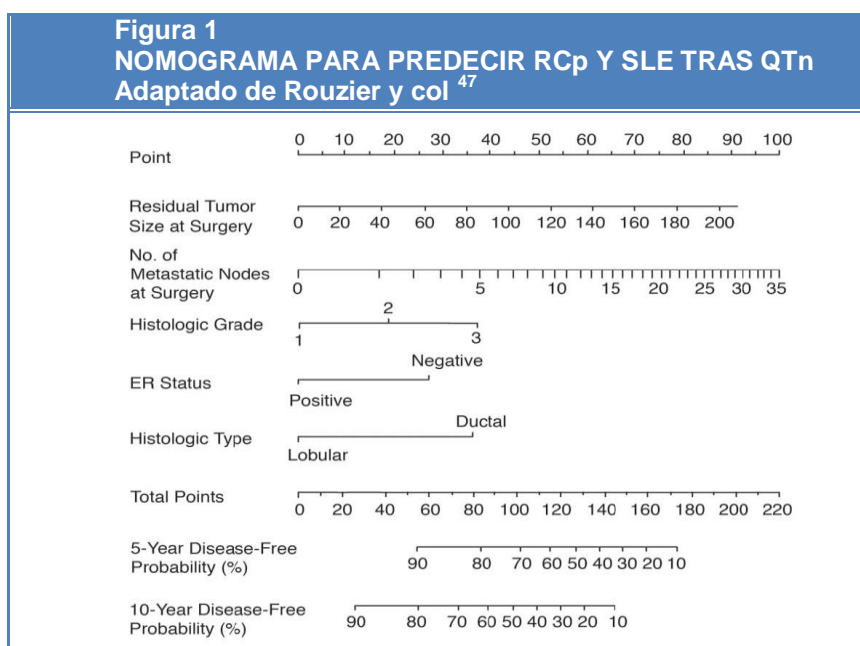
Se consideran factores predictivos clásicos de respuesta a la QTn²⁵⁻²⁷ el tamaño tumoral mayor de 3 cm, el tipo histológico ductal, el alto grado histológico y la no hormonosensibilidad. Además sabemos que el cáncer de mama tipo lobulillar, responde peor al tratamiento de QTn^{28, 29}.

Tabla 3. Tratamiento anti Her2 en neoadyuvancia			
Estudio	N	Esquema	RCp (%)
MDACC ³⁰	42	Taxol-FEC Taxol-FEC-T	26 65
NOAH ³¹	235	APx3 – Px4 – CMFx3 APx3 – Px4 – CMFx3 T	22 43
GEPARQUATRO ³²	445	EC- Docetaxel EC- Docetaxel-T	16 32
GEPARQUINTO ³³	620	ECT- Docetaxel-T ECL- Docetaxel-L	45 29
NEO ALTO ³⁴	455	Taxol-T Taxol-L Taxol-T-L	28 20 47
NEOSPHERE ³⁵	417	Docetaxel-T Docetaxel-T-P T-P Docetaxel-P	21 39 11 17
T: Trastuzumab; L: Lapatinib; P: Pertuzumab			

Desde el punto de vista pronóstico, los factores más importantes son la presencia de RCp, y en ausencia de ella el status axilar post-quimioterapia. La RCp es un marcador válido y precoz de largos supervivientes sin recaída ^{36, 37}. En la actualización de seguimiento de los estudios NSABP B18 y B27, se pone de manifiesto que la RCp es un factor predictivo significativo de aumento de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG): en el estudio NSABP B18 con seguimiento a 16 años, SLE HR=0.47, (p<0,001); SG HR=0.32, (p<0,001); en el NSABP B27, con seguimiento a 8 años, SLE HR=0.49, (p<0,001), SG HR=0.36, (p=0,0001) ³⁸. Algunos autores, según la definición de RCp más aceptada, la ausencia de carcinoma infiltrante residual en la pieza de la cirugía, consideran que la existencia o no de carcinoma ductal in situ residual post-tratamiento no influye en la supervivencia de la paciente ³⁹. Sin embargo, recientemente se ha publicado el análisis del impacto que tiene la RCp en la SLE y SG de las pacientes, según las diferentes definiciones de RCp, en un estudio que incluía 6377 pacientes incluidas en siete ensayos prospectivos en neoadyuvancia ⁴⁰. La conclusión del estudio fue que la definición de RCp como ypT0 ypN0 es la que mejor discrimina entre la evolución favorable y desfavorable de las pacientes; además el análisis que hicieron según los diferentes subtipos IHQ tumorales al diagnóstico revela la RCp como marcador subrogado de supervivencia en las pacientes no luminales. Por último, queda patente en este estudio que las pacientes que alcanzan RCp son las que tienen mejor supervivencia, independientemente del subtipo tumoral, mientras que las que no alcanzan RCp tienen una supervivencia acorde con el subtipo tumoral al diagnóstico. Por otro lado, al igual que la definición de RCp, es importante la medición de la enfermedad residual. Durante años la determinación del tumor residual utilizada fue la de Miller and Payne ⁴¹; otros sistemas de puntuación, como el estadio patológico de la AJCC del tumor residual se han utilizado en diversos estudios. Probablemente la determinación del *score* RCB (*residual cancer burden*) publicado por Symmans sea la mejor definición de enfermedad residual existente, ya que tiene en cuenta, aparte del tamaño de la enfermedad residual, la celularidad encontrada, así como la afectación ganglionar residual ⁴². Además demostraron que el RCB era un factor pronóstico independiente de SLE y que incluso este sistema de puntuación discriminaba subgrupos pronósticos dentro de los diferentes grupos de enfermedad residual según el estadio patológico de la AJCC.

El valor pronóstico del status axilar postquimioterapia se pone de manifiesto en el estudio de Budzar ⁴³, en el que se concluye que el número de ganglios positivos tras la

neoadyuvancia determina la SG a 5 años, de forma que la RCp a nivel axilar supone una SG a 5 años del 75%; 1 a 4 ganglios positivos residuales post QTn conlleva una SG a 5 años del 40-50%, y entre 5 y 10 ganglios positivos tras la QTn la SG a los 5 años disminuye al 30%. Chen⁴⁴ en su estudio determina el riesgo de recaída local tras cirugía conservadora, según la presencia ó ausencia de N2-3, tumor primario residual mayor 2 cm, presencia de multifocalidad o permeación vascular. Por otro lado sabemos que en función del estadio clínico al diagnóstico, el significado pronóstico de la RCp varía. En este sentido Jeruss y col publican una propuesta muy interesante de puntuación, que incluye datos clínicos al diagnóstico, datos biológicos y anatomopatológicos tras la QTn, y que permite estimar de forma más precisa el impacto real que la QTn tiene en el pronóstico de las pacientes⁴⁵. Este sistema de estadiaje clínico-biológico-patológico fue validado posteriormente por Mittendorf y col⁴⁶ en una serie de más de 800 pacientes, confirmando el valor pronóstico de este sistema. Rouzier y col en uno de sus trabajos proponen un nomograma, donde se establece la probabilidad de SLE a 5 y 10 años, según los resultados anatomopatológicos del tumor residual tras tratamiento QTn⁴⁷ (Figura 1).



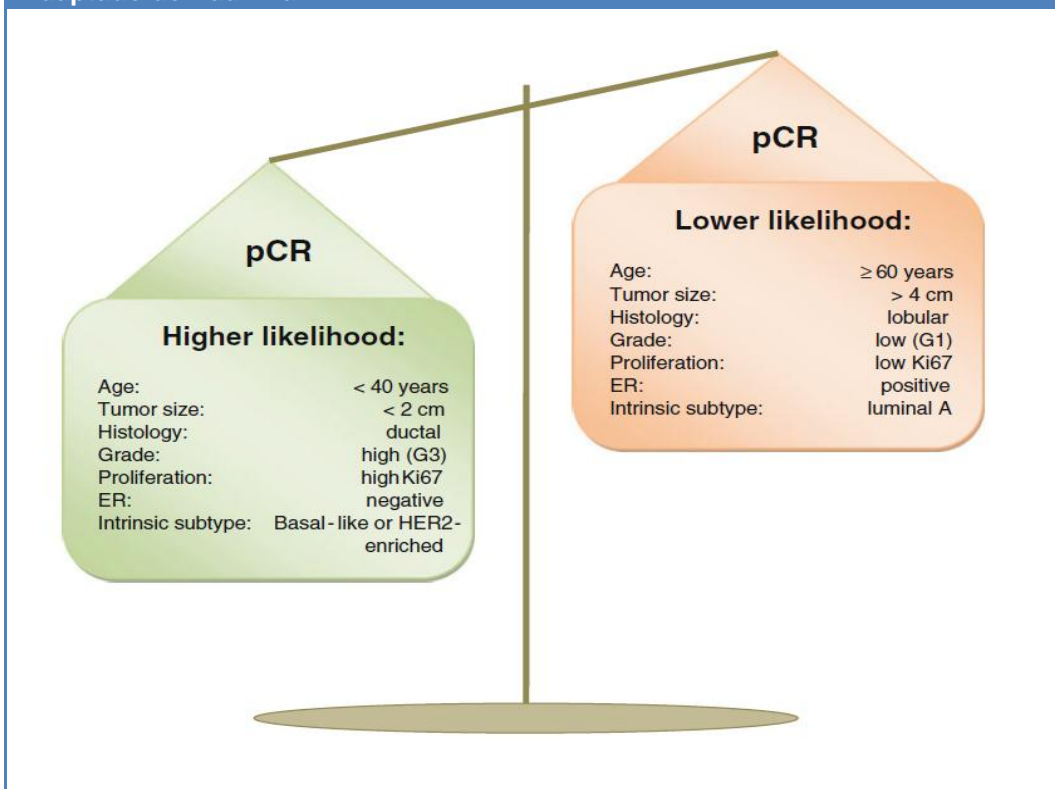
La QTn es también un modelo adecuado para valorar la sensibilidad de la neoplasia al tratamiento y para la búsqueda de marcadores biológicos predictivos de respuesta o con valor pronóstico⁴⁸. Además de los factores clásicos, la introducción reciente de las nuevas clasificaciones moleculares del cáncer de mama ha permitido establecer relaciones entre el subtipo biológico de la neoplasia (luminal, basal, Her2, normal) y la respuesta a la QTn^{49, 50}. Los problemas de accesibilidad y coste de los estudios de expresión génica han generado un interés reciente en la utilización de sistemas parecidos de clasificación basados en técnicas inmunohistoquímicas. La correlación de estas clasificaciones inmunohistoquímicas con la clasificación molecular es controvertida y su valor predictivo para la respuesta a la QTn no ha sido claramente establecido.

Los puntos claves del manejo neoadyuvante del cáncer de mama se han puesto de manifiesto en el último artículo de consenso publicado⁵¹. Entre otros puntos, se aclaran conceptos básicos como:

- El objetivo de la neoadyuvancia es el aumento de la supervivencia y el aumento de cirugías conservadoras
- Las pacientes candidatas a neoadyuvancia son las pacientes con tumores localmente avanzados y las pacientes con tumores quirúrgicos de entrada no susceptibles de cirugía conservadora al diagnóstico con mayor probabilidad de respuesta. En la figura 2 se muestra las pacientes con factores predictivos de respuesta.
- La definición de RCp es ypT0 ypN0.

- El estudio anatomopatológico del tumor residual óptimo tras la neoadyuvancia debería de ser el propuesto por Symmans con la determinación del RBC score: http://www.mdanderson.org/breastcancer_RCB).
- La RCp es un marcador subrogado de supervivencia, ya que las pacientes con RCp tras la QTn presentan mejor supervivencia que las pacientes que no alcanzan RCp, siendo en estas pacientes las características al diagnóstico el factor pronóstico relevante.
- Las pacientes deben ser estudiadas con ecografía, mamografía y RMN al diagnóstico y antes de la cirugía. En cada ciclo de QT debe hacerse una exploración física.
- Deben administrarse tratamiento con antraciclinas y taxanos, preferiblemente secuenciales durante seis meses, o concurrentes seis ciclos.
- Es imprescindible la colocación de un clip de marcaje antes del inicio de tratamiento de quimioterapia, en ausencia de indicación de mastectomía tras la QTn.
- La indicación de radioterapia adyuvante se establece según el estadio clínico y patológico. La radioterapia tras mastectomía debe de realizarse en caso de tumores inflamatorios y N+.
- Las pacientes hormonosensibles deberán recibir tratamiento hormonal adyuvante tras la cirugía. Las pacientes Her2 deberán completar tratamiento con terapia antiHer2 tras la cirugía.
- La quimioterapia adyuvante no está indicada fuera de ensayo clínico.

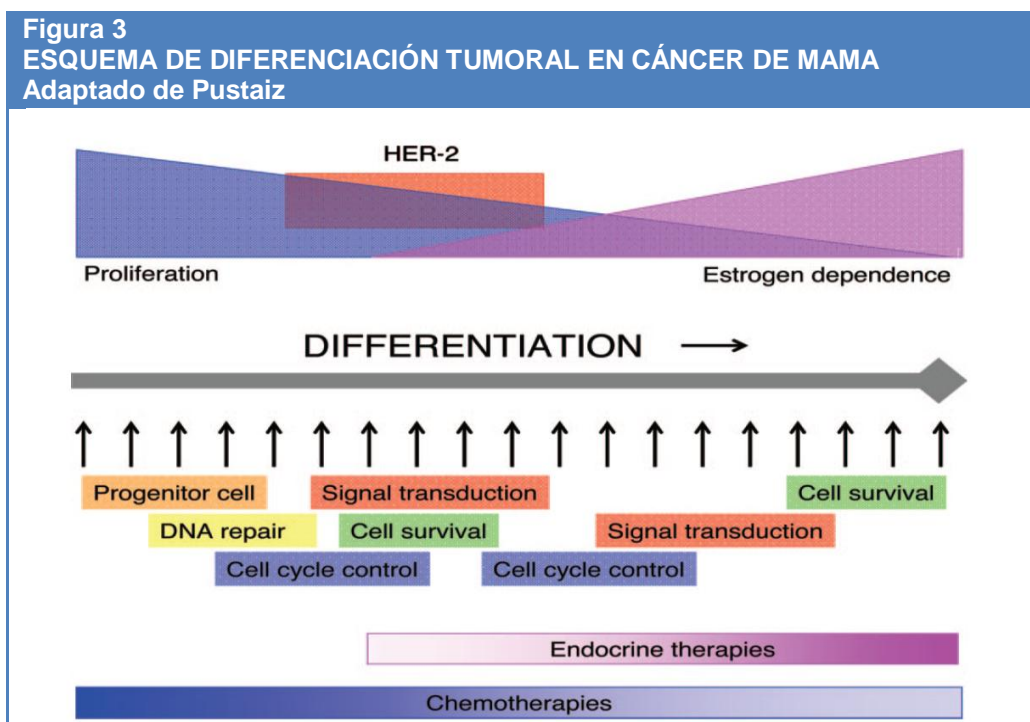
Figura 2.
FACTORES PREDICTIVOS DE RCp.
Adaptado de Kauffman ⁵¹.



El tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama es además el escenario ideal para intentar aclarar la relación existente entre el microambiente tumoral y el propio tumor. En los últimos años, junto a los factores relacionados con las células neoplásicas han cobrado un interés creciente las alteraciones del microambiente tumoral como determinantes de la progresión neoplásica y como factores predictivos de la respuesta al tratamiento con quimioterapia^{52, 53}. Entre los factores del microambiente que probablemente interactúen con la QT modulando su eficacia, la respuesta inmune antitumoral, determinada por el grado y tipo de infiltración linfocitaria del tumor, parece especialmente importante en el caso del cáncer de mama. Así, varias series clínicas han demostrado un mejor pronóstico de aquellos tumores con mayor número de linfocitos infiltrantes del tumor (TIL)⁵⁴⁻⁵⁶.

2. BASES DE LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR Y LA CLASIFICACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL CÁNCER DE MAMA.

La heterogeneidad clínica y anatomopatológica del cáncer de mama, que se traduce en diferencias en la sensibilidad a las distintas modalidades del tratamiento⁵⁷ (Figura 3), está siendo abordada en los últimos años con nuevas técnicas de biología molecular, que han dado lugar a la aparición de distintos sistemas de clasificación biológica y molecular.



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

Se han definido distintos perfiles de expresión génica o firmas génicas, que se han relacionado con el pronóstico o con la respuesta al tratamiento y que han sido validadas en series clínicas retrospectivas: Oncotype, 21 genes⁵⁸ Amsterdam signature, 70 genes⁵⁹ Rotterdam signature, 76 genes⁶⁰, y otras⁶¹. Sin embargo, tal vez el trabajo más relevante en este sentido sea el publicado por Perou⁶², que ha conducido a una nueva clasificación molecular del cáncer de mama en cuatro entidades: luminal (posteriormente subclassificado en luminal A y B), basal, HER2 positivo y normal. Estudios más recientes de clasificación en series más amplias y con la utilización de la plataforma PAM50, que podría facilitar la introducción de la clasificación molecular en el entorno clínico, hacen dudosa la existencia del grupo normal⁶³ y han introducido además un posible subtipo *claudin-low* de peor pronóstico^{64, 65}. Además los distintos perfiles de expresión génica o firmas génicas se han relacionado con el pronóstico o con la respuesta al tratamiento, siendo además, validadas en series clínicas (Oncotype, 21 genes⁵⁸; Amsterdam signature, 70 genes⁵⁹; Rotterdam signature, 76 genes⁶⁰; etc⁶¹). Cada

subtipo tiene unas características clínico-patológicas específicas ⁶⁶ (Tabla 4), así como diferente pronóstico y tanto esta clasificación como un sistema predictivo derivado de la misma y basado en un subgrupo con 50 genes han mostrado valor pronóstico, predictivo o ambos en pacientes tratadas con quimioterapia adyuvante o neoadyuvante ^{50, 67, 68}. En el 2012 se ha publicado los resultados del atlas genómico del cáncer de mama, donde se establece la existencia de cuatro subtipos de cáncer de mama (luminal A, luminal B, HER2NEU y basal) y se expone con detalle la heterogeneidad del cáncer de mama ⁶⁹ (Tabla 5).

Tabla 4
CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LOS SUBTIPOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA
Adaptado de Tang y col ⁶⁶

SUBTIPOS	Luminal	Her2	Basal
Características de la expresión génica	RE positivos Genes asociados a activación RE Citoqueratina 8/18	RE negativo Her2 positivo GRB7 (ERBB2) Genes proliferativos	RE negativo Her2 negativo CK 5,6,14,17 Genes proliferativos
Patología	G1-2	G2-3	G3
			Bordes rayados Alto índice mitótico Necrosis geográfica Asociación con tumores medulares y carcinoma metaplásico
IHQ	Luminal A RE +, RP+, HER2- Luminal B RE+, RP+, HER2+	RE-, RP-, HER2+	RE-, RP-, HER2-, CK5/6+ y/o EGFR+
Características clínicas	50-70% Buen pronóstico Candidatas a terapia hormonal Pobre respuesta a quimioterapia	15-20% Mal pronóstico Candidatas a terapia con trastuzumab Buena respuesta a QT neoadyuvante	10-15% Mal pronóstico No tratamiento diana Buena respuesta a QT neoadyuvante BRCA1
QT: quimioterapia, RE: Receptor estrógeno, RP: Receptor progesterona, EGFR: Receptor de crecimiento epidérmico; CK: citoqueratina			

Wirapati y col ⁷⁰ en su metaanálisis en el que incluyen a 2833 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama, han demostrado la íntima conexión existente entre los factores tradicionales pronósticos y los subtipos moleculares previamente descritos, resaltando además la proliferación celular como factor pronóstico independiente. Sin embargo, algunos autores ⁷¹ cuestionan la utilidad de estas firmas génicas de primera generación en la práctica clínica, en cuanto a herramienta útil y única para la toma de decisiones del tratamiento de un determinado tumor. Exponen las siguientes razones en su crítica:

- En primer lugar, ninguna de las firmas génicas tienen en este momento un nivel I de evidencia en cuanto al valor predictivo de respuesta al tratamiento de las mismas, por lo que hay que esperar a los resultados de los ensayos en marcha, MINDACT y TAILORX para abordar esta cuestión.
- Segundo, no existe una correlación exacta en los genes determinados en las diferentes firmas génicas, lo que puede traducir diferencias en la determinación de subgrupos de mal pronóstico, entre las diferentes plataformas génicas.

- Tercero, el valor pronóstico de las firmas génicas está en íntima relación con el nivel de expresión de genes relacionados con la proliferación celular, que no tiene una distribución bimodal, ni tiene valor pronóstico claro en los tumores no hormonossensibles.

Tabla 5
CARACTERÍSTICAS GENÓMICAS, CLÍNICAS Y PROTEÓMICAS DE LOS SUBTIPOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA
Adaptado de Nature 2012 ⁶⁹

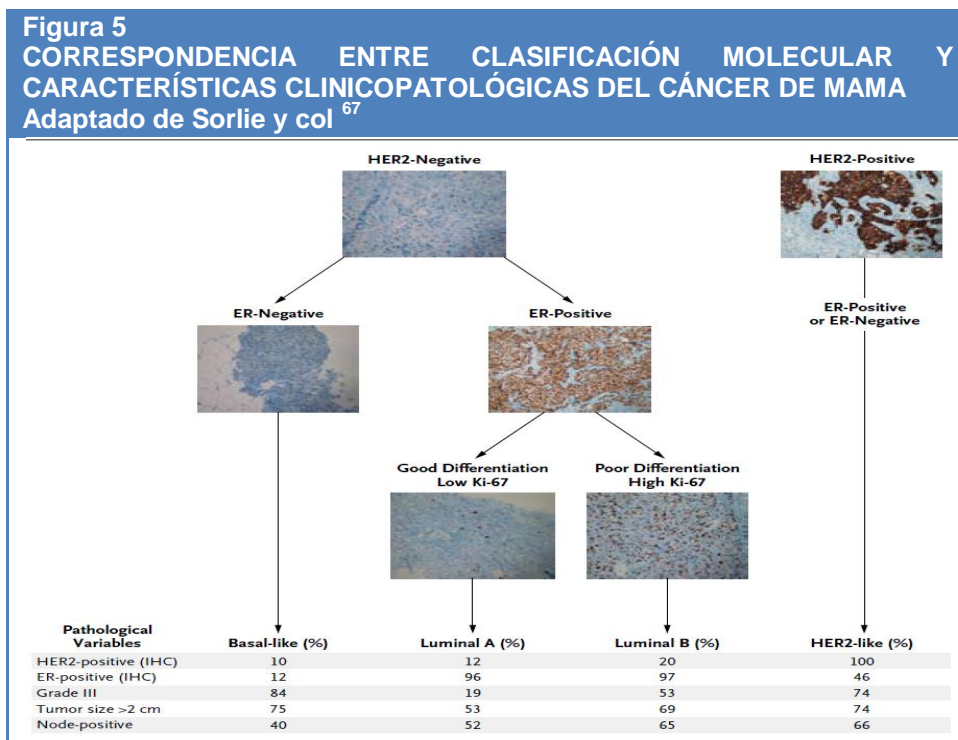
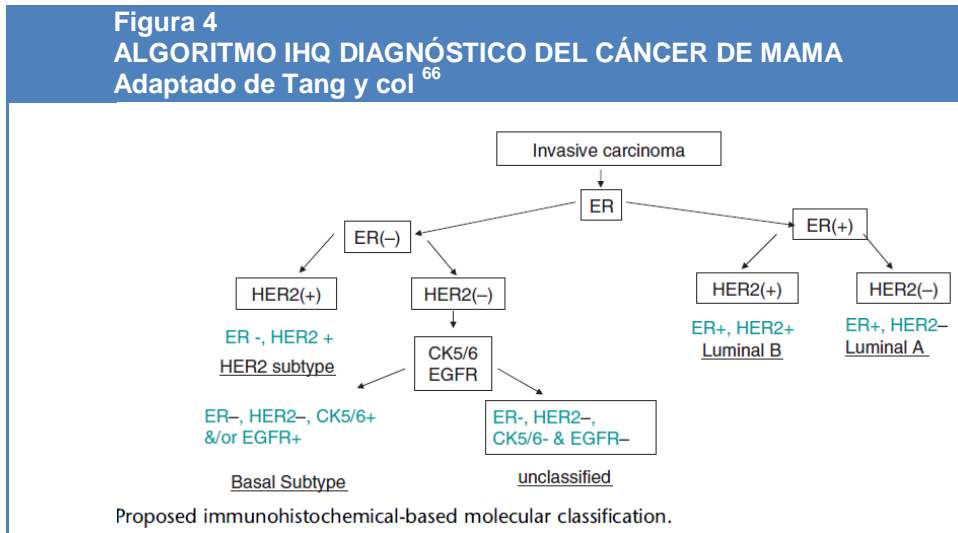
SUBTIPOS	Luminal A	Luminal B	HER2	Basal
RE+/HER2- (%)	87	82	20	10
HER2+ (%)	7	15	68	2
TN (%)	2	1	9	80
TP53	TP53 mut 12% MDM2 14%	TP53 mut 32% MDM2 31%	TP53 mut 75% MDM2 30%	TP53 mut 84% MDM2 14%
PIK3CA/PTEN	PIK3CAmut 49% PTENmut/loss 13% INPP4B loss 9%	PIK3CA mut 32% PTENmut/loss 24% INPP4B loss 16%	PIK3CA mut 42% PTENmut/loss 19% INPP4B loss 30%	PIK3CA mut 7% PTEN mut/loss 35% INPP4B loss 30%
Expresión mRNA	Cluster RE alto Proliferación baja	Cluster RE bajo Proliferación alta	HER amplificado Proliferación alta	Firma basal Proliferación alta
Nº copias	Diploidía	Aneploidía	Aneploidía	Aneploidía
Mutación DNA	PIK3CA 49%, TP53 12%, GATA3 14%, MAP3K1 14%	TP53 32%, PIK3CA 32%, MAP3K1 5%	TP53 75%, PIK3CA 42%, PIK3R1 8%	TP53 84%, PIK3CA 7%
Metilación DNA		Hipermetilación	Hipometilación	
Expresión proteínas	Vía estrógeno alta MYB alta RPPA subtipos	Vía estrógeno menor MYC y FOXM1 alta RPPA subtipos	EGFR y HER2 alta expresión de proteínas y fosfoproteínas	Proteínas Reparadoras DNA altas Pérdida PTEN y INPP4B

RE: receptor estrógeno, HER: Receptor humano de crecimiento epidérmico tipo 2, TN: triple negativo, mRNA: RNA mensajero, mut: mutación, loss: pérdida, EGFR: receptor de crecimiento epidérmico,

- Cuarto, son útiles en la predicción de recaída en los cinco primeros años, pero no aportan información sobre recaídas tardías. Posteriormente a este metaanálisis se ha publicado una revisión sistemática ⁷² muy interesante que pone de manifiesto la validez y utilidad clínica de las diferentes clasificaciones pronosticas-firmas génicas. De las 14 que existen actualmente (se incluye el sistema Adjuvant! y clasificación IHQ con ítems, debido a la importancia clínica de ambos sistemas), sólo 5 cumplen criterios adecuados; entre ellas, la información pronostica que dan tiene diferente nivel de evidencia. Oncotype estima con nivel de evidencia I la recurrencia a distancia, la supervivencia global (SG) y la respuesta a la quimioterapia, estimando con nivel de evidencia II la recurrencia local. Con nivel de evidencia II estiman la recurrencia a distancia y la SG la firma génica con 70 genes, la clasificación IHQ y Adjuvant!; este último además proporciona información en cuanto a la respuesta a la quimioterapia con nivel de evidencia II.
- Quinto. Por último, cada vez existen más estudios que demuestran la importancia pronostica del microambiente tumoral. Además, aunque se sabe que la heterogeneidad tumoral determina que el porcentaje de células tumorales pueda ser diferente en muestras seriadas del mismo tumor, se desconoce si esto puede modificar la información pronostica subyacente. En la actualidad se están estudiando firmas génicas de segunda generación que incluyen genes relacionados con el microambiente tumoral ⁷³⁻⁷⁵.

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

subtipos moleculares del cáncer de mama desde el punto de vista IHQ ^{66, 76, 77}, como muestra el sencillo algoritmo diagnóstico propuesto por Tang y col ⁶⁶ (Figura 4), aunque algunos trabajos han cuestionado la existencia de una correlación adecuada entre ambas ⁶⁸ (Figura 5) ⁶⁷.



Atendiendo a las diferentes publicaciones en las que se hace una clasificación IHQ del cáncer de mama (Tabla 6) observamos que hay algunas diferencias entre las clasificaciones realizadas por los diferentes autores. A pesar de ello, en la reunión de St Gallen en 2011 ⁷⁸ se adoptó una clasificación inmunohistoquímica pragmática basada en la introducción de Ki-67 como marcador de proliferación junto a los tres parámetros clásicos (RE, RP, Her2), que ha sido ampliamente adoptada en el entorno clínico, aunque la correlación real con los subtipos

moleculares es dudosa o limitada en muchos casos ⁷⁹. Incluso una clasificación similar a la de St. Gallen, pero sustituyendo el grado histológico por Ki67, ha mostrado una estratificación pronóstica aceptable, de nuevo sin clara correlación con los subtipos moleculares ⁸⁰.

Tabla 6. Clasificaciones inmunohistoquímicas del cáncer de mama

	LUMINAL A	LUMINAL B	HER2NEU	BASAL	OTROS
Tamimi ⁸¹	RE + y/o PR + y HER2 - y Grado I-II	(a) RE + y/o PR+ y HER2 + (b) RE + y/o PR+ y HER2 - y Grado III	RE - y PR- y HER2 +	RE - y PR- y HER2 - y CK 5/6 + y/o EGFR +	
EKA Millar ⁸²	RE + y/o PR + y HER2 - y Ki 67 < 5% y p53 < 10%	RE + y/o PR+ y HER2 + y/o Ki 67 alto y/o p53+	RE - y PR- y HER2 +	RE - y PR- y HER2 - y CK 5/6 + y/o EGFR +	RE - y PR- y HER2 - y CK 5/6 - y EGFR -
Wang ⁸³	RE + y/o PR + y HER2 -	RE + y/o PR+ y HER2 +	RE - y PR- y HER2 +	RE - y PR- y CK 5/6 + y/o EGFR +	RE - y PR- y HER2 - y CK 5/6 - y EGFR -
Voduc ⁸⁴	RE + y/o PR + y HER2 - y Ki 67 < 14%	RE + y/o PR+ y HER2 - y Ki 67 >14% LUMINAL HER2: RE + y/o PR+ y HER2 +	RE - y PR- y HER2 +	RE - y PR- y HER2 - y EGFR + o CK 5/6 +	TNP-no basal RE - y PR- y HER2 - y CK 5/6 - y EGFR -
Subik ⁸⁵	RE + y/o PR + y HER2 -	RE + y/o PR+ y HER2 +	RE - y PR- y HER2 +	RE - y PR- y HER2 - y CK 5/6 + y/o EGFR +	
Kornegoor ⁸⁶	RE + y/o PR + y HER2 - y Ki 67 < 14%	RE + y/o PR + y HER2 + o Ki 67 >14%	RE - y PR- y HER2 +	RE - y PR- y HER2 - y CK 5/6 + y/o CK 14+	
Park ⁸⁷	RE + y/o PR + y HER2 - y Ki 67 < 14%	(a) RE + y/o PR+ y HER2 + (b) RE + y/o PR+ y HER2 - y Ki 67 >14%	RE - y PR- y HER2 +	RE - y PR- y HER2 -	

RE: receptor estrógeno, RP: receptor de progesterona, HER2: Receptor humano de crecimiento epidérmico tipo 2, EGFR: Receptor de crecimiento eoidérmico, CK: citoqueratina

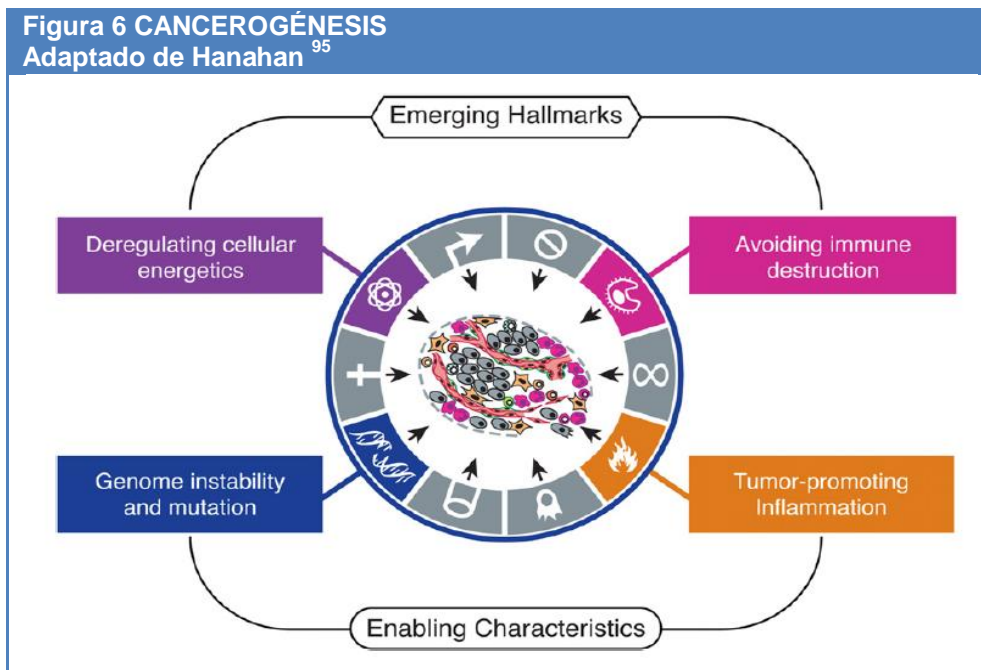
La introducción de la clasificación molecular del cáncer de mama ha añadido complejidad al estudio de los factores pronósticos y predictivos en la respuesta tumoral a la quimioterapia; sin embargo, probablemente puede mejorar la predicción de la respuesta al tratamiento con QTn. Los subtipos basal y Her2 positivo, presentan mayor tasa de RCp a QTn (45% cada uno) que los tipos luminal (6% RCp) y normal (no RCp) ⁵⁰, lo cual es congruente con los factores predictores de respuesta clásicos. Además, de este estudio se desprenden importantes conclusiones como que los genes asociados a la RCp son diferentes entre el subtipo basal y Her2 positivo, lo que sugiere que varían los mecanismos de respuesta a QT entre los diferentes subgrupos. Datos similares en cuanto a mayor tasa de RCp en los subtipos basal y Her2 positivo son presentados por Barghava ⁸⁸; sus resultados ponen de manifiesto la correlación entre la RCp y la SG a 5 años de estas pacientes, en comparación con la menor SG de las pacientes que no alcanzaron RCp (96% vs 75% SG a 5 años). Así mismo, existen otros trabajos que confirman la menor supervivencia de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo que no alcanzaron RCp comparadas con las pacientes no

triples negativo. Es además relevante, el hecho de que las pacientes de este grupo que alcanzaron RCp no mostraron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia, comparadas con las pacientes no triple negativo⁸⁹. Estos datos hacen pensar en la posibilidad de utilizar una clasificación molecular obtenida a partir de datos inmunohistoquímicos como factor predictivo de respuesta en el contexto de la quimioterapia neoadyuvante. En este sentido algunos trabajos han mostrado el valor predictivo y pronóstico de este tipo de clasificaciones⁸⁹⁻⁹³; si bien, otros no muestran una correlación adecuada con la clasificación molecular⁶⁸ y el valor predictivo puede no ser demasiado bueno en algunos subgrupos de tumores, como los Her2+ por inmunohistoquímica, en los que más de la mitad de casos realmente corresponden al tipo luminal⁹⁴. A estos resultados contradictorios puede contribuir también el hecho de que el panel de estudio inmunohistoquímico varía en los distintos trabajos, y pueden incluir o no la determinación de Ki-67 o de determinadas citoqueratinas; por otro lado, las diferentes clasificaciones IHQ vigentes pueden diferir en la gradación de positividad de receptores hormonales y Her2, por lo que pueden no ser superponibles de unos trabajos a otros⁸⁸. Tang y col⁷⁶ estudiaron la relación existente entre las cuatro definiciones IHQ de tumor basal existentes (clasificación por citoqueratinas (CK), triple negativo (TN), clasificación según RE/Her2, y clasificación CK/TN), observando una frecuencia de tumores basales de entre el 14 y el 40% en los carcinomas ductales invasivo, según las diferentes clasificaciones. Así mismo encontraron en tumores de alto grado una variabilidad en la tasa de tumores basales entre el 19 y el 76%, según la clasificación empleada. Por tanto, la utilidad real de esta clasificación en el contexto de la QTn y en concreto la validez de un sistema como el propuesto por Tang, mencionado previamente, no está todavía claramente establecida.

3. FUNDAMENTOS PARA EL ESTUDIO DEL VALOR PREDICTIVO Y PRONÓSTICO DE LA INFILTRACIÓN LINFOCITARIA TUMORAL EN EL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE DEL CÁNCER DE MAMA.

3.1 La respuesta inmune en el microambiente tumoral.

En la actualidad existen suficientes evidencias para considerar la modulación de la respuesta inmune una característica clave en el proceso de la progresión neoplásica, como se refleja en la actualización del ya clásico esquema de Hanahan y Weinberg⁹⁵ (Figura 6). Frente a la valoración exclusiva de las características de la neoplasia como marcadores pronóstico o predictivos, en los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia que las alteraciones del microambiente tumoral pueden tener en el pronóstico o en la respuesta al tratamiento antineoplásico⁵². Entendemos como microambiente tumoral, el formado por las células inmunes (linfocitos, natural killer células y células presentadoras de antígenos), los vasos sanguíneos y el estroma tumoral (fibroblastos, adipocitos)⁹⁶. Este microambiente tumoral potencialmente podría inducir quimiorresistencia en las células tumorales, a través de varios mecanismos: 1. Interacciones célula a célula y célula-matriz extracelular. 2. Liberación local de factores solubles como IL6 que promueve la supervivencia y crecimiento tumoral; 3. Interacciones célula-célula con las células tumorales (*crosstalk* y trogocitosis oncológica (mecanismo de quimiorresistencia a través de intercambios entre puntos de unión de la membrana celular y proteínas MDR)). 4. Generación de células tumorales resistentes, sometidas a condiciones de hipoxia, la cual activa el factor de crecimiento plaquetario B (PDGF-B), factor de crecimiento B (TGF-B), factor de crecimiento insulínico-2 (IGF-2) y factor de crecimiento epidérmico (EGFR). 5. Conversión de células tumorales en células madre tumorales^{97, 98}.

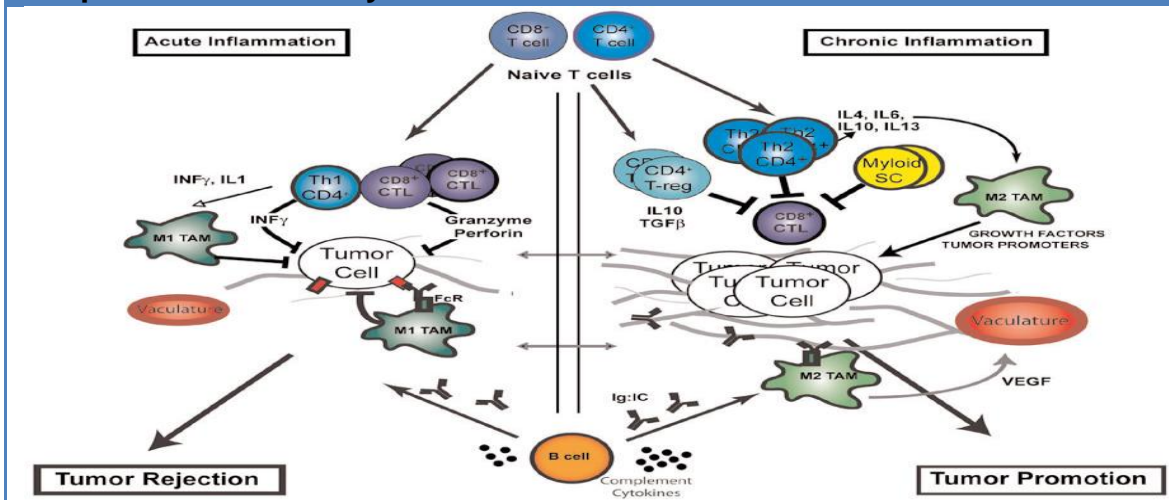


La inmunidad celular innata es la primera línea de defensa contra patógenos y agentes extraños; incluye macrófagos, granulocitos, mastocitos, células dendríticas (CD) y células *natural killer* (NK). Ante un desequilibrio de la homeostasis tisular (agente patógeno, célula tumoral...) los macrófagos locales y mastocitos secretan citoquinas, quimoquinas y otros bioactivadores, que remodelan la matriz celular y reclutan leucocitos adicionales para reparar el daño tisular. Al mismo tiempo las CD se activan con los antígenos tumorales y migran a los órganos linfoides donde activan la inmunidad adaptativa ⁹⁹. Esta activación aguda de la inmunidad celular innata lleva consigo la activación de la inmunidad celular adaptativa, cuyas células efectoras son los linfocitos T y B.

Las células inmunes que encontramos de forma más frecuente en el microambiente tumoral son los macrófagos (*tumor-associated macrophages* o TAM) y los linfocitos T. Los macrófagos promueven el crecimiento tumoral e intervienen en los mecanismos de angiogénesis, invasión y metástasis ¹⁰⁰, y se ha descrito que la alta tasa de infiltración tumoral por macrófagos conlleva mal pronóstico. Las células T se desarrollan en el timo como una célula progenitora común capaz de reconocer antígenos presentados por el complejo de histocompatibilidad mayor ó HLA (antígeno leucocitario humano). Las células T se clasifican en células linfocitos citotóxicos (CD8), linfocitos T reguladores (CD4+ CD25+ FOXP3+) y linfocitos T helper (CD4) ¹⁰¹. Los linfocitos CD8 citotóxicos producen la muerte celular mediante la producción de IFN-gamma y son fundamentales junto a los NK en la respuesta antitumoral ¹⁰¹. Hemos de distinguir dos categorías principales de CD4: Th1-CD4, que al ser activados secretan IFN, factor de crecimiento beta y TNF. Estas citoquinas junto a la actividad citotóxica de los CD8 inducen el procesamiento de antígenos y la expresión de moléculas MHC clase I y II; además el IFN activa a los macrófagos ¹⁰². El segundo grupo de CD4, los Th2-CD4, expresan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que por un lado induce inactivación de células T y por otro lado potencia la respuesta humoral tumoral ¹⁰³. Recientemente se ha descrito el subtipo Th17, el cual tiene un papel importante en la protección frente a patógenos extracelulares y en la regulación de procesos autoinmunes ¹⁰⁴. Mientras que se desconoce el significado pronóstico de la existencia de infiltrado tumoral por CD8, en algunas series de cáncer de mama se ha descrito que los infiltrados tumorales elevados de CD4 se correlacionan con progresión tumoral. Las células T reguladoras se caracterizan por la expresión de CD4, CD25 y FOXP3. Característicamente protegen a los tejidos de las enfermedades autoinmunes. No está claro el mecanismo a través del cual inhiben células T (CD4+CD25-; CD8), CD, células NK y células B. En la activación de FOXP3 podría tener un papel importante la producción tumoral de prostaglandina E2 y la producción por macrófagos de CCL22 ¹⁰².

Las células B precursoras maduran en la médula ósea, donde diferentes genes de inmunoglobulinas (Ig) se recombinan, expresando los receptores de las células B. Los diferentes clones maduros de linfocitos B serán activados en órganos linfoides por los antígenos. De esta manera los linfocitos B activos secretarán diversas Ig que activarán la cascada del complemento y reclutarán más células de la inmunidad innata de la circulación ¹⁰². De esta forma la inmunidad innata-adaptativa juega un papel crucial en la erradicación temprana de los tumores, o incluso en la regresión espontánea de los mismos. Sin embargo, también se sabe que la activación crónica de los linfocitos B puede conducir al desarrollo de tumores. (Figura 7)

Figura 7
Función de los linfocitos durante la carcinogénesis
 Adaptado de DeNardo y col ¹⁰²



Está claro que una de las funciones del sistema inmune es eliminar células aberrantes para impedir la formación de tumores. Sin embargo, ante la ausencia de dicha función pueden desarrollarse tumores más agresivos y resistentes al sistema inmunológico. Existen diversas y complejas interacciones entre el tumor y el sistema inmune. Para facilitar la comprensión de la relación entre ambos, debemos de considerar tres aspectos con entidad propia: 1. Infiltración del tumor por células inmunes; 2. Antígenos tumorales y la inmunidad endógena; 3. Inmunodeficiencias y riesgo de carcinogénesis.

1. Infiltración del tumor por células inmunes. La infiltración precoz por linfocitos determina en la mayoría de las ocasiones el desarrollo posterior de las lesiones; así por ejemplo, lesiones precancerosas de cáncer de mama con infiltración por linfocitos T tienen un riesgo 30 veces mayor de desarrollar carcinoma invasivo, que otras lesiones premalignas ¹⁰⁵. Además existen evidencias de que la mayor o menor infiltración linfocitaria del tumor tiene significación pronóstica: Zhang y col observaron que pacientes diagnosticadas de cáncer de ovario con mayor proporción de infiltración por linfocitos T tenían una mayor respuesta clínica a la quimioterapia, así como una mayor supervivencia media que las pacientes que no tenían infiltración por CD3 ¹⁰⁶.

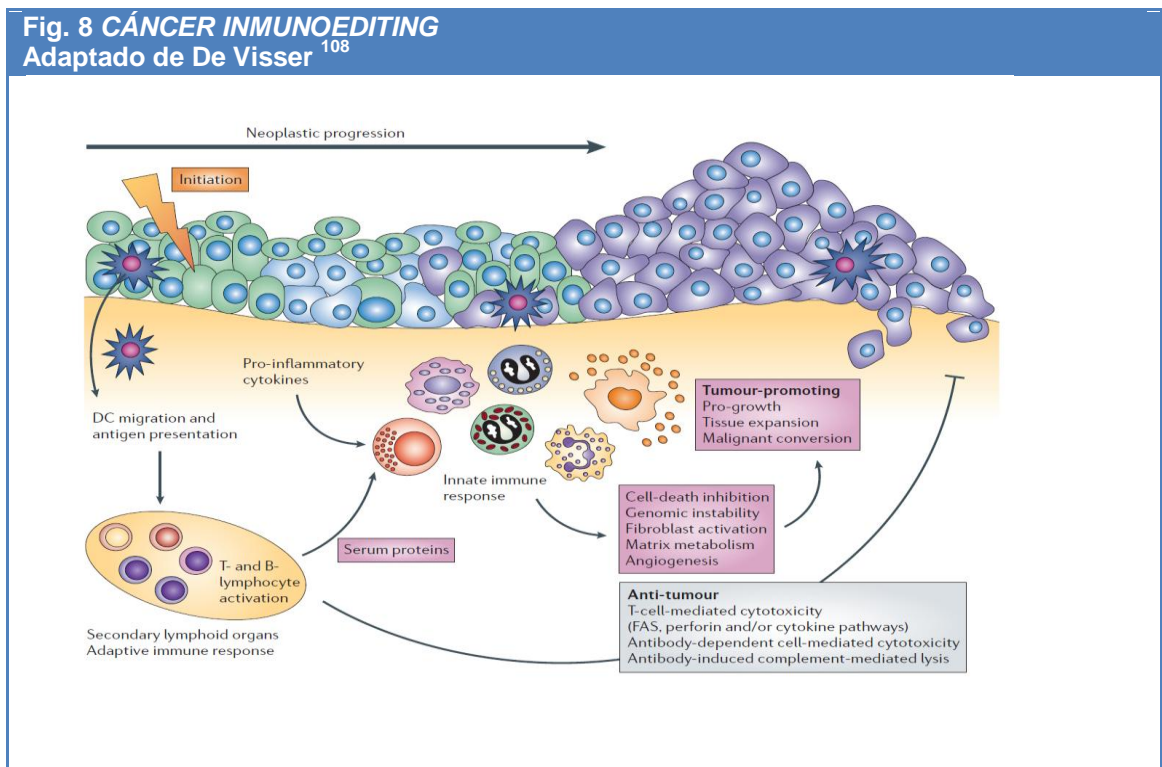
2. Antígenos tumorales y respuesta inmune. Se considera antígeno (Ag) tumoral cualquier proteína que pueda ser sintetizada en cualquier momento por la célula neoplásica. Existen dos grandes grupos de antígenos tumorales; antígenos exclusivos del tumor y antígenos compartidos entre tumores.

- Los antígenos exclusivos de tumor son secuencias peptídicas mutadas que son exclusivas de las modificaciones genéticas de cada tumor y por lo tanto de cada paciente en concreto. Algunas de estas mutaciones son responsables del fenotipo celular maligno.
- Los antígenos compartidos entre tumores son proteínas que aparecen en varias neoplasias de distintos pacientes, habitualmente con un origen histológico común. Se pueden distinguir cinco subgrupos:
 - Ag virales: Son proteínas de secuencias virales habitualmente críticas en la transformación neoplásica, como los Ag E6 y E7 del papilomavirus o el Ag EBNA del virus Epstein Barr.
 - Ag embrionarios de expresión aberrante en el tumor. Son Ag codificados por genes que se expresan tanto en tejidos normales como también en los tumores: Alfafetoproteína ó Ag carcinoembrionario (CEA), HER2, ciclina B1, MUC1, *wild type* p53.

- Ag de expresión selectiva en el testículo y en la placenta: MAGE 1, 2, 3; BAGE, GAGE y NY-ESO-1
- Secuencias de Ag no mutados altamente expresados en tumores. Son Ag de diferenciación tisular como el gp100, el PSA, o la fosfatasa ácida prostática.
- Secuencias idiotípicas de regiones variables de inmunoglobulinas, que son específicas de un clon de linfocitos B maligno (WT-1).

3. Imunosupresión y cancerogénesis. Pacientes inmunodeprimidos, como los pacientes trasplantados tiene un riesgo entre tres y ocho veces mayor de desarrollar cáncer que los individuos inmunocompetentes ¹⁰⁷. Los dos mecanismos básicos que explican este hecho son la carcinogénesis viral y la disminución de la inmunovigilancia.

Desde el punto de vista del sistema inmunitario, el desarrollo del cáncer, implica el éxito de los mecanismos de escape del tumor sobre la respuesta inmune antitumoral ¹⁰⁸ (Figura 8). El proceso o el conjunto de mecanismos por los que el sistema inmune detecta a la célula neoplásica y finalmente la elimina, antes de que se desarrolle el tumor propiamente dicho se ha denominado *cancer immunoediting* ¹⁰⁹. Este complejo proceso consta de tres fases: eliminación, equilibrio y escape; y en todas ellas desempeña un papel clave el microambiente tumoral ¹¹⁰, concretamente los linfocitos que se encuentran en el infiltrado inflamatorio peritumoral (*tumor infiltrating lymphocytes* o TIL).



Todos los mecanismos a través de los cuales el tumor se transforma y adapta al sistema inmune, lo cual supone complejas interacciones entre ambos, es lo que actualmente se denomina *tumor immunosculpting* ¹¹¹. Este proceso abarca desde una mutación puntual en la proteína de un antígeno, hasta el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT). La EMT, un mecanismo mediante el cual la célula tumoral cambia su fenotipo epitelial a uno mesenquimal, se relaciona con el aumento de secreción de SDF-1 (factor-1 derivado de estroma) que a su vez conduce a un aumento de los niveles de IL10 e inmunosupresión ^{112, 113}

Diversos estudios demuestran que la respuesta inmune tiene lugar en etapas muy precoces, antes de la formación del tumor propiamente dicho. Inicialmente su objetivo es la erradicación del tumor (*inmunosurveillance*); sin embargo los mediadores inflamatorios pueden ser resultado de mutaciones puntuales en este proceso, lo que paradójicamente supone la activación tumoral como respuesta final (*immunosculpting*)^{108, 111}. Así, en las células displásicas, las señales de supervivencia a la apoptosis junto a la activación de la vía del factor nuclear Kappa-B (NF-KB) en las células inmunes efectoras tiene como resultado la secreción de citoquinas, que tienen como vía final la producción de inflamación crónica y progresión tumoral¹¹⁴. La inmunomodulación tumoral (*immunosculpting*) es llevada a cabo por células inmunes efectoras, pertenecientes a la vía de la inmunidad innata u adaptativa, así como por citoquinas. De todos ellos, se ha de destacar por su importancia, a las células fagocíticas, en especial a los macrófagos. De hecho, el tejido mamario normal con mayor infiltración por macrófagos tiene un riesgo veinte veces mayor de desarrollar un carcinoma invasivo^{105, 115}. En la mayoría de los tumores los macrófagos se asocian con mal pronóstico, modulan el microambiente tumoral, produciendo factores de crecimiento e induciendo fenotipos tumorales agresivos^{116, 117}. Las interacciones entre macrófagos y células tumorales han sido estudiadas por Goswami y col, que demostraron una activación bidireccional paracrina mediante la secreción de factor epidérmico de crecimiento (CSF-1) que activa a las células tumorales, las cuales a su vez secretan factor-1 estimulador de colonias (CSF-1), responsable de la activación de macrófagos¹¹⁸. Los neutrófilos son otro grupo de células relevantes en la inmunomodulación tumoral. Activados por la IL-8 secretada por el tumor, secretan diferentes citoquinas como el factor de crecimiento anti-hepatocito (HGF), oncostatina M e IL-6. Estas citoquinas, a través de diferentes mecanismos, producen un aumento de la invasión tumoral¹¹⁹. Aparte de las células fagocíticas, existen moléculas efectoras con similares propiedades. Entre ellas destaca el TNF-alfa, el cual se sabe que activa numerosos factores de crecimiento e inhibe reguladores de la apoptosis como el c-FLIPI y el Bcl-2¹²⁰. Esta acción es dependiente de dosis, ya que concentraciones muy altas de TNF-alfa ejercen acciones opuestas, como activación de la apoptosis y destrucción de vasos sanguíneos.

En el infiltrado inflamatorio peritumoral encontramos células T efectoras (CD4), citotóxicas (CD8), células NK, células T reguladoras (CD4+ CD25+ FOXP3) y células B (CD20). Se ha atribuido a los desequilibrios entre las distintas poblaciones de células inmunes el desarrollo de algunas neoplasias o la progresión tumoral. En este sentido parece fundamental la acción de los linfocitos T reguladores. Por otra parte, en los últimos años también se han acumulado evidencias que apuntan a la relevancia de la respuesta inmune, y especialmente de los TIL, en la respuesta a la quimioterapia. Para describir de forma precisa la interacción entre el sistema inmune y el tumor debemos definir con exactitud la naturaleza, densidad, funcionalidad y localización de las células inmunes en el tumor¹²¹. En el caso del cáncer de mama se ha descrito el valor predictivo para la resistencia a la QTn de firmas génicas relacionadas con el estroma tumoral¹²¹. Así mismo, varios trabajos apoyan el valor pronóstico de firmas génicas relacionadas con la respuesta inmune en el microambiente tumoral⁷³.

Existen evidencias de la interacción existente entre el sistema inmune y el tratamiento con quimioterapia. De hecho, se sabe que la composición del infiltrado linfocitario peritumoral tras la quimioterapia es diferente en los tumores que respondieron a la quimioterapia respecto a los que no respondieron a la misma¹²². Los mecanismos de cooperación de la respuesta inmune con la QT pueden depender de la eliminación de poblaciones de linfocitos Treg por la QT, de la respuesta inmune generada por la liberación de determinados antígenos tras la destrucción neoplásica generada por la QTn o bien de otros mecanismos no conocidos. El valor predictivo y pronóstico de los cambios inducidos por la QT en la infiltración linfocitaria y en las distintas subpoblaciones de TIL B y T no se conoce bien, aunque hay datos recientes que apoyan su relevancia tras el tratamiento con QTn. De forma similar, no hay información suficiente sobre la importancia relativa de la respuesta inmune en el microambiente tumoral en los distintos subtipos de cáncer de mama, aunque de nuevo hay algunos estudios que sugieren que no es igual en los distintos tipos de neoplasia.

3.2 Infiltración linfocitaria en cáncer de mama.

En el cáncer de mama se ha descrito una gran diversidad de TIL¹²³ y su presencia parece tener un significado pronóstico positivo^{124, 125}. Ruffel y col¹²⁶ analizaron la composición de los infiltrados leucocitarios en tejido mamario normal, tejido mamario tumoral y tumor residual tras tratamiento QTn. Observaron que en el tejido mamario tumoral predominaban los linfocitos T activados, mientras que en tejido normal destacaban las células mieloides. Además observaron que tras la quimioterapia, en tejido tumoral se incrementaba el ratio CD8/CD4 y el número de células que expresaban granzyma B, demostrando este último dato la existencia de linfocitos funcionantes.

La infiltración linfocitaria peritumoral se considera como factor de buen pronóstico, y algunos estudios indican que una alta expresión de genes asociados a linfocitos confiere buen pronóstico en cáncer de mama ganglios negativos o Her2neu positivo^{127, 128}. Teschendorff y col⁷³ identificaron un subgrupo de tumores RE negativo con sobreexpresión de genes de respuesta inmune con mejor pronóstico que el resto de tumores no hormonosensibles, siendo esta sobreexpresión independiente del status axilar y de la infiltración linfocitaria. Aaltomaa y col¹²⁸ en su serie de 489 pacientes establecen la relación existente entre infiltración linfocitaria con el status axilar, tamaño e histología del tumor, así como el valor predictivo en cuanto a mejor SLE y SG de la infiltración linfocitaria en tumores con alto índice mitótico y ganglios negativos.

Los linfocitos T peritumorales son más habituales en carcinomas in situ de alto grado y carcinomas invasivos¹²⁹. La composición de los infiltrados por linfocitos T puede variar, lo cual lleva consigo diferencias en la progresión tumoral y la supervivencia de los pacientes. Se ha descrito en alguna serie una posible correlación entre altos niveles de CD4 ó ratio CD4/CD8 elevada con afectación ganglionar, tumores grandes y disminución de la supervivencia de las pacientes^{130, 131}. La escasa significancia pronostica de los CD8 se puede explicar a través de la polaridad de los CD4, y mediante la acción inhibitoria de las células T reguladoras (Treg).

Probablemente el estudio retrospectivo llevado a cabo por Mahmoud y col⁵⁶ sea el que incluye un mayor número de pacientes, 1334, con una muestra homogénea y un seguimiento mayor de 10 años. Los autores hallan que la infiltración del tumor por CD8 (total y en el estroma distante) se asocia a una mayor supervivencia de forma estadísticamente significativa, (análisis multivariante: HR 0,55; 95% CI 0,39–0,78; p=0,001) independientemente del grado tumoral, afectación ganglionar, tamaño, infiltración linfovascular y el status Her2. Confirman además que la mayor infiltración se observa en tumores más indiferenciados. En estudios con menor número de pacientes, como en el de Sheu y col¹³² se concluye que los altos niveles de CD8+ y el descenso de la relación CD4/CD8 se relacionaban con estadios más avanzados de la enfermedad y con mayor permeación vascular y afectación axilar; en este estudio de 24 pacientes no se realiza ningún análisis de supervivencia. La relación entre la infiltración por las distintas poblaciones linfocitarias y el pronóstico también ha sido estudiada en las metástasis ganglionares axilares del cáncer de mama, como muestra el estudio de Khort¹³⁰. En este estudio se llega a la conclusión de que el perfil inmune observado en los ganglios linfáticos axilares es un factor predictivo para la SLE. Para ello, estudian en 77 pacientes, 47 ganglios centinelas y hasta 104 no centinelas, en los que se determinan subpoblaciones linfocitarias CD4, CD8 y CD1a (células dendríticas). Con un seguimiento de 5 años, llegan a la conclusión de que la infiltración por CD4, CD8, y CD1a en ganglios no centinelas, independientemente de si son ó no metastásicos, se correlacionan de forma estadísticamente significativa con la SLE.

Los linfocitos Treg inactivan la proliferación y activación de los linfocitos T a través de citoquinas y el factor de crecimiento y transformación beta (TGF-beta)¹³³. El marcador específico de esta población de linfocitos Treg es la expresión nuclear de la proteína FOXP3 (factor de transcripción codificado en el cromosoma X). La densidad y localización de los infiltrados de Treg parece tener un valor pronóstico considerable. Liu y col observaron una mayor densidad de infiltración linfocitaria por CD8 y FOXP3 peritumoral, que en el lecho tumoral. Además demostraron que existía una asociación estadísticamente significativa entre una mayor densidad de infiltración y el alto grado histológico, la negatividad de RE y RP, y tumores Her2 positivo (esto último sólo se cumplía para FOXP3). Por otro lado, en este mismo estudio se puso de manifiesto que altos niveles de FOXP3 intratumoral eran una factor

pronóstico desfavorable para SG y SLE, siendo esto independiente del estatus hormonal; no se demostró dicho valor pronóstico en FOXP3 peritumorales y en la infiltración por CD8 intra y peritumoral¹³³.

Los linfocitos B peritumorales se encuentran con más frecuencia en etapas tempranas de la carcinogénesis. De hecho, en el carcinoma ductal in situ de mama (CDIS), encontramos células B en folículos ectópicos perivasculares asociados a las células tumorales; en estos folículos también se pueden encontrar DC, CD21 y células T^{134, 135}. Mahmoud y col¹³⁶ también estudiaron en 1470 tumores de mama la infiltración por linfocitos B. Encontraron que la infiltración por CD20 tenía un patrón difuso, siendo mayor en el estroma que intratumoral; además, mayores recuentos por CD20 se asociaban de forma estadísticamente significativa con alto grado tumoral, negatividad de receptores hormonales y fenotipo basal. Demostraron que la infiltración por CD20 tiene valor pronóstico, en cuanto que una mayor tasa de infiltración por CD20 se relaciona de forma estadísticamente significativa con mejor SLE y supervivencia específica por cáncer de mama.

En la tabla 7 y 8 se resumen los resultados de los principales estudios comentados.

Existen datos que sugieren que el equilibrio o la relación entre distintas poblaciones de células inmunes tumorales pueden reflejar de forma más exacta el perfil de respuesta inmune en el microambiente tumoral que el análisis de las poblaciones aisladas^{132, 133}. La relación entre Foxp3 y CD8 ha sido utilizada como marcador de respuesta a QT¹³⁷. La relación entre Foxp3 y CD3 ha mostrado su valor como marcador para la resistencia al tratamiento en otras neoplasias¹³⁸. La ratio CD4/CD8 podría reflejar el equilibrio entre la respuesta inmune Th1 y Th2 frente a la neoplasia^{139, 140}. La relación entre macrófagos y CD8 es inversamente proporcional, y la ratio elevada CD68/CD8 se ha relacionado con disminución de la tasa de RCp en pacientes en tratamiento con QTn y con menor supervivencia de las mismas¹⁴¹.

Como se ha comentado previamente, diversos estudios demuestran que la respuesta inmune que se origina durante el desarrollo del tumor depende tanto del órgano donde se origina el tumor como del microambiente tumoral. En parte la heterogeneidad de las células CD4 acumuladas en los tejidos es consecuencia de la polaridad producida por la señalización de citoquinas inducida por los antígenos tumorales. La activación Th1 de los CD4 implica la regulación antitumoral de forma directa e indirecta. Por un lado se produce la secreción de IFN-gamma, FNT-alfa, así como IL2 e IL12; mediante esta vía finalmente se presentan y procesan los Ag por las células APC y se regula la respuesta de los linfocitos citotóxicos CD8. Una segunda vía de destrucción tumoral es la llevada a cabo por la hiperestimulación de los CD4 Th1 y la producción masiva de IFN_{gamma}, FNT_{alfa} y gránulos citolíticas. La activación CD4 Th2 lleva consigo la activación de la inmunidad adaptativa mediante IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13; lo cual por un lado supone anergia e inhibición de las células T y por otro la respuesta humoral a través de los linfocitos B. El resultado final de la activación Th2 es la inhibición de la apoptosis y la proliferación tumoral¹⁰⁴. En consistencia con estos datos del proceso inmunológico se ha descrito en la literatura que la ratio elevada Th2/Th1 se relaciona con progresión tumoral en el cáncer de mama, incremento del tamaño tumoral y afectación ganglionar¹⁴².

Tabla 7. Infiltración linfocitaria en el cáncer de mama (I).

Estudio	N	Cáncer mama	Determinación TIL	TIL	Relación TIL-tumor	Relación TIL-QT	Variación TIL con QT	SLE, SG
Marsigliante 1999 ¹²³	90	N0/N+ (no QTn)	Image Analyzer Software Optilab 2. (Estudio adicional: determinación de LSP. No diferencia con controles sanos)	CD3,CD4, CD8,CD25, CD56, CD20	CD4 y estatus axilar	No descrito	No descrito	No descrita
Menard 1997 ¹²⁴	1919	N0/N+ (no QTn)	Determinación morfológica de extensión HE. Puntuación: negativa ó positiva	No descrito	No relación	No descrito	No descrito	En <40 años relación positiva supervivencia e infiltración linfocitaria
Lee 2006 ¹²⁵	679	Estadio I-II (no QTn)	Determinación morfológica de extensión HE. <u>Tres patrones:</u> difuso, perivascular y perilobular. <u>Grado de infiltración:</u> ausente, mínima, moderada y marcada.	No descrito	Grado, necrosis tumoral, tipo ductal, HER2+	No descrito	No descrito	Infiltración moderada o marcada relación positiva con la supervivencia
Aaltomaa 1992 ¹²⁸	489	N0/N+ (no QTn)	Determinación morfológica. <u>Grado de infiltración:</u> ausente, mínima, moderada y marcada. TIL-T mayoritarios. Determinación morfométrica, analizador de imágenes IBAS 1 y 2.	No descrito	Grado, necrosis tumoral, histología, IP, status axilar	No descrito	No descrito	En tumores N0 y alto grado de proliferación relación positiva con supervivencia específica cáncer de mama

LSP: linfocitos en sangre periférica, grado: grado histológico, IP: índice de proliferación.

Tabla 8. Infiltración linfocitaria en el cáncer de mama (II).

Estudio	N	Cáncer mama	Determinación TIL	TIL	Relación TIL-tumor	Relación TIL-QT	Variación TIL con QT	SLE, SG
Mahmoud 2011 ⁵⁶	1334	Estadio precoz (no QTn)	Microarray, determinación antiCD8 y conteo por microscopio. Determinación de TIL intratumoral, en estroma adyacente y en estroma tumoral alejado.	CD8	Grado tumoral, RE-alfa, RP, (edad paciente)	No determinado	No determinado	En RE negativo, Her2 negativo y subtipo basal relación positiva con supervivencia (sólo totales y CD8 estroma alejado)
Sheu 2008 ¹³²	24	Estadio I-III (no QTn)	Determinación en tejido fresco. Citometría de flujo. No aportan detalles (estudio adicional: determinación por citometría de flujo de mismos subtipos de linfocitos en sangre periférica)	CD4, CD8, CD3, <i>natural killer</i> , células B	< CD4/CD8 se relaciona con afectación ganglionar, linfovascular y estadios mayores	No determinado	No determinado	No determinado
Liu 2011 ¹³³	1270	Estadio I-III (no QTn)	Tejido parafina, determinación IHQ de CD8 y FOXP3. Recuento manual de las diez áreas con mayor densidad de TIL (5 de lecho tumoral y 5 áreas periféricas) Determinación de TIL en lecho tumoral (A) y en periferia tumoral (B).	CD8 FOXP3	CD8 (A) más frecuente en tumores indiferenciados, no HS. FOXP3 (A) en Tumores HER2+. Correlación negativa con status hormonal. CD8/FOXP3 (B) > en lumbales	No determinado	No determinado	CD8(A) FOXP3(A): <SG y SLE CD8/FOXP3 (B): >SG y SLE
Mahmoud 2012 ¹³⁶	1470	Estadio I-III (no QTn)	Tejido parafina, TMA determinación IHQ de CD20. Recuento manual de TIL en tres zonas, recuento total combinando tres zonas (Intratumoral (nidos celulares); estroma a distancia (alejado > 1 diámetro de célula tumoral; estroma adyacente (dentro de un diámetro celular del tumor). Lo más frecuente, patrón difuso en el estroma	CD20	Tumores indiferenciados, no hormono-sensibilidad, fenotipo basal. Correlación negativa con la edad.	No determinado	No determinado	Correlación positiva supervivencia específica de cáncer de mama, y SLE en tumores indiferenciados, fenotipo basal, en no HS y en Her2+

HS: hormonosensibles.

3.3 Valor pronóstico de subpoblaciones linfocitarias y subtipo tumoral.

Algunas publicaciones recientes ^{143, 144} sugieren que existe alguna relación entre el tipo de infiltrado linfocitario y el subtipo molecular del cáncer de mama y que el valor pronóstico de los TIL o sus subpoblaciones varía dependiendo del subtipo de tumor.

Loi y col ¹⁴⁵ revisaron 2009 pacientes que habían sido incluidas en el ensayo Fase III BIG-02-98 y con un seguimiento de 8 años. Determinaron la infiltración linfocitaria en el tumor y lo correlacionaron con la SLE y SG de las pacientes, objetivando que las pacientes Her2 negativas/RE negativas con mayor infiltración linfocitaria tenían mejor pronóstico independientemente de la QT recibida, de forma que cada 10% de incremento en la infiltración linfocitaria intratumoral y en el estroma tumoral, suponía una disminución en el riesgo de recaída del 17% (p=0,03) y del 15% (p=0,02) respectivamente. Además el aumento de TIL (intratumoral/estromal) suponía una disminución del riesgo de muerte del 27%(p=0,03) y 17% (p=0,02) respectivamente. En las pacientes Her2 positivas se vio que los incrementos de TIL se asociaban a una reducción en el riesgo de recaída (p=0,04) y de muerte (p=0,01), pero sólo en aquellas pacientes tratadas con antraciclina.

En el estudio de Mahmoud ⁵⁶ comentado previamente, además se realiza un análisis de supervivencia por subtipos tumorales y encuentran que la infiltración por CD8 se asocia a una mayor supervivencia específica de cáncer de mama y supervivencia libre de progresión en pacientes no hormonosensibles, Her2 negativas, así como en el cáncer de mama con fenotipo basal. Liu y col en su trabajo, demostraron que la densidad de FOXP3 intratumoral era diferente según el subtipo molecular, de forma que la infiltración era mayor en los subtipos de peor pronóstico. La media de FOXP3 fue 4 células/0,0625mm² en tumores del tipo luminal A, 10 en el subtipo Luminal B, 12 en subtipo luminal HER2, 17 en cáncer de mama Her2 positivo y 20 en tumores basales ¹³³.

Existen estudios retrospectivos que evalúan a más de mil pacientes cada uno, que relacionan la infiltración linfocitaria y buen pronóstico en pacientes con cáncer de mama ganglios negativos y sobreexpresión de Her2 ^{146, 147}.

En la tabla 9 se resumen los resultados de los principales estudios.

Tabla 9. Infiltración linfocitaria en el cáncer de mama (III).

Estudio	N	Cáncer mama	Determinación TIL	TIL	Relación TIL-tumor	Relación TIL-QT	Variación TIL con QT	SLE, SG
Mahmoud 2011 ⁵⁶	1334	Estadio precoz (no QTn)	Microarray, determinación AntiCD8 y contaje por microscopio. Determinación intratumoral, estroma adyacente y estroma tumoral alejado.	CD8	Grado tumoral, RE-alfa, RP, (edad paciente)	No determinado	No determinado	En RE negativo, Her2 negativo y subtipo basal relación positiva con supervivencia (sólo totales y CD8 estroma alejado)
Liu 2011 ¹³³	1270	Estadio I-III (no QTn)	Tejido parafina, determinación IHQ de CD8 y FOXP3. Recuento manual de las diez áreas con mayor densidad de TIL (5 de lecho tumoral y 5 áreas periféricas) Determinación de TIL en lecho tumoral (A) y en periferia tumoral (B)	CD8 FOXP3	CD8 (A) más frecuente en tumores indiferenciados, no HS FOXP3 (A) en Tumores HER2+. Correlación negativa con status hormonal. CD8/FOXP3 (B) > en luminales	No determinado	No determinado	CD8(A) FOXP3(A): <SG y SLE CD8/FOXP3 (B): >SG y SLE
Pupa 1996 ¹⁴⁶	1207	Estadio I-III (no QTn)	Determinación IHQ. Recuento manual.	CD11, CD3, CD4, CD8, CD69, CD23, CD15	Tamaño tumoral, estadio, Tumores indiferenciados, sobreexpresión Her2	No determinado	No determinado	Infiltración por macrófagos en GIII, N0 y Her2+ buen pronóstico
Rilke 1991 ¹⁴⁷	1210	Estadio I-III (no QTn)	Determinación semicuantitativa: Leve, moderada y marcada.	No determinado	Más frecuente en tumores HER2+	No determinado	No determinado	TIL modulan el pronóstico de pacientes Her2+ y N0/N+
Mahmoud 2010 ¹⁴⁴	1445		Determinación mediante eyepiece graticule. Recuento manual de TIL en tres zonas, recuento total combinando tres zonas (Intratumoral (nidos celulares); estroma a distancia (alejado > 1 diámetro de célula tumoral; estroma adyacente (dentro de un diámetro celular del tumor). Lo más frecuente patrón difuso en el estroma.	FOXP3	Tumores indiferenciados, No HS Her2+. Subtipo basal			FOXP3+ peor supervivencia específica por cáncer de mama. (No diferencias en FOXP3+ en estroma a distancia) En pacientes hormonosensibles FOXP3+ peor pronóstico
Loi 2013 ¹⁴⁵	2009	Estadios II-III	Infiltración linfocitaria intratumoral: Porcentaje de mononucleares que invaden los nidos tumorales. Infiltración linfocitaria estromal: Porcentaje de estroma tumoral que contiene linfocitos. Revisión por dos patólogos. LPBC: BC con predominio de linfocitos, infiltración 50%	No determinado	Ductales alto grado He2+ TN	No determinado	No determinado	LPBC disminuye riesgo de recaída y riesgo de muerte.

3.4 Relación de TIL y firmas génicas del cáncer de mama.

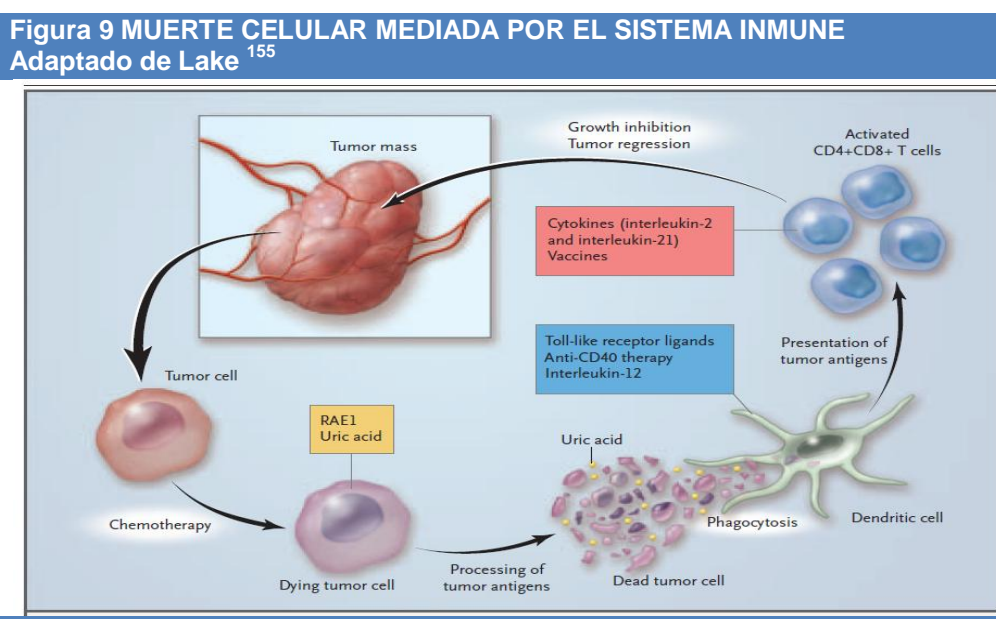
Las diferentes firmas génicas publicadas hasta la fecha han sido una herramienta clave para determinar las características de los diferentes subtipos moleculares del cáncer de mama, y se ha descrito con diferente nivel de evidencia el nivel pronóstico de las mismas. A pesar de todo ello, existen sutiles discrepancias entre ellas, así como en la información pronóstica que cada plataforma estima. Los genes incluidos en las diferentes firmas génicas, en general están en relación con el ciclo celular, invasión, metástasis y angiogénesis. Por otro lado recientes trabajos ponen de manifiesto la importancia pronóstica de determinadas expresiones génicas en relación con el sistema inmune^{73, 148-151}. En base a todo lo expuesto anteriormente, cada vez se hace más patente la necesidad de integrar en estas plataformas génicas ya clásicas los genes involucrados en las interacciones del tumor con las células inmunes existentes en el microambiente tumoral. En este sentido Geza y col¹⁵² encuentran que aquellos cánceres de mama NO y RE positivo de bajo grado, que presentan un *recurrence score* intermedio o alto son precisamente aquellos que se asocian a un estroma celular proliferativo y con mayor número de células inflamatorias.

Alexe y col¹⁵³ estudiaron 286 tumores de mama NO, en los que definieron dos subtipos de cáncer de mama Her2 positivo con un pronóstico muy diferente e independiente del status de hormonal. Las pacientes que mostraban sobreexpresión de genes asociados a linfocitos, así como una marcada infiltración linfocitaria en el estudio histológico mostraron una tasa de recurrencia menor, que las pacientes que no presentaban esta infiltración linfocitaria, siendo la tasa de recurrencia 11% vs 58% según el grupo. Estas diferencias no fueron encontradas en las pacientes Her2 negativo.

Desmedt y col¹⁵⁴ demostraron que la respuesta inmune y la invasión tumoral modificaban el pronóstico de algunos subtipos moleculares de cáncer de mama. Para ello realizaron un meta-análisis en el que integraron los datos clinicopatológicos y de expresión génica de 2100 pacientes con cáncer de mama. Definieron módulos de expresión génicos, según los principales procesos biológicos: proliferación, invasión tumoral/metástasis, alteración de la respuesta inmune, angiogénesis, apoptosis, hormonosensibilidad y sobreexpresión de Her2. Con un seguimiento de 10 años, determinaron la supervivencia libre de recaída o supervivencia libre de metástasis de las pacientes. Los diferentes modelos de expresión génica conferían una información pronóstica adicional según los diferentes subtipos de cáncer de mama. Concluyeron que en las pacientes RE y Her2 negativo (n=189) el módulo de expresión génica en relación a la respuesta inmune tenía valor pronóstico, tanto en el análisis univariante como en el multivariante, HR 0,7 (95% CI 0,5 – 0,98); p=0,04. Altos niveles del módulo inmune, principalmente representado por STAT1, se asociaban de forma significativa con un mejor pronóstico de las pacientes. Además en el subgrupo Her2 positivo (n=129) los cambios de expresión génica en el módulo de la respuesta inmune se asociaron de forma estadísticamente significativa con la supervivencia libre de recaída tanto en el análisis univariante como multivariante, HR 0,56 (95%CI, 0,36-0,86), p=0,009).

3.5 Relación de TIL y respuesta a la quimioterapia.

La composición del infiltrado linfocitario peritumoral tras la quimioterapia es diferente en los tumores que respondieron a la quimioterapia respecto a los que no respondieron a la misma, este hecho refleja la respuesta inmune a la quimioterapia y la muerte celular ¹²². El mecanismo mediante el cual la quimioterapia produce muerte celular es la apoptosis; sin embargo, estudios recientes demuestran que también la muerte celular mediada por el sistema inmune juega un importante papel ^{155, 156} (Figura 9). Algunas quimioterapias inducen apoptosis mediante el aumento de receptores de muerte, como FAS y TNF; en otras ocasiones la apoptosis está inducida mediante la liberación del citocromo C de la mitocondria. La muerte celular no apoptótica puede producirse por mecanismos de necrosis, autofagia o mitosis catastrófica.



La apoptosis o muerte celular programada, está activada por caspasas y tradicionalmente se ha considerado no inmunogénica; sin embargo, cada día está más claro que la apoptosis puede suponer la activación del sistema inmune innato. Esta activación se lleva a cabo por “marcadores moleculares”, que se liberan de la célula cuando muere. La fosfatidilserina, es el mayor representante, aunque existen otras moléculas intracelulares que son liberadas en la muerte celular y que de igual modo pueden activar el sistema inmune. Estas moléculas producen la activación de mediadores inflamatorios (TGF-beta, Interleucina 10, y prostanoídes) La diferencia entre que la apoptosis celular active o no el sistema inmune, se encuentra en la cantidad de apoptosis que se produce, es decir; en una apoptosis controlada, las células muertas son fagocitadas por lo que no se liberan los activadores de la inflamación al exterior. Sin embargo, en una apoptosis masiva, no todas las células pueden ser fagocitadas, desencadenándose la cascada inflamatoria y activándose el sistema inmune.

Se han postulado diferentes teorías sobre como interacciona la QT con el microambiente tumoral, y el posible efecto quimiosensibilizante de los TIL ⁵². A continuación se exponen los trabajos publicados que relacionan la infiltración linfocitaria tumoral en el cáncer de mama con la respuesta a la QTn y que han sido resumidos en la tabla 10.

West et al ¹⁵⁷ estudiaron los TIL como factores predictores de respuesta a antraciclina en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama; concluyeron en su estudio que las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama no hormonosensibles con niveles altos de CD3 tenían mayor SLE que las pacientes que no presentaban estos niveles de CD3 ($P=0,002$). Adicionalmente, en una cohorte de pacientes sometidas a tratamiento de QTn dentro de ensayo clínico, que aleatorizaba a las pacientes a recibir tratamiento QTn esquema FEC (fluoracilo epirrubicina y ciclofosfamida x6c) vs. TET (docetaxel x3 ciclos seguido de docetaxel epirrubicina x3 ciclos). Realizaron un estudio de expresión génica analizando la expresión de RNA mensajero de 8 genes en relación con los linfocitos (CD19, CD3D, CD48, GZMB, LCK, MS4A1, PRF1, and SELL), y observaron que las pacientes con alta expresión de estos genes, en tratamiento con QTn tenían mayor tasa de RCp (74 vs 31%) (OR 6.33, 95% CI 2.49–16.08; $P<0.0001$). Existen cuatro posibles hipótesis que explicarían la relación existente entre las antraciclina y la inmunidad: En primer lugar, las antraciclina como inhibidores de los linfocitos Treg del microambiente tumoral, lo que implicaría el cese de la inhibición del sistema inmunitario. Esta teoría habría que tomarla con cautela ya que otros fármacos usados habitualmente en combinación, como por ejemplo la ciclofosfamida, podrían tener el mismo efecto a nivel de los linfocitos Treg. El segundo mecanismo descrito estaría en relación con la linfopenia inducida por la QT, que actuaría como activación del sistema inmune antitumoral. En tercer lugar la QT podría sensibilizar a las células tumorales frente a las células T citotóxicas. Este hecho podría llevarse a cabo bien mediante la activación de las células citotóxicas mediada por antígeno específicos; bien, mediante activación de la vía *TRAIL* (apoptosis inducida por ligando, en relación con TNF), o incluso por la inducción de receptores Fas en la superficie de las células tumorales, lo cual llevaría consigo la apoptosis de la célula tumoral mediada por el receptor Fas. Por último, las antraciclina inducirían la muerte celular inmunogénica, mecanismo en el que intervendrían las células dendríticas (DC) y CD8. Este proceso, en el que las antraciclina induciría la fagocitosis de la célula tumoral por las DC, se inicia mediante la activación de la vía mediada por la calreticulina que finalmente produce la liberación de la parte extracelular del receptor HMGB1/TLR4. Este mecanismo es exclusivo de las antraciclina.

Otro ejemplo de cómo la QT destruiría los linfocitos T reguladores, restaurándose así la inmunidad antitumoral es el trabajo de Ladoire y col ¹⁵⁸; estudiaron 56 pacientes con cáncer de mama sometidas a QTn los autores y evaluaron el perfil inmune (CD3+, CD8, Foxp3+) antes y después del tratamiento con QT. La alta expresión de CD3+, CD8 y Foxp3+ antes del tratamiento se asocia a mal pronóstico, mientras que tras la QTn las pacientes que alcanzaron RCp presentaban alta expresión de CD8 y ausencia de Foxp3. Por otro lado, se postula la teoría de que la QT activaría las células inmunes presentes en el microambiente tumoral induciendo así la muerte celular inmunogénica. En la misma línea del trabajo de Ladoire, Liu y col ⁹⁸ estudian el valor de los Treg y los cambios secundarios a la QT en 132 pacientes diagnosticadas de cáncer y tratadas con QTn. Sus conclusiones fueron que el descenso de Treg peritumoral producido por la QT es factor predictivo independiente de RCp, y que además los Treg intratumorales constituyen un factor pronóstico independiente de SLE y SG.

El estudio más amplio hasta la fecha es el recientemente publicado por Denkert y col ⁵⁴, en el que estudian la infiltración linfocitaria intratumoral y estromal (CD3, CD20, CXCR3) en las biopsias diagnósticas de 1058 mujeres con cáncer de mama sometidas a QTn e incluidas en los ensayos GeparDuo y GeparTrio. Las pacientes con mayor infiltración linfocitaria intratumoral al diagnóstico alcanzaban mayor tasa de respuesta completa patológica (40% vs 7%), por lo que los autores concluyen que la infiltración linfocitaria intratumoral es un factor predictivo estadísticamente significativo de respuesta a quimioterapia.

Estudios más recientes confirman y matizan todos estos resultados. Así Ono et al ¹⁵⁹ demostraron en su serie de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama y sometidas a QTn, que tanto en el conjunto de pacientes, como en el subgrupo de pacientes triples negativas, la tasa de RCp era mayor que en las pacientes con niveles altos de TIL, respecto a las pacientes que presentaban niveles bajos (34 vs 10% $p=0.0001$ en el conjunto de pacientes; 37 vs 16%; $p=0,05$ en las pacientes TN). Resultados similares obtienen Yamaguchi et al ¹⁶⁰ en 68 pacientes con cáncer de mama sometidas a QTn. Como resultado concluyen que los niveles altos de TIL es el mejor predictor de RCp de forma independiente (OR 4.7; IC 2.2-10.06; $p=0,0001$).

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, y los diferentes subtipos moleculares descritos hasta la fecha (luminal A, luminal B, Her2 positivo, triple negativo) conllevan diferencias en cuanto al pronóstico y respuesta al tratamiento. En este sentido sería importante conocer mejor la interrelación entre el microambiente tumoral (TIL) y los diferentes subtipos moleculares del cáncer de mama. Ignatidis y col¹⁶¹ investigaron la asociación entre la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama y los módulos de expresión génica representativos de diferentes procesos biológicos en los diferentes subtipos de cáncer de mama. Hallaron que los tumores con módulos altos de expresión génica de las vías inmunes se asociaban a mayor tasa de RCp en todos los subtipos de cáncer de mama, siendo esta asociación mayor en los tumores que sobreexpresan HER2. Los autores atribuyen esta diferencia a que al efecto activador de DC de las antraciclinas se suma el efecto inmunomodulador de la sobreexpresión de HER2 en el cáncer de mama.

Otros estudios han estudiado distintas subpoblaciones linfocitarias o han evaluado la infiltración linfocitaria post-tratamiento, planteando de este modo diferentes hipótesis con respecto a los posibles mecanismos de interacción entre la QT y la respuesta inmune⁵². Así, algunos trabajos apoyan el posible papel de la infiltración linfocitaria post-tratamiento como un factor predictivo de respuesta a la QTn, y plantean la posibilidad de que la lesión celular tumoral inducida por la QT pueda activar la respuesta inmune frente a la neoplasia, contribuyendo a la respuesta. En este sentido, De Maria⁵⁵ presenta una serie de 25 pacientes con cáncer de mama, tratadas con QTn según el esquema paclitaxel 200mg/m² c/15d x 4 ciclos y posteriormente sometidas a cirugía. Tras evaluar los TIL pre y post QTn, los autores llegan a la conclusión de que la presencia de TIL tras la QTn se relaciona con el grado de respuesta al tratamiento, mientras que sugieren que la existencia de TIL pretratamiento puede ser predictivo de resistencia a la quimioterapia. En la discusión del estudio también se plantea la importancia del intervalo entre el último ciclo de QT y la cirugía, y se propone como un posible mecanismo de eliminación de las células tumorales residuales la activación de células T citolíticas efectoras lo que se podría traducir en mayores tasas de RCp. En otro estudio se pone de manifiesto el valor predictivo de TIL en cuanto a la respuesta a QTn de 73 pacientes estudiadas, que fueron tratadas con antraciclinas y taxanos. Los autores observaron que en las 10 pacientes en las que se observó RCp existían altos niveles de p53, así como de CD3+ y CD83+ (un marcador de maduración de células dendríticas)¹⁶². Trabajos más recientes, como los publicados por el grupo del Instituto Gustave Roussy, han permitido profundizar en los mecanismos que podrían participar en estos efectos inmunógenos de la QT, que parecen mediados por TLR4 (*toll-like receptor 4*), fundamental para la presentación antigénica de determinadas moléculas liberadas por las células tumorales apoptóticas¹⁶³. Estos mecanismos podrían también estar mediados por otros efectos inmunes locales o sistémicos de algunos fármacos antineoplásicos, y en particular de los taxanos¹⁶⁴, que habitualmente forman parte de los regímenes de QTn.

Por último, la participación de la infiltración por linfocitos B en la respuesta a QTn es menos conocida. El trabajo de Denkert antes citado⁵⁴ ha evaluado la infiltración linfocitaria B (CD20) pre-tratamiento, demostrando su asociación con la RCp. Sin embargo, a pesar de datos recientes que apoyan la relevancia biológica de la respuesta B antitumoral en el cáncer de mama precoz^{165, 166}, ningún estudio ha valorado la infiltración B post-tratamiento ni su posible valor pronóstico.

Por tanto, si bien hay datos que apoyan la importancia de la infiltración linfocitaria pre-tratamiento como factor predictivo de respuesta a la QTn, no está totalmente establecido el papel predictivo y pronóstico de las distintas subpoblaciones linfocitarias ni de los cambios post-QT en la presencia o la composición de las poblaciones de TIL en este grupo de pacientes. La evaluación de estos cambios, además de su utilidad clínica, puede contribuir al mejor conocimiento de los mecanismos de cooperación (o antagonismo) de la respuesta inmune y la QTn, y, por tanto, al desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento.

Tabla 10. Infiltración linfocitaria en el cáncer de mama y respuesta a la QTn.

Estudio	N	Cáncer mama	Determinación TIL	TIL	Relación TIL-tumor	Relación TIL -QT	Variación TIL con QT	SLE, SG
Ladoire 2008 ¹⁵⁸	56	QTn Estadio II-III	Determinación IHQ de extensión H-E. Recuento manual semicuantitativo (Black score modificado)	CD3,CD8 FOXP3, Granzym a B, TiA1	Altos niveles CD8 y FOXP3 se relacionan con: No HS, N+, tumores indiferenciados	Niveles altos CD8 preQT en relación RCp	Disminución FOXP3 No variación CD3 y CD8. En RCp: desaparece FOXP3, aumenta CD8, granzyma B y Ti A1	No determinado
DeMaria 2001 ⁵⁵	25	QTn Estadio >T2	Determinación IHQ de extensión H-E. Recuento manual semicuantitativo (Black score modificado) Según localización: linfocitos intratumorales y en estroma (asociados al tumor)	CD3, CD8, TiA1	No HS, N+, tumores indiferenciados	No relación linfocitos pre-QT y respuesta	Aumento de TIL tras QT en tumores con respuesta (+frecuentes CD8)	No determinado
Hornychova 2008 ¹⁶²	73	QTn Estadio II-IV	Determinación IHQ. Recuento manual, media de tres campos. Según localización: linfocitos intratumorales(a) y estromales(b)	CD3, CD83, CD56, VEGF, CD1a, CD31, CD34, SMA	No determinado	Pacientes con RCp mayor infiltración preQT por CD3 (ayb) y CD83 (a)	Disminución: CD68(b), VEGF(ayb) y Ki67 Aumento: CD3 (b), CD56(b), CD83 (b), CD1a, CD31, CD34, SMA	No determinado
Denkert 2010 ⁵⁴	1058	QTn Estadio II-III	Según localización de linfocitos: intratumorales y estromales (alejados del tumor) Determinación IHQ en tejido H-E, digitalización y recuento mediante <i>VMscope slide explorer</i> Adicional en 134 muestras: determinación de expresión génica mediante RT-PCR de <i>CD3D</i> , <i>CD247</i> (<i>CD3z</i>), <i>PTPRC</i> (<i>CD45</i>), <i>IGKC</i> , <i>CXCL9</i> , <i>CXCL13</i> , <i>RPL37A</i>	CD3, CD20	No determinado	TIL > 60% aumenta RCp (42 vs 3%) Alta expresión génica en relación con infiltración linfocitaria alta y aumento RCp	No determinado	No determinado
Ono 2012 ¹⁵⁹	92	QTn Estadio II-III	<u>Score de proporción:</u> Proporción área estroma, con infiltración linfocitaria alrededor de nidos tumorales. 0-3 según ausencia, 10 ó 10-50 ó >50% <u>Score de intensidad:</u> 0-2, según ausencia, intensidad media ó marcada <u>TIL score</u> es la suma de ambos scores. TIL bajos= 0-2; TIL altos =3-5	No determina do	Altos niveles TIL más frecuente en triple negativo, Her2- y no hormonosensibles	Infiltración alta TIL supone mayor tasa de RCp (34 vs 10% p=0,0001)	No determinado	No diferencias significativas
Yamaguchi 2012 ¹⁶⁰	68	QTn Estadio II-III	Densidad TIL: <u>Ausente</u> <u>Débil:</u> linfocitos ocasionales en estroma tumoral y peritumoral <u>Moderado:</u> Intermedio <u>Denso:</u> Infiltrado denso en márgenes tumorales y estroma.	CD3, CD20	Altos niveles TIL más frecuente en triple negativo, Her2- y no hormonosensibles	Infiltración alta TIL supone mayor tasa de RCp	No determinado	No determinado

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

1. Hipótesis

Hipótesis principal: La respuesta inmune en el microambiente tumoral y sus modificaciones con la quimioterapia neoadyuvante, caracterizadas mediante la evaluación de la presencia y el tipo de infiltrado linfocitario tumoral (TIL) en el cáncer de mama antes y después del tratamiento, pueden tener valor predictivo para la respuesta a la QT, y comportarse como un factor pronóstico para la supervivencia.

Hipótesis secundaria:

- El tipo de infiltración linfocitaria y su importancia pronóstica y predictiva de respuesta pueden ser diferentes en los distintos subtipos de cáncer de mama (luminal, basal, Her2)

2. Objetivos del estudio

Primer objetivo: Evaluación del tipo de infiltración tumoral linfocitaria previa al tratamiento con QTn en el cáncer de mama, definida por las subpoblaciones T (CD3), CD4, CD8, Treg (Foxp3) y B (CD20), macrófagos (CD68) y de sus modificaciones tras la quimioterapia neoadyuvante.

Segundo objetivo: Determinación del valor predictivo para la respuesta a la QTn y del valor pronóstico de la infiltración linfocitaria tumoral, así como de las modificaciones en la infiltración linfocitaria tumoral con la QTn.

- Análisis de la correlación de la infiltración linfocitaria (global y por subpoblaciones) pre y post-QTn y del cambio inducido por la QTn en el perfil de TIL con la respuesta al tratamiento (en términos de RCp),
- Análisis de la correlación de la infiltración linfocitaria (global y por subpoblaciones) pre y post-QTn y del cambio inducido por la QTn en el perfil de TIL con la supervivencia global y libre de enfermedad.
- Análisis de los resultados en los distintos subtipos de cáncer de mama.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

- 1. Descripción de la población a estudio**
- 2. Diseño del estudio**
- 3. Estudio de la infiltración linfocitaria**
- 4. Análisis estadístico de los datos**

1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO

Se han estudiado pacientes seleccionadas de forma consecutiva y diagnosticadas de cáncer de mama estadios II o III, en las que se ha realizado tratamiento de QT neoadyuvante, de forma homogénea con antraciclinas y taxanos y en las que se dispone de biopsia pre- y post-tratamiento.

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

1.1 Estudio de la mama

Incluyó la exploración física completa de la paciente, con especial atención de las mamas, axilas y fosas infra y supraclaviculares. Las pacientes fueron sometidas a mamografía, ecografía de mama, resonancia magnética de mama. Se llevó a cabo una biopsia con aguja gruesa (BAG) del tumor primario para el estudio histológico e inmunohistoquímico de la neoplasia de mama.

1.2 Estudio de la axila

Para el estudio axilar se realizó exploración clínica, ecografía axilar, y punción aspiración con aguja fina en caso de sospecha clínica y/o ecográfica de afectación axilar tumoral. La biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) se realizó en mujeres con estudio axilar negativo y con tumores primarios menores de 3 cm (en aquellas diagnosticadas previamente al 2008; el límite de tamaño se aumentó hasta 5 cm posteriormente).

1.3 Estudio de extensión

Además de analítica completa con marcadores tumorales, en las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama estadio II se realizó Rx Tórax, ecografía abdominal y gammagrafía ósea. En los tumores de mama estadio III se realizó TAC de tórax y abdomen superior y gammagrafía ósea. Por último se realizó ecocardiografía a las pacientes mayores de 65 años con factores de riesgo cardiovasculares, mujeres cardiopatas y en mujeres candidatas a tratamiento con trastuzumab.

La valoración de la respuesta al tratamiento tras cada ciclo fue llevada a cabo con la exploración física. En el estudio intermedio tras cuatro ciclos de QT se realizó mamografía y ecografía, mientras que la valoración final de la respuesta del tumor de mama a la QT se realizó con resonancia magnética de mama. En caso de progresión durante la quimioterapia se indicó cirugía de rescate.

1.4 Tratamiento

Todas las pacientes recibieron QT con antraciclinas y taxanos, según los esquemas habituales. El esquema NSABP-B27 (Adriamicina: 60 mg/m² y Ciclofosfamida: 600 mg/m² x 4 ciclos, seguido de Docetaxel 100 mg/m² x4 ciclos, fue el esquema más empleado. Además, se administró trastuzumab en caso de sobreexpresión de Her2 en las pacientes diagnosticadas a partir del 2005. La cirugía se llevó a cabo entre la cuarta y quinta semana tras la administración del último ciclo de quimioterapia en la mayoría de los casos. Tras la cirugía las pacientes recibieron tratamiento de radioterapia y/o hormonoterapia adyuvante si estaba indicado.

1.5 Seguimiento

Se ha actualizado el seguimiento a Noviembre/12 para el análisis de supervivencia global y libre de enfermedad.

2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se han recogido de forma retrospectiva los datos clínicos y anatomopatológicos de las pacientes incluidas, mediante la revisión de las historias clínicas de las mismas.

Los datos clínicos recogidos se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Datos clínicos	
Edad	
Antecedentes personales de cáncer de mama No Si	
Status menopáusico Postmenopausia Premenopausia	
Motivo de neoadyuvancia Cáncer de mama operable Cáncer de mama localmente avanzado	
Motivo de consulta Cribado Paciente	
Estadio clínico IIA IIB IIIA IIIB IIIC	
Estadio clínico tumor primario Tx T1 T2 T3 T4a T4b T4c T4d	
Estadio clínico ganglionar N0 N1 N2 N3	
Estudio axilar al diagnóstico Axila clínicamente palpable Axila ecográficamente positiva Axila ecográficamente dudosa PAAF positiva BSGC realizada Positividad BSGC	

Los datos anatomopatológicos del tumor fueron extraídos de los informes de anatomía patológica de las BAG realizadas al diagnóstico, así como de los informes anatomopatológicos de la pieza de la cirugía. En la tabla 12 se muestran los datos anatomopatológicos al diagnóstico y en la tabla 13 los datos anatomopatológicos del tumor tras la administración de QTn.

Para el posterior análisis de los datos se recodificaron variables como: hormonosensibilidad (si/no), en caso de positividad o negatividad de receptores de estrógenos y progesterona; Sobreexpresión de Her2 (si/no) en caso de positividad independientemente de la técnica.

Tabla 12. Datos anatomopatológicos al diagnóstico	
Tipo histológico Ductal Lobulillar Otros	
Grado histológico GI GII GIII	
Afectación linfovascular No Si	
Carcinoma in situ en BAG diagnóstica Ausente Presente	
Receptores de estrógeno y progesterona Negativos 1-10% 11-50% 51-80% 81-100%	
Sobreexpresión Her2 Total Herceptest positivo FISH positivo	

Se realizó a demás una clasificación IHQ para la determinación del fenotipo tumoral, según la siguiente clasificación:

- Hormonosensible: RE + y/o RP + y Her2-
- Hormonosensibles Her2: RE + y/o RP+ y Her2+
- Her2+: RE- y RP- y Her2+
- Triple negativo: RE- y RP- y Her2-

Tabla 13. Datos anatomopatológicos tras la QT	
Estadio patológico 0 IA IB IIA IIB IIIA IIIB IIIC	
Respuesta completa patológica Estadio patológico 0 RCp tumor primario RCp ganglionar	
Estadio patológico tumor primario ypTo ypTis ypTmic ypT1a ypT1b ypT1c ypT2 ypT3 ypT4a ypT4b ypT4c ypT4d ypTx	
Estadio patológico ganglionar pNx pN0i- pN0i+ pN1mic pN1a pN1b pN1c pN2a pN2b pN3a pN3b pN3c	
Afectación extracapsular ganglionar No Si	
Tipo histológico Ductal Lobulillar Otros	
Grado histológico GI GII GIII	
Multicentricidad en tumor residual Ausente Presente	
Afectación linfovascular No Si	
Multifocalidad en tumor residual Ausente Presente	
Carcinoma in situ en tumor residual Ausente Presente	
Receptores estrógenos y progesterona Negativos 1-10% 11-50% 51-80% 81-100%	
Sobreexpresión Her2 Total Herceptest positivo FISH positivo	

Así mismo fueron recogidos los datos relacionados con el tratamiento administrado a las pacientes (tabla 14)

Tabla 14. Datos de tratamiento.	
Esquema de tratamiento ACx4 – Docetaxelx4 Antraciclinas y Paclitaxel semanal Esquemas sin antraciclinas Esquemas con antraciclinas sin taxano Esquemas antraciclinas y taxanos concomitantes No dato	
Tratamiento con Trastuzumab No Neoadyuvante y adyuvante Sólo adyuvante	
Cirugía Mastectomía Cirugía conservadora Cirugía conservadora y mastectomía de rescate Cirugía conservadora y ampliación de márgenes Linfadenectomía <5 ganglios resecados 6-9 ganglios resecados 10-15 ganglios resecados 16-20 ganglios resecados 21-25 ganglios resecados >25 ganglios resecados	

Como datos de seguimiento fueron recogidos la fecha de muerte y sus causas, la fecha de recaída y los lugares de la misma (local, Contralateral, a distancia: pulmonar, ósea, hepática, ganglionar y cerebral). Se calculó la supervivencia global (SG) desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de muerte, la supervivencia libre de enfermedad (SLE) desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de recaída y la supervivencia libre de enfermedad a distancia desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de recaída a distancia.

3. ESTUDIO DE LA INFILTRACIÓN LINFOCITARIA TUMORAL

Se ha construido un microarray de tejidos con muestras pareadas previas y posteriores a la QTn de todas las pacientes en las que se disponía de muestra histológica suficiente. Todas las muestras pre y post-tratamiento se han incluido por duplicado, y se han añadido además, controles de tejido mamario, hígado y amígdala normales.

Se han realizado tinciones inmunohistoquímicas del microarray de tejidos para CD4, CD8, CD3, CD20, CD68 y Foxp3. Para ello se ha utilizado un auto-teñidor (Autostainer Link 48, DAKO) y anticuerpos primarios de la casa DAKO (anti-CD3, # IS503; anti-CD20cy, # M0755; anti-CD4, # IS649 ; anti-CD8, # IS623 ; anti-CD68), excepto para la tinción de Foxp3, que se realizó con un anticuerpo de la casa eBioscience.

Las secciones teñidas del microarray fueron escaneadas a alta resolución con un escáner de portas Leica, modelo Leica SCN400F y las imágenes incluidas en una base de datos de imágenes digitales accesibles online. En colaboración con el servicio de Análisis de Imagen del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia se desarrollaron macros basadas en el programa ImageJ (NCI, NIH) para el análisis cuantitativo automatizado de la infiltración tumoral por poblaciones linfocitarias. Para ello se realizó fotografía de todo el cilindro obtenido en la BAG realizada al diagnóstico del tumor. La cuantificación de la infiltración linfocitaria se realizó mediante la determinación de número de células por mm² en las fotografías obtenidas a cuatro aumentos, Así mismo se determinó el área de la muestra en cada caso para realizar el cálculo proporcional ajustado al área real del cilindro obtenido. Para el cálculo final de la infiltración linfocitaria se realizó la media entre los dos valores obtenidos en las muestras pareadas pre y post-QT.

Para el cálculo de las ratios se realizó el cociente entre poblaciones linfocitarias, en caso de TIL=0 se dio el valor TIL=0,01

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para el análisis estadístico se ha utilizado el programa SPSS 15.0. Inicialmente se ha hecho un análisis descriptivo de las variables categóricas y numéricas y se ha estudiado también la normalidad de los datos mediante los gráficos Q-Q. Además, se ha realizado un análisis exploratorio para ver las potenciales relaciones existentes entre las variables; para ello se han empleado tablas de contingencia para variables categóricas (o discretas con pocas modalidades).

Para la expresión cuantitativa de las poblaciones linfocitarias empleamos la media +/- SD. Para la expresión de las variaciones de las poblaciones linfocitarias y los ratios empleamos como punto de corte la mediana de los mismos. Para comparar la media de infiltración linfocitaria de las diferentes poblaciones linfocitarias, según las diferentes características clínico-patológicas relevantes del tumor se ha utilizado la prueba T de Student para muestras independientes en el caso de variables normales, la prueba U de Mann-Whitney (en las que no tenían distribución normal) y el test de ANOVA. En caso de muestras apareadas utilizamos la T de Student para muestras apareadas o bien el contraste no paramétrico de Wilcoxon para determinar si las poblaciones linfocitarias tienen relación entre sí.

Para determinar el valor predictivo para la RCp de las distintas variables de infiltración linfocitaria se construyeron modelos univariantes y multivariantes de regresión logística binaria. Para el análisis de supervivencia (SG: global; SLE: libre de enfermedad; SLED: libre de enfermedad a distancia) se utilizaron curvas de Kaplan-Meier. El análisis univariante del valor para la supervivencia de las distintas variables clínicas y patológicas se realizó con el test de los rangos logarítmicos (log-rank). Para el análisis multivariante se construyeron modelos utilizando el método de regresión de Cox (riesgos proporcionales).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. *Estudio descriptivo de la serie clínica*
 - 1.1 *Estudio descriptivo de las características tumorales*
 - 1.2 *Estudio del valor predictivo de respuesta de las características tumorales.*
 - 1.3 *Estudio del valor pronóstico de las características tumorales.*
 - 1.4 *Conclusiones del estudio de las características tumorales*
2. *Estudio de la infiltración linfocitaria basal*
 - 2.1 *Estudio descriptivo de la infiltración linfocitaria basal*
 - 2.2 *Estudio del valor predictivo de respuesta de la infiltración linfocitaria basal*
 - 2.3 *Estudio del valor pronóstico de la infiltración linfocitaria basal*
 - 2.4 *Conclusiones del estudio de la infiltración linfocitaria basal*
3. *Estudio de la variación de la infiltración linfocitaria con la quimioterapia*
 - 3.1 *Estudio descriptivo de la variación de la infiltración linfocitaria con la quimioterapia*
 - 3.2 *Estudio del valor predictivo de respuesta de la variación de la infiltración linfocitaria con la quimioterapia*
 - 3.3 *Estudio del valor pronóstico de la infiltración variación de la infiltración linfocitaria con la quimioterapia*
 - 3.4 *Conclusiones del estudio de la variación de la infiltración linfocitaria con la quimioterapia*

- 4. Estudio de la infiltración linfocitaria tras la quimioterapia**
 - 4.1 Estudio descriptivo de la infiltración linfocitaria tras la quimioterapia**
 - 4.2 Estudio del valor pronóstico de la infiltración linfocitaria tras la quimioterapia**
 - 4.3 Conclusiones del estudio de la infiltración linfocitaria tras la quimioterapia**

1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA SERIE CLÍNICA.

1.1. Estudio descriptivo de las características tumorales.

Se han incluido 121 pacientes con cáncer de mama estadio II–III diagnosticadas entre 2001 – 2008; la mayoría de las pacientes fueron diagnosticadas en el periodo comprendido entre 2004 - 2008, y todas ellas fueron sometidas a tratamiento con quimioterapia neoadyuvante. Las características clínicas y anatomopatológicas al diagnóstico se muestran en la tabla 15. La edad media de las pacientes fue de 56 años (rango, 21 – 79). En el 50% de los casos las pacientes eran premenopáusicas al diagnóstico. El 54,5% presentaban un cáncer de mama operable al diagnóstico no susceptible de cirugía conservadora. El 15,7% de las paciente presentaban un estadio IIA al diagnóstico, 28% IIB, 33% IIIA, 6,6% IIIB y un 16,5% estadio IIIC. El tumor era mayor de 5 cm en el 47% de las pacientes. En el 93% de los casos el tipo histológico era ductal, el 49,6% de los tumores eran GIII y el 17,4% de las pacientes presentaban tumores con afectación linfovascular al diagnóstico. En cuanto a las características IHQ de los cánceres de mama, se ha objetivado un 32% de negatividad en receptores de estrógeno, receptores de progesterona o ambos (no hormonosensibilidad), y sobreexpresión de Her2 en el 24% de los casos. Según la clasificación IHQ realizada, el 50,4% de las pacientes presentaban tumores hormonosensibles; 13,2% eran hormonosensibles Her2+; 10,7% Her2+; 21,5% triple negativo y el 4% de los casos no fueron clasificables por falta de datos.

El 55% de las pacientes presentaban metástasis ganglionares confirmadas citológicamente al diagnóstico. En gran parte de los casos restantes, y como parte del estudio de extensión, se realizó biopsia selectiva del ganglio centinela (23% de las pacientes), siendo positiva en el 32% de los casos estudiados (7,4% del total de pacientes). El escaso porcentaje de positividad de la técnica es atribuible al estudio radiológico y citológico detallado de la axila que se realiza habitualmente en nuestro centro.

Tanto el esquema de quimioterapia administrado, como la cirugía realizada se resumen en la tabla 2. El 80,2% de las pacientes recibieron quimioterapia neoadyuvante (QTn) con el esquema ACx4 seguido de Docetaxel x4. Se utilizó paclitaxel semanal tras las antraciclinas en el 8,3% de las pacientes. En 1,7% de las pacientes se administraron esquemas sin antraciclinas y el 3,3% de las pacientes recibieron esquemas sin taxanos. Un 4% (n=5) de las pacientes recibieron trastuzumab solo de forma adyuvante; en cuatro de los casos sus diagnósticos fueron previos a los estudios pivotaes de trastuzumab, por lo que este se inició en los meses siguientes a la cirugía; la quinta paciente presentaba tumor Her2- al diagnóstico, pero en el tumor residual se encontró sobreexpresión de Her2. Por otro lado, 8 pacientes que presentaban tumores Her2+ al diagnóstico no recibieron tratamiento con trastuzumab en la neoadyuvancia, ni en la adyuvancia, ya que el diagnóstico de los tumores fue previo a la aprobación de trastuzumab en este contexto.

Tabla 15. Características clínico-patológicas al diagnóstico		
N	121	100%
Edad	56,4	(21-79)
Antecedentes familiares cáncer mama		
No	97	80,2
Si	23	19,0
Desconocido	1	0,8
Status menopáusico		
Postmenopausia	60	49,6
Premenopausia	61	50,4
Motivo de neoadyuvancia		
Cáncer de mama operable	66	54,5
Cáncer de mama localmente avanzado	55	45,5
Motivo de consulta		
Cribado	23	19,0
Síntomas	98	81,0
Estadio clínico		
IIA	19	15,7
IIB	34	28,1
IIIA	40	33,1
IIIB	8	6,6
IIIC	20	16,5
Estadio clínico tumor primario		
T1-2	52	43,0
T3-4	69	57,0
Estadio clínico ganglionar		
N0-1	75	62,0
N2-3	46	38,0
Tipo histológico		
Ductal	113	93,4
Lobulillar	5	4,1
Otros	3	2,5
Grado histológico		
GI-II	46	38,0
GIII	61	54,4
No disponible	14	11,6
Afectación linfovascular		
No	90	74,4
Si	22	18,2
No disponible	9	7,4
Carcinoma in situ en BAG diagnóstica		
Ausente	50	45,5
Presente	60	54,5
No disponible	11	9,1
Receptores estrógenos y progesterona		
No hormonosensible	39	32,2
Hormonosensible	80	66,1
No disponible	2	1,7
Sobreexpresión Her2		
Negativo	87	71,9
Positivo	29	24,0
No disponible	5	4,1
Triple negativo		
No	90	74,4
Si	26	21,5
No disponible	5	4,1
Subtipos IHQ pre-quimioterapia		
Hormonosensible	61	50,4
Hormonosensible HER2+	16	13,2
HER2NEU+	13	10,7
Triple Negativo	26	21,5
No disponible	5	4,1
Estudio axilar al diagnóstico		
Axila clínicamente palpable	62	51,0
Axila ecográficamente positiva	81	67,5
Axila ecográficamente dudosa	5	4,2
PAAF positiva	67	72,8
BSGC realizada	28	23,1
Positividad BSGC	9	7,4

En cuanto al tipo de cirugía realizada tras la quimioterapia, la tasa de cirugía conservadora fue 41,3%, si bien se realizó ampliación de márgenes en el 2,5% de las pacientes y el 4% de las mismas requirió una mastectomía de rescate tras la cirugía conservadora inicial. Se realizó linfadenectomía en el 86% de las pacientes, obteniéndose al menos diez ganglios linfáticos en el 97,5% de los casos (tabla 16).

Tabla 16. Datos de tratamiento		
N	121	100%
Esquema de tratamiento		
ACx4 – Docetaxelx4	97	80,2
Antraciclinas y Paclitaxel semanal	10	8,3
Esquemas sin antraciclinas	2	1,7
Esquemas con antraciclinas sin taxano	4	3,3
Esquemas antraciclinas y taxanos concomitantes	8	6,6
Quimioterapia adyuvante		
No	107	88,4
Si	14	11,6
Tratamiento con Trastuzumab		
No	99	81,8
Neoadyuvante y adyuvante	17	14,0
Sólo adyuvante	5	4,1
Cirugía		
Mastectomía	62	51,7
Cirugía conservadora	50	41,3
Cirugía conservadora y mastectomía de rescate	5	4,1
Cirugía conservadora y ampliación de márgenes	3	2,5
No disponible	1	0,8
Linfadenectomía		
<5 ganglios reseca		
6-9 ganglios reseca	104	86,0
10-15 ganglios reseca	1	0,8
16-20 ganglios reseca	2	1,7
21-25 ganglios reseca	28	23,1
>25 ganglios reseca	29	24,0
No disponible	19	15,7
	25	20,7
	2	1,7

Respuesta a la quimioterapia y relación con las características clínico-anatomopatológicas tumorales.

Se alcanzó un 17,4% de respuestas completas patológicas (RCp), definida como ypT0/ypTis ypN0; en el 20,8% de las pacientes se objetivó RCp a nivel del tumor primario y hasta 26,4% de RCp axilares. La distribución de estadios patológicos tras la QTn fue: 17,4% estadio 0; 9,9% estadio IA; 24% IIA; 16,5% IIB; 22,3% IIIA; 2,5% IIIB y 5,8% estadio IIIC. En el estudio IHQ del tumor residual se han encontrado los siguientes datos: 17,4 % de los tumores con negatividad en receptores de estrógeno, en receptores de progesterona o ambos; 6,6 % con sobreexpresión de Her2. Los resultados de la clasificación IHQ del tumor residual son los siguientes: 52,1% hormonosensibles; 5% hormonosensibles Her2+; 2,5%, Her2+; 13,2% triple negativo; el 6,6% de las pacientes no eran clasificables por falta de alguno de los datos (tabla 17). Por tanto, se observó un mayor porcentaje de hormonosensibilidad y una menor frecuencia de Her2 en el tumor residual.

Tabla 17. Datos anatomo-patológicos del tumor residual.		
N	121	100 %
Estadio patológico		
0	20	17,4
IA	12	9,9
IB	0	0,0
IIA	29	24,0
IIIB	20	16,5
IIIA	27	22,3
IIIB	3	2,5
IIIC	7	5,8
No disponible	1	1,7
Respuesta completa patológica		
RCp global (ypT0/Tis ypN0)	21	17,4
RCp tumor primario (ypT0/Tis)	25	20,7
RCp ganglionar (ypN0)	32	26,4
Estadio patológico tumor primario		
ypTo	17	14,0
ypTis	8	6,6
ypTmic	4	3,3
ypT1a	5	4,1
ypT1b	6	5,0
ypT1c	11	9,1
ypT2	42	34,7
ypT3	20	16,5
ypT4a	0	0,0
ypT4b	1	0,8
ypT4c	0	0,0
ypT4d	5	4,1
ypTx	1	0,8
No disponible	1	0,8
Estadio patológico ganglionar		
pN0i-	43	37,2
pN0i+	0	0,0
pN1mic	6	5,0
pN1a	22	18,2
pN1b	0	0,0
pN1c	1	0,8
pN2a	23	19,0
pN2b	0	0,0
pN3a	7	5,8
pN3b	0	0,0
pN3c	0	0,0
No realizada linfadenectomía	16	13,2
Grado histológico		
GI	18	15,5
GII	40	34,5
GIII	31	26,7
No disponible	32	26,4
Multicentricidad en tumor residual		
Ausente	86	71,1
Presente	11	9,1
No disponible	24	19,8
Afectación linfovascolar		
No	74	61,2
Si	43	35,5
No disponible	4	3,3
Multifocalidad en tumor residual		
Ausente	66	54,5
Presente	32	26,4
No disponible	23	19,0
Carcinoma in situ en tumor residual		
Ausente	32	26,4
Presente	85	70,2
No disponible	4	3,3
Receptores estrógenos y progesterona		
No hormonosensible	21	17,4
Hormonosensible	70	57,9
No disponible (RCp y No disponible)	30	24,8
Sobreexpresión HER2NEU		
Negativo	79	65,3
Positivo	8	6,6
No disponible (RCp y No disponible)	34	28,1
Triple negativo		
No	72	59,5
Si	16	14,3
No disponible (RCp y No disponible)	33	27,3
Subtipos IHQ en el grupo sin RCp		
Hormonosensible	63	52,1
Hormonosensible HER2+	6	5,0
HER2NEU+	3	2,5
Triple Negativo	16	13,2
No disponibles	8	6,6

1.2. Estudio del valor predictivo de respuesta de las características tumorales.

En el análisis de la tasa de RCp según el fenotipo tumoral se objetivan diferencias significativas entre los diferentes subtipos, (tabla 18) estadio patológico 0 ($p < 0,001$) y la RCp en el tumor primario ($p < 0,001$), aunque no para la RCp axilar ($p = 0,4$).

Tabla 18. Relación de la respuesta patológica con fenotipo tumoral

	N	Estadio patológico 0	RCp tumor primario	RCp ganglionar
Todas las pacientes	121 (100%)	21 (17,4%)	25 (20,8%)	32 (26,4%)
Hormonosensibles	61 (50,4%)	2 (3,3%)	3 (4,9%)	12 (19,7%)
Hormonosensibles HER2+	16 (13,2%)	3 (18,8%)	3 (18,8%)	4 (25,0%)
Her2+	13 (10,7%)	8 (61,5%)	8 (61,5%)	6 (46,2%)
Triple negativo	26 (21,5%)	7 (26,9%)	7 (26,9%)	10 (38,5%)

En el análisis univariante de las características clínico-patológicas en relación con la RCp encontramos que la hormonosensibilidad, el grado histológico tumoral, la sobreexpresión de Her2 y los subtipos IHQ tumorales eran factores predictivos de RCp (tabla 19).

Tabla 19. Análisis univariante: características clínico-anatomopatológicas y RCp

Variable independiente	p	OR	IC 95% Inferior-superior
Estatus menopáusico: premenopausia	0,20	1,87	0,71 - 4,91
Edad: >40 años	0,65	0,75	0,22 - 2,57
Estadio clínico: IIIA-IIIC	0,59	1,30	0,49 - 3,41
Estadio clínico tumor primario: T3-4	0,31	1,66	0,61 - 4,48
Estadio clínico ganglionar: N2-3	0,33	1,59	0,61 - 4,11
Tipo histológico	0,96	1,03	0,29 - 3,67
Grado histológico: grado III	0,006	6,14	1,68 - 22,40
Afectación linfovascular	0,11	0,18	0,02 - 1,49
Hormonosensibilidad	0,0001	0,13	0,04 - 0,37
HER2	0,001	5,22	1,88 - 14,49
Fenotipo tumoral	0,0004	2,08	1,38 - 3,14

Para el análisis multivariante de la RCp se han incluido el fenotipo tumoral (que incluye tanto la hormonosensibilidad como el Her2) y el grado histológico, manteniendo únicamente el fenotipo tumoral el valor predictivo para RCp (tabla 20).

Tabla 20. Análisis multivariante: características clínico-anatomopatológicas y RCp

Variable independiente	p	OR	IC 95% Inferior-superior
Grado histológico	0,075	3,49	0,88 - 13,81
Fenotipo tumoral	0,006	1,87	1,19 - 2,93

1.3. Estudio del valor pronóstico de las características tumorales.

La mediana de seguimiento de las pacientes ha sido de 60 meses (punto de corte en Noviembre 2012). Aún no se ha alcanzado la mediana de la supervivencia global (SG), de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) ni de la supervivencia libre de enfermedad a distancia (SLED).

El 18% (n=22) de las pacientes han fallecido: 19 de las pacientes fallecidas murieron debido a la enfermedad, una paciente murió por toxicidad durante el tratamiento (fiebre neutropénica), una paciente murió por insuficiencia cardíaca y una paciente murió a causa de un carcinosarcoma uterino que desarrolló durante el seguimiento del cáncer de mama. Se ha observado un 23,1% de recaídas: el 13,3% fueron a distancia, el 5,8% locales y a distancia de forma concomitante, y el 3,3% recaídas locales. La recaída a distancia más frecuente fue en localización ósea (9,2%), seguida de la recaída pulmonar (7,5%) y la ganglionar (6,7%) (tablas 21 y 22). En la figura 10 se muestran las curvas de supervivencia en el grupo completo.

Tabla 21. Recaídas		
N	121	100%
Recaída		
Totales	28	23,1
Locales	4	3,3
Contralateral	1	0,8
A distancia	16	13,3
Local y a distancia	7	5,8

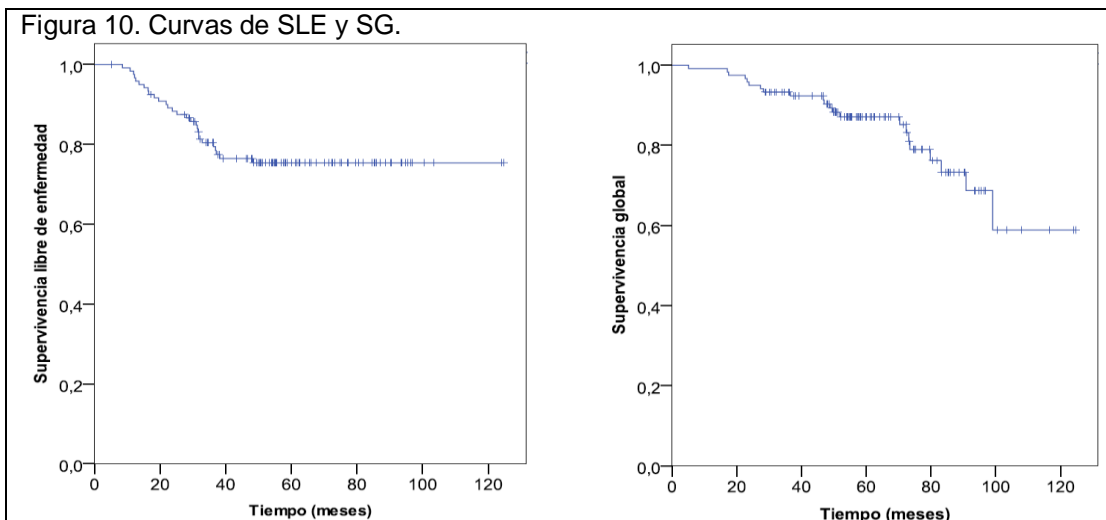
Tabla 22. Recaídas a distancia		
N	121	100%
Recaídas a distancia		
Pulmonar	9	7,5
Ósea	11	9,2
Hepática	6	5,0
Ganglionar	8	6,7
Cerebral	3	2,5
Otras	3	2,5

En el análisis de supervivencia realizado se ha objetivado que la presencia de RCp ganglionar es factor de buen pronóstico para SLE ($p < 0,001$), SLED ($p < 0,001$) y SG ($p = 0,02$). Además, la existencia de RCp global es factor de buen pronóstico para SLE ($p = 0,04$) (figura 11). En el análisis realizado según las características clínico-patológicas relevantes se ha demostrado que la presencia de afectación linfovascular al diagnóstico se correlaciona con peor SLE ($p = 0,03$) y SLED ($p = 0,04$); además, la afectación ganglionar voluminosa al diagnóstico ha sido identificada como factor de mal pronóstico para SG ($p = 0,01$), SLE ($p = 0,004$) y SLED ($p = 0,002$) (tabla 23).

Tabla 23. Análisis de supervivencia según las características anatomoclínicas al diagnóstico.

	SLE (log-rank)	SLED (log-rank)	SG (log-rank)
RCp global	p=0,04	p=0,06	p=0,68
RCp ganglionar	p=0,00006	p=0,00001	p=0,02
RCp primario	p=0,16	p=0,23	p=0,86
Hormonosensibilidad	p=0,26	p=0,78	p=0,10
Grado histológico: GIII	p=0,09	p=0,23	p=0,11
Afectac. linfovascular	p=0,03	p=0,04	p=0,11
Sobreexpresión Her2	p=0,74	p=0,92	p=0,73
Fenotipo tumoral	p=0,43	p=0,91	p=0,22
Estadio clínico: IIIA_IIIC	p=0,16	p=0,13	p=0,31
E. clínico tumoral: T3-4	p=0,06	p=0,07	p=0,12
E. clínico ganglionar: N2-3	p=0,004	p=0,002	p=0,01
Estatus menopáusico: premenopausia	p=0,75	p=0,82	p=0,58
Edad: >40 años	p=0,33	P=0,17	p=0,35

Figura 10. Curvas de SLE y SG.

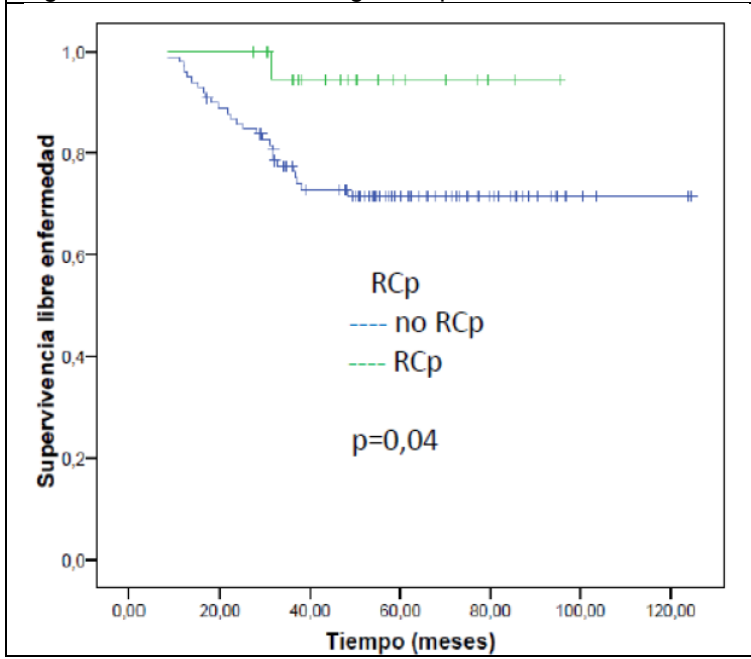


Para el análisis multivariante para SLE se realizó una regresión de Cox, incluyendo las diferentes características clínico-anatomopatológicas no interrelacionadas que hubieran demostrado valor pronóstico para SLE en el análisis univariante. El modelo final incluyó el estadio clínico ganglionar al diagnóstico y la RCp tras la QTn, mientras que el fenotipo tumoral perdió su valor independiente para la SLE (tabla 24). En el análisis multivariante para la SG solamente el estadio ganglionar al diagnóstico conservó su valor predictivo independiente.

Tabla 24. Análisis multivariante: características clínico-anatomopatológicas y supervivencia.

Variable independiente	SLE			SG		
	p	OR	IC 95% Inf - sup	p	OR	IC 95% Inf - sup
Estadio clínico ganglionar: N2-3	0,01	2,84	1,25 – 6,43	0,01	3,86	1,38 – 10,77
RCp	0,02	0,10	0,01 - 0,79	0,14	0,21	0,02 – 1,70
Fenotipo tumoral	0,19	1,22	0,90 - 1,65	0,34	1,20	0,81 – 1,76

Figura 11. Curva de SLE según RCp.



1.4 Conclusiones del estudio de las características tumorales.

En esta serie se han analizado 121 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama estadio II-III tratadas con QTn con antraciclinas y taxanos. Se alcanzó un 17% de RCp (ypT0/ypN0), los subtipos tumorales Her2 y triple negativos fueron los que alcanzaron mayor tasa de RCp.

El fenotipo tumoral es factor predictivo de RCp ($p=0,006$).

La RCp es factor de buen pronóstico para SLE ($p=0,02$) y la afectación ganglionar voluminosa es factor de mal pronóstico para SLE ($p=0,01$) y SG ($p=0,01$).

2. ESTUDIO DE LA INFILTRACIÓN LINFOCITARIA BASAL.

2.1. Estudio descriptivo de la infiltración linfocitaria basal.

En 93 pacientes (76%) se dispuso de muestra válida y suficiente para construir un microarray de tejidos con muestras pareadas previas y posteriores a la QTn. En el 94% de las muestras incluidas en el microarray se ha podido hacer una cuantificación microscópica y análisis digital de las imágenes adecuada.

Se han analizado los datos de infiltración linfocitaria pre-QT, según las subpoblaciones de linfocitos CD3, CD4, CD8, FOXP3, CD20 y CD68 (tabla 11). La infiltración media por CD3 pre-QT ha sido de 172,33 ($\pm 334,5$), con una mediana de 35 CD3/mm². La media de CD4/mm² pre-QT fue de 67 ($\pm 123,9$), con una mediana de 4,6 CD4/mm². La infiltración media por CD8 era de 30,2 CD8/mm² ($\pm 101,9$), con una mediana de 0,0 CD8/mm². Se ha observado una infiltración media de 6,9 FOXP3/mm² ($\pm 17,9$), con una mediana de 1,3 FOXP3/mm². La media de CD20 pre-QT fue de 42,08 CD20/mm² ($\pm 83,0$), con una mediana de 1,2 CD20/mm². La infiltración por CD68 pre-QT fue de 33,9 CD68/mm² ($\pm 45,0$), con una mediana de 18,9 CD68/mm². Se ha determinado la tasa de ausencia de infiltración linfocitaria según las diferentes subpoblaciones, es decir, el porcentaje de tumores que al diagnóstico no presentaba infiltración por alguna de las subpoblaciones de TIL; los resultados fueron: 12% de los tumores no tenían TIL CD3, 21% de los tumores sin infiltración por CD4, 76% de los tumores no presentaban células CD8, 24% FOXP3, 28% CD20 y 10% de los casos no mostraban infiltración por CD68 al diagnóstico.

Así mismo, se han correlacionado las subpoblaciones linfocitarias pre-QT con las características principales clínico-anatomopatológicas del tumor; en general no hay relación estadísticamente significativa entre ambas (tabla 11). Como excepciones, hay que destacar que la infiltración pre-QT por CD68 es mayor en tumores cT3-4 ($p=0,02$) que en tumores cT2-T1; también es mayor en tumores no hormonosensibles ($p=0,01$) y muestra una tendencia similar, pero no significativa, en tumores HER2+ ($p=0,06$). Además, la infiltración por macrófagos (CD68) tiende a ser mayor, de nuevo sin alcanzar significación estadística, en los subtipos tumorales IHQ HER2+ y triple negativos ($p=0,06$) que en el resto de los subtipos tumorales. En el análisis realizado de las subpoblaciones de TIL en relación con la edad encontramos que la media de infiltración por CD8 pre-QT era mayor en mujeres mayores de 40 años ($p=0,04$) que en mujeres menores, mientras que en mujeres mayores de 40 años la infiltración por CD20 es en el 100% de los casos mayor a la media de infiltración ($p=0,05$). En la tabla 25 se muestra la infiltración linfocitaria pre-QT por las diferentes subpoblaciones de TIL, según las principales características clínico-anatomopatológicas del tumor.

Tabla 25. Subpoblaciones linfocitarias y características clínico-anatomopatológicas del tumor al diagnóstico.

	CD3/mm ² pre-QT media±DE	CD4/mm ² pre-QT media±DE	CD8/mm ² pre-QT media±DE	FOXP3/mm ² pre-QT media±DE	CD20/mm ² pre-QT media±DE	CD68/mm ² pre-QT media±DE
Estatus menopáusico Premenopausia Postmenopausia	126,40 ± 213,74 212,21 ± 410,67 p=0,47	65,16 ± 116,17 69,23 ± 131,73 p=0,32	52,11 ± 136,19 11,20 ± 52,86 p=0,15	3,82 ± 6,0 9,94 ± 24,1 p=0,82	41,42 ± 86,61 42,69 ± 80,84 p=0,98	36,83 ± 53,01 31,29 ± 37,18 p=0,83
Edad <40 años >40 años	97,21 ± 93,95 100,99 ± 121,57 p=0,80	17,38 ± 32,80 75,26 ± 131,15 p=0,09	26,19 ± 40,89 30,90 ± 108,77 p=0,04	3,55 ± 5,80 7,49 ± 19,15 p=0,56	3,85 ± 6,85 48,35 ± 88,07 p=0,13	20,49 ± 18,07 35,95 ± 47,64 p=0,62
Tipo histológico Ductal Lobulillar	77,64 ± 344,64 40,11 ± 52,48 p=0,45	69,47 ± 126,55 1,05 ± 1,41 p=0,16	32,48 ± 105,36 0,00 ± 0,00 p=0,45	7,47 ± 18,60 0,79 ± 1,13 p=0,32	42,55 ± 83,83 0,00 ± 0,00 p=0,07	33,81 ± 46,48 28,05 ± 13,21 p=0,65
Estadio clínico IIA IIB IIIA IIIB IIIC cT1-cT2 cT3 -cT4 cN0-cN1 cN2-cN3	69,80 ± 655,99 167,04 ± 276,15 59,27 ± 80,58 61,52 ± 87,49 237,29 ± 237,73 248,04 ± 467,68 120,05 ± 186,55 186,92 ± 386,58 143,74 ± 200,88 p=0,09 p=0,24 p=0,38	82,34 ± 141,24 81,28 ± 146,92 56,23 ± 120,51 18,30 ± 34,77 65,67 ± 96,43 65,81 ± 113,96 68,39 ± 131,69 81,70 ± 141,51 39,74 ± 75,00 p=0,87 p=0,44 p=0,29	39,69 ± 94,39 20,65 ± 73,42 49,08 ± 149,87 27,95 ± 55,90 2,26 ± 7,31 48,50 ± 136,14 18,23 ± 70,50 31,03 ± 92,09 28,85 ± 119,75 p=0,73 p=0,77 p=0,49	6,52 ± 20,37 6,79 ± 8,42 7,34 ± 26,56 6,38 ± 8,12 7,19 ± 8,91 4,97 ± 13,29 8,45 ± 20,85 5,22 ± 11,83 10,39 ± 26,20 p=1,00 p=0,42 p=0,38	14,01 ± 35,85 58,78 ± 99,09 25,88 ± 73,23 4,20 ± 7,43 83,91 ± 101,89 52,18 ± 97,67 35,11 ± 71,69 29,88 ± 70,01 64,53 ± 100,58 p=0,12 p=0,48 p=0,72	14,53 ± 18,19 38,08 ± 46,98 41,56 ± 58,40 45,75 ± 45,91 30,47 ± 35,51 23,27 ± 37,92 41,83 ± 48,78 31,98 ± 47,31 37,62 ± 41,40 p=0,56 p=0,02 p=0,48
Grado histológico G I - II G III	176,03 ± 429,62 194,93 ± 254,43 p=0,72	46,77 ± 98,57 96,22 ± 145,74 p=0,45	21,38 ± 62,66 26,11 ± 91,36 p=0,40	4,73 ± 13,01 10,14 ± 22,65 p=0,94	13,37 ± 34,76 66,78 ± 99,00 p=0,07	23,42 ± 26,50 46,47 ± 58,77 p=0,22
Afectación linfovascular Ausente Presente	191,12 ± 361,43 88,47 ± 151,15 p=0,23	70,51 ± 131,89 51,16 ± 72,42 p=0,90	34,38 ± 111,34 11,21 ± 31,08 p=0,66	7,59 ± 19,72 4,06 ± 3,65 p=0,29	44,27 ± 84,91 32,32 ± 76,57 p=0,56	36,56 ± 48,70 23,15 ± 24,10 p=0,64
Hormonosensibilidad No Si	205,93 ± 276,81 158,54 ± 365,28 p=0,60	83,58 ± 144,89 60,12 ± 113,03 p=0,58	40,14 ± 134,30 25,64 ± 82,28 p=0,63	12,08 ± 26,44 4,45 ± 11,17 p=0,11	72,59 ± 112,74 26,07 ± 56,66 p=0,40	51,17 ± 50,02 25,67 ± 41,00 p=0,01
Sobreexpresión Her2 Negativo Positivo	169,34 ± 359,42 188,41 ± 277,85 p=0,65	51,19 ± 101,74 109,73 ± 163,09 p=0,25	35,18 ± 112,50 18,97 ± 71,98 p=0,58	6,22 ± 12,27 9,07 ± 27,70 p=0,83	35,53 ± 78,08 60,56 ± 95,53 p=0,14	27,10 ± 40,97 50,68 ± 51,98 p=0,06
Subgrupos IHQ RE+ y/o RP+ y Her2- RE+ y/o RP+ y Her2+ RE- y RP- y Her2+ RE- y RP- y Her2-	180,37 ± 408,12 179,95 ± 103,04 296,86 ± 355,28 140,98 ± 193,08 p=0,52	57,53 ± 112,98 68,58 ± 118,26 155,00 ± 198,05 35,97 ± 68,58 p=0,10	31,09 ± 91,94 5,47 ± 14,82 32,46 ± 101,56 45,25 ± 155,63 p=0,83	5,01 ± 12,55 2,58 ± 3,62 15,57 ± 38,90 9,39 ± 11,33 p=0,33	26,86 ± 57,74 23,31 ± 55,56 97,81 ± 114,44 55,77 ± 112,30 p=0,08	24,01 ± 43,15 31,39 ± 34,15 69,97 ± 61,15 35,79 ± 34,40 p=0,06

2.2. Estudio del valor predictivo de respuesta de la infiltración linfocitaria basal.

Se ha analizado la posible asociación existente entre la infiltración por linfocitos y macrófagos pre-QT con la respuesta inducida por quimioterapia neoadyuvante. Los datos más relevantes de este análisis son los siguientes:

Relación de la infiltración linfocitaria pre-QT con la respuesta al tratamiento.

Los niveles más elevados de TIL pre-QT: CD3 (324 vs. 138 CD3/mm², p<0,001), CD4 (147 vs. 48 CD4/mm², p=0,003), FOXP3 (8,4 vs. 6,6 FOXP3/mm², p=0,01) y CD20 pre-QT (92,8 vs. 30,7 CD20/mm², p<0,001) se asocian a la aparición de respuesta completa patológica tras QT neoadyuvante (tabla 26).

Tabla 26. TIL pre-QT y RCp				
TIL/mm ² pre-QT media±DE	Total	RCp	No RCp	p
CD3	(n=71) 172,33 ± 334,50	(n=13) 324,33 ± 233,18	(n=58) 138,26 ± 345,70	0,0004
CD4	(n=73) 67,33 ± 123,89	(n=14) 146,94 ± 161,77	(n=59) 48,44 ± 106,28	0,003
CD8	(n=73) 30,25 ± 101,97	(n=13) 3,58 ± 12,93	(n=60) 36,03 ± 111,65	0,15
FOXP3	(n=68) 6,97 ± 17,98	(n=13) 8,37 ± 9,26	(n=55) 6,63 ± 19,53	0,01
CD20	(n=71) 42,08 ± 83,05	(n=13) 92,82 ± 94,10	(n=58) 30,71 ± 76,73	0,0002
CD68	(n=61) 33,92 ± 45,09	(n=12) 55,65 ± 65,73	(n=49) 28,60 ± 37,48	0,12

Debido a este hallazgo, se ha calculado la diferencia de RCp existente entre los tumores con alta y baja infiltración linfocitaria al diagnóstico. Para ello se ha establecido como punto de corte la media de infiltración linfocitaria tumoral, para cada subpoblación linfocitaria (tabla 27). Se ha objetivado, que al igual que en la totalidad de la muestra, la tasa de RCp en cada subtipo de TIL está en torno al 20%. En los tumores con infiltración por CD3, CD4 y CD20 mayor a la media de infiltración se muestra que la tasa de RCp se duplica respecto a la tasa de

RCp objetivada tras la QTn en tumores con infiltraciones menores a la media, siendo este incremento significativo, CD3 ($p<0,001$), CD4 ($p<0,001$), CD20 ($p<0,001$).

Tabla 27. Análisis de la tasa RCp según TIL > media.

TIL > media	Tasa de repuesta no RCp vs. RCp (%)	RCp (%) TIL > media vs. TIL > media	p
CD3	81,7 vs. 18,3	69,2 vs. 30,8	0,0002
CD4	80,8 vs. 19,2	64,3 vs. 35,7	0,0003
CD8	82,2 vs. 17,8	7,7 vs. 92,3	0,49
FOXP3	80,9 vs. 19,1	38,5 vs. 61,5	0,16
CD20	81,7 vs. 18,3	61,5 vs. 38,5	0,0004
CD68	80,3 vs. 19,7	50,0 vs. 50,0	0,26

Estudio de la importancia de la ausencia de infiltración linfocitaria al diagnóstico.

Algunos tumores no presentaban infiltración linfocitaria (TIL=0) por algunas de las subpoblaciones de TIL. Como ya se ha explicado, el porcentaje de este hecho es variable, según las diferentes subpoblaciones, y conlleva una disminución de la tasa de RCp variable según las diferentes subpoblaciones de TIL. La ausencia de infiltración por CD20 ($p=0,01$) y por FOXP3 ($p=0,02$) conlleva una disminución significativa de la tasa de RCp objetivada en cada subtipo (tabla 28).

Tabla 28. Análisis TIL=0 y RCp

TIL = 0	N (%)	Tasa de repuesta No RCp vs. RCp (%)	RCp (%) TIL=0 vs. TIL>0	p
CD3	15 (12%)	81,7 vs. 18,3	7,7 vs. 92,3	0,19
CD4	26 (21%)	80,8 vs. 19,2	14,3 vs. 85,7	0,06
CD8	56 (76%)	82,2 vs. 17,8	92,3 vs. 7,7	0,14
FOXP3	29 (24%)	80,9 vs. 19,1	15,4 vs. 84,6	0,02
CD20	35 (28%)	81,7 vs. 18,3	7,7 vs. 92,3	0,01
CD68	12 (10%)	80,3 vs. 19,7	16,7 vs. 83,3	0,77
TILa*	10 (8,3%)	80,9 vs. 19,1	7,7 vs. 92,3	0,43

*TILa (CD4 + CD8 + CD3 + CD20)

Análisis de ratios entre poblaciones linfocitarias tumorales como factor predictivo de respuesta.

A continuación se exponen los datos del análisis realizado de las ratios FOXP3/CD8, FOXP3/CD3, CD4/CD8 y CD68/CD8, en base a la importancia de la interacción entre las diferentes subpoblaciones linfocitarias comentado previamente. En esta serie, las pacientes que obtuvieron una RCp presentaban una ratio FOXP3/CD8 ($p=0,009$) más elevada que las pacientes que no presentaron RCp con la QTn (tabla 29). Por el contrario, no se ha encontrado una asociación con la respuesta al tratamiento y la ratio FOXP3/CD3. En el análisis la ratio CD4/CD8, las pacientes con RCp tras la QTn presentaban ratios mayores que las no alcanzaron RCp ($p<0,001$).

En el análisis realizado se pone de manifiesto que los tumores que alcanzan RCp tras la QTn presentan ratios más elevados de CD4/CD8 ($p<0,001$), FOXP3/CD8 ($p<0,001$), CD68/CD8 ($p=0,04$) respecto a los tumores que no presentan RCp (tabla 29).

Tabla 29. Relación entre el Ratio de poblaciones linfocitarias y RCp			
RATIOS (media ± DE)	RCp completa	RCp t. primario	RCp axilar
CD4/CD8 No RCp RCp	168,09± 447,68 1576,02±1631,77 p=0,0001	168,09± 447,68 1576,02±1631,77 p=0,0001	155,62 ± 425,41 487,62 ± 836,36 p=0,07
FOXP3/CD3 No RCp RCp	3,85± 18,71 0,11± 0,27 p=0,44	3,85± 18,71 0,11± 0,27 p=0,44	4,26 ± 21,07 0,21± 0,36 p=0,16
FOXP3/CD8 No RCp RCp	59,92 ± 195,63 82,29 ± 93,91 p=0,009	59,92 ± 195,63 82,29 ± 93,91 p=0,009	72,74 ± 232,03 39,48 ± 61,33 p=0,42
CD68/CD8 No RCp RCp	184,40± 297,27 546,12± 665,69 p=0,04	184,40± 297,27 546,12± 665,69 p=0,04	260,37± 369,08 335,14± 572,97 p=0,81

Análisis univariante y multivariante del valor de la infiltración linfocitaria como factor predictivo de la respuesta (RCp) al tratamiento neoadyuvante.

Para analizar el valor predictivo de la infiltración linfocitaria para la RCp se han usado modelos de regresión logística en los que la infiltración por las distintas poblaciones fue incluida como variable dicotómica utilizando la media como punto de corte para la infiltración por TIL pre-QT. En el análisis univariante para la RCp se confirma el valor predictivo de RCp que tienen la infiltración tumoral por TIL alta pre-QT (mayor de la media de infiltración) de CD4 (p=0,001), CD3 (p=0,001) y CD20 (p=0,001). Así mismo, se demuestra que la ratio de infiltración tumoral por las diferentes subpoblaciones de linfocitos T también es predictiva de RCp: la ratio CD4/CD8 es significativa (p=0,01) con una OR de 7,48; la ratio FOXP3/CD8 se asocia con una OR de 5 a la aparición de RCp (p=0,02). También la ratio CD68/CD8 (p=0,002) (tabla 30).

Tabla 30. Análisis univariante: TIL y RCp			
Variable independiente	P	OR	IC 95% Inferior-superior
Infiltración pre-QT > media			
CD3	0,001	9,61	2,49 - 37,02
CD4	0,001	8,82	2,43 - 31,96
CD8	0,46	0,47	0,05 - 4,09
CD20	0,001	8,71	2,31 - 32,74
FOXP3	0,16	2,50	0,68 - 9,15
CD68	0,26	2,06	0,57 - 7,41
Ratios pre-QT > mediana			
CD4/CD8	0,01	7,48	1,52 - 36,77
FOXP3/CD3	0,16	0,22	0,02 - 1,86
FOXP3/CD8	0,02	5,00	1,23 - 20,24
CD68/CD8	0,02	1,00	1,000-1,003

Se realizó un análisis multivariante para la RCp tras QTn integrando las variables clínico-patológicas que habían demostrado significación estadística en el estudio univariante para RCp (fenotipo inmunohistoquímico, grado histológico) junto con cada uno de los parámetros de infiltración linfocitaria con valor predictivo en el estudio univariante. En la tabla 31 se recogen los valores de OR y nivel de significación para los modelos multivariantes contruidos con cada una de las variables de infiltración linfocitaria; en todos los modelos contruidos, el fenotipo mantuvo su valor predictivo de la RCp (con OR entre 2,1 y 3,1, y p entre 0,007 y 0,02), mientras que el grado histológico no fue significativo en ningún caso.

Tabla 31. Análisis multivariante: TIL y RCp			
Variable independiente	P	OR	IC 95% Inferior-superior
Infiltración pre-QT > media			
CD3	0,007	11,70	1,97- ,69,23
CD4	0,005	11,00	2,02 – 59,73
CD8	0,85	0,80	0,78 - ,8,24
CD20	0,005	15,34	2,26 -104,11
FOXP3	0,83	1,18	0,25 - 5,40
CD68	0,87	1,12	0,25 - ,5,04
Ratios pre-QT > mediana			
CD4/CD8	0,01	8,54	1,45 - 50,19
FOXP3/CD3	0,13	0,17	0,01 - 1,68
FOXP3/CD8	0,05	4,96	0,99 – 24,95
CD68/CD8	0,23	2,65	0,53 - 13,22

En el análisis multivariante para la RCp se confirma el valor predictivo de RCp que tienen la infiltración tumoral por TIL alta pre-QT (mayor de la media de infiltración) de CD4 (p=0,005), CD3 (p=0,007) y CD20 (p=0,005). Además, solamente la ratio CD4/CD8 (p=0,01) y la ratio CD4/CD8/CD68 (p=0,01) son predictivas de RCp, mientras que la ratio FOXP3/CD8 se hallaba al límite de la significación (p=0,05).

La ausencia de infiltración linfocitaria tumoral por alguna subpoblación de TIL es predictiva de quimiorresistencia (definida como ausencia de RCp). El análisis univariante para la ausencia de RCp, en el que se utiliza como variable dicotómica la ausencia o presencia de TIL demuestra que la ausencia de FOXP3 en el infiltrado tumoral predice quimiorresistencia con una OR de 5,3 (p=0,04) y que la ausencia de CD20 se asocia con una OR de 17 a la ausencia de RCp (p=0,008). En el análisis multivariante para la ausencia de RCp, solamente la no infiltración basal por CD20 confirmó su valor para predecir la quimiorresistencia con una OR de 70 (p=0,02) (tabla 32).

Tabla 32. Análisis univariante y multivariante: TIL=0 y no RCp			
TIL = 0	p	OR	IC 95% Inferior-superior
Análisis univariante			
CD3	0,21	3,81	0,45 – 32,02
CD4	0,08	4,11	0,84 – 20,96
CD8	0,17	0,22	0,02 - 1,90
FOXP3	0,04	5,30	1,07 – 26,18
CD20	0,008	17,0	2,07 -139,64
CD68	0,77	1,28	0,24 - 6,80
TILa*	0,43	2,34	0,27 - 20,38
Análisis multivariante			
CD3	0,27	3,68	0,35 - 37,68
CD4	0,09	4,38	0,76 – 25,08
CD8	0,25	0,27	0,02 - 2,58
FOXP3	0,08	4,84	0,80 - 29,14
CD20	0,02	70,75	4,84-1033,51
CD68	0,81	0,78	0,10 - 5,86
TILa*	0,66	1,73	0,14 - 20,97
*TILa (CD4 + CD8 + CD3 + CD20)			

2.3. Estudio del valor pronóstico de la infiltración linfocitaria basal.

En el análisis de supervivencia realizado según las subpoblaciones de TIL pre-QT (tabla 33), solamente la infiltración global elevada por linfocitos T (CD3 por encima de la media de infiltración) fue identificada como factor de buen pronóstico para SG ($p=0,05$), SLE ($p=0,01$) y SLED ($p=0,02$) (figura 2). Por el contrario, la ratio FOXP3/CD3 elevada (mayor de la mediana del ratio) se relacionó de forma muy significativa con peor SG ($p=0,01$), SLE ($p=0,007$) y SLED ($p=0,003$) (figura 12 y 13).

Tabla 33. Análisis de supervivencia según TIL pre-QT

TIL pre-QT	SG (log-rank)	SLE (log-rank)	SLED (log-rank)
TIL pre-QT > media			
CD3	p=0,05	p=0,01	p=0,02
CD4	p=0,09	p=0,16	p=0,18
CD8	p=0,20	p=0,49	p=0,54
FOXP3	p=0,20	p=0,29	p=0,20
CD20	p=0,93	p=0,91	p=0,97
CD68	p=0,57	p=0,83	p=0,81
Ratio TIL pre-QT > mediana			
CD4/CD8	p=0,20	p=0,24	p=0,13
FOXP3/CD3	p=0,01	p=0,007	p=0,003
FOXP3/CD8	p=0,77	p=0,78	p=0,99
CD68/CD8	p=0,23	p=0,57	p=0,16

Figura 12. Curvas de SLE y SG según infiltración linfocitaria por CD3 pre-QT.

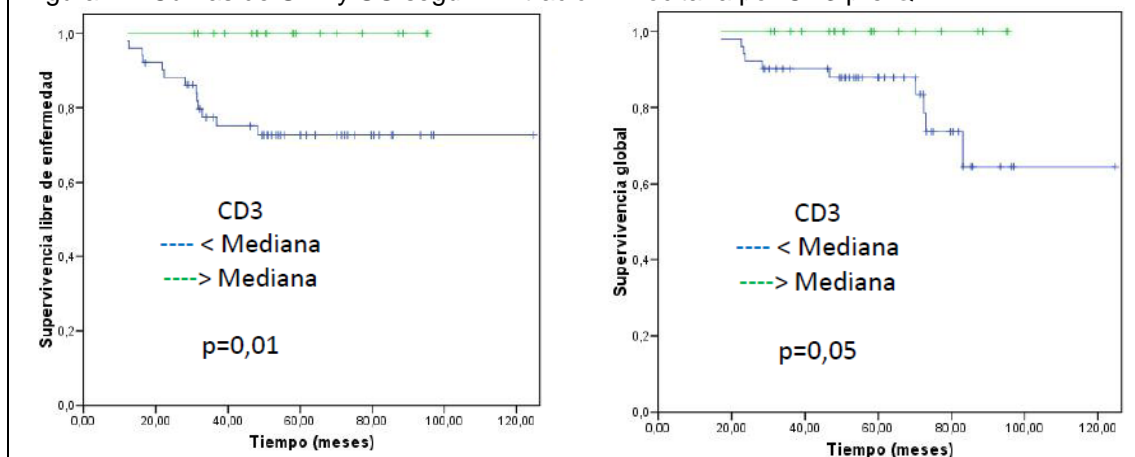
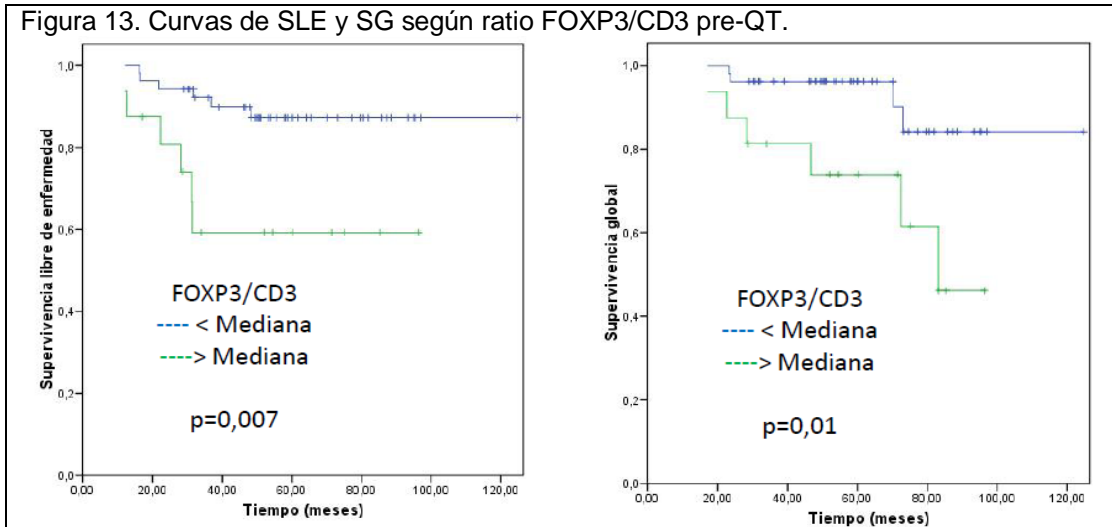


Figura 13. Curvas de SLE y SG según ratio FOXP3/CD3 pre-QT.



Además se realizó un análisis de la SLE según la infiltración linfocitaria basal y el fenotipo tumoral al diagnóstico; no se han encontrado asociaciones significativas, probablemente debido al pequeño tamaño muestral de los grupos incluidos en este subanálisis (tabla 35).

Tabla 35. Análisis de SLE según fenotipo tumoral, TIL pre-QT y RCp

TIL pre-QT	Hormonosensible	Her2	Triple negativo
CD3	p=0,10	p=0,12	p=0,13
CD4	p=0,91	p=0,12	p=0,23
CD8	p=0,93	p=0,59	p=0,32
FOXP3	p=0,31	p=0,21	p=0,34
CD20	p=0,41	p=0,80	p=0,19
CD68	p=0,96	p=0,40	p=0,99
CD4/CD8	p=0,73	p=0,68	p=0,13
FOXP3/CD3	p=0,15	p=0,07	p=0,21
FOXP3/CD8	p=0,98	p=0,80	p=0,55
CD68/CD8	p=0,49	p=0,80	p=0,96

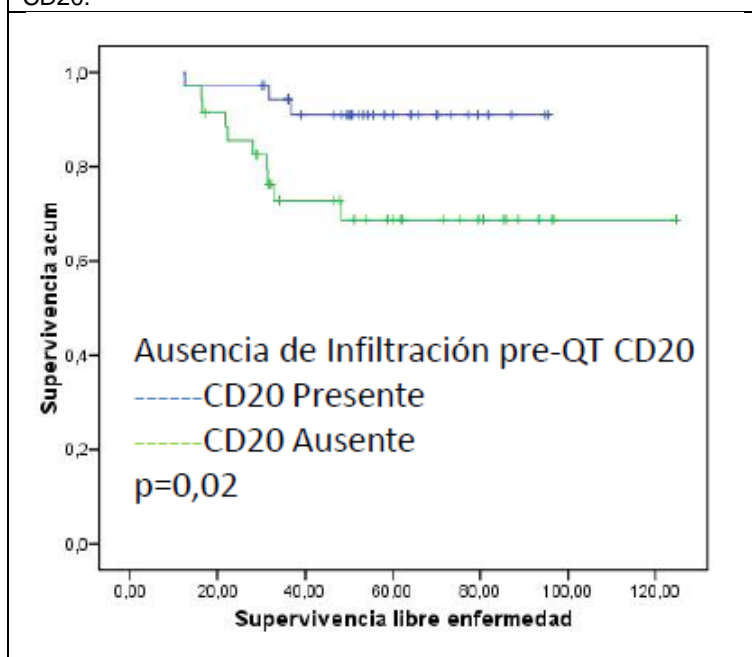
En la tabla 36 se muestran los resultados del análisis de la ausencia de infiltración linfocitaria tumoral basal como factor pronóstico. La ausencia de linfocitos CD20 al diagnóstico fue un factor de mal pronóstico para SLE (p=0,02) y SLED (p=0,03) (figura 14).

Tabla 36. Análisis de supervivencia según TIL pre-QT = 0.

TIL = 0	SG (log-rank)	SLE (log-rank)	SLED (log-rank)
CD3	p=0,21	p=0,09	p=0,06
CD4	p=0,11	p=0,31	p=0,19
CD8	p=0,20	p=0,45	p=0,53
FOXP3	p=0,68	p=0,68	p=0,93
CD20	p=0,09	p=0,02	p=0,03
CD68	p=0,29	p=0,31	p=0,25
TILa	p=0,15	p=0,30	p=0,24

*TILa (CD4 + CD8 + CD3 + CD20)

Figura 14. Curvas de SLE y ausencia de infiltración basal por CD20.



Por último se realizó un análisis multivariante para SLE y SG donde se incluyeron las variables que habían demostrado valor en el estudio multivariante clínico (SLE: RCp y cN2-3; SG: cN2-3) y los distintos parámetros de infiltración linfocitaria con valor pronóstico para SLE en el análisis univariante. La ratio FOXP3/CD3, la infiltración pre-QT por CD3 y la ausencia de infiltración pre-QT por CD20 perdieron su valor pronóstico de forma independiente en el análisis multivariante, si bien se acercaron a la significación estadística especialmente en el caso de la ratio FOXP3/CD3 ($p=0.06$) (tabla 37).

Tabla 37. Análisis multivariante TIL y supervivencia (SLE y SG)

Variable independiente	SLE			SG		
	p	OR	IC 95% Inf - sup	p	OR	IC 95% Inf - sup
FOXP3/CD3 alto						
RCp	0,27	0,30	0,38 – 2,35			
Afectación ganglionar: N2-3	0,01	5,06	1,47 – 17,35	0,07	8,69	1,80 – 41,93
FOXP3/CD3 alto	0,06	2,90	0,91 - 9,61	0,06	3,41	0,91 - 12,72
Ausencia CD20						
RCp	0,49	0,46	0,05 – 4,30			
Afectación ganglionar: N2-3	0,005	5,58	1,69 – 18,38	0,06	8,89	1,85 – 42,65
Ausencia CD20	0,09	3,33	0,82 - 13,56	0,22	2,97	0,50 – 17,41

2.4 Conclusiones del estudio de la infiltración linfocitaria basal.

Los resultados obtenidos en el estudio de la infiltración linfocitaria basal se pueden resumir de la siguiente manera:

Estudio descriptivo de la infiltración linfocitaria basal.

- La infiltración del cáncer de mama por las diferentes subpoblaciones de TIL y macrófagos, en general, no tiene relación estadísticamente significativa con las características clínico-anatomopatológicas al diagnóstico del mismo. Como excepciones hemos encontrado:
 - Mayor infiltración por CD68 ($p=0,04$) y CD20 ($p=0,05$) en mujeres mayores de 40 años.
 - La infiltración por CD68 es mayor en tumores cT3-T4 ($p=0,02$).
 - La infiltración por macrófagos (CD68) es mayor en los subtipos tumorales IHQ HER2+ y triple negativos ($p=0,006$); a pesar de ello, no hay ningún patrón de infiltración linfocitaria específico según el subtipo IHQ de cáncer de mama.

Estudio de la infiltración linfocitaria basal. Estudio del valor predictivo de respuesta. Estudio del valor pronóstico.

Las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama sometidas a QTn con RCp presentaban, respecto a las pacientes que no presentaron RCp con la administración de QTn:

- Mayores niveles de infiltración linfocitaria pre-QT por CD3 ($p=0,0004$), CD4 ($p=0,003$), FOXP3 ($p=0,01$) y CD20 ($p=0,0002$).
- Ratio pre-QT más elevadas CD4/CD8 ($p=0,0001$), FOXP3/CD8 ($p=0,0009$), CD68/CD8 ($p=0,04$).

La infiltración por CD3 ($p=0,0002$), CD4 ($p=0,0003$) y CD20 ($p=0,0004$) mayor a la media de infiltración se asocia a un aumento significativo de la tasa de RCp. Por el contrario, la ausencia de infiltración por CD20 ($p=0,01$) y por FOXP3 ($p=0,02$) conlleva una disminución significativa de la tasa de RCp objetivada en cada subtipo.

Estudio del valor predictivo de respuesta.

En el análisis univariante realizado para RCp, son factores predictores de RCp:

- Los niveles altos de TIL pre-QT CD3 ($p=0,001$), CD4 ($p=0,001$) y CD20 ($p=0,001$).
- La relación existente entre linfocitos reguladores, efectores y citotóxicos y macrófagos FOXP3/CD8 ($p=0,02$), CD4/CD8 ($p=0,01$), CD68/CD8 ($p=0,002$) y la ratio CD4/CD8/CD68 ($p=0,05$).
- La ausencia de TIL pre-QT FOXP3 ($p=0,04$) y CD20 ($p=0,008$) es factor predictor de no RCp.

En el análisis multivariante realizado para RCp, incluyendo el fenotipo tumoral, son factores predictores independientes de RCp

- Infiltración tumoral por TIL alta pre-QT (mayor de la media de infiltración) de CD4 ($p=0,005$), CD3 ($p=0,007$) y CD20 ($p=0,005$).
- Ratio CD4/CD8 elevada ($p=0,01$), FOXP3/CD8 elevada ($p=0,05$) y ratio CD4/CD8/CD68 ($p=0,01$).
- La ausencia de CD20 pre-QT predice quimiorresistencia ($p=0,02$).

Estudio del valor pronóstico.

En el estudio univariante para supervivencia han demostrado relevancia como factor pronóstico los siguientes factores:

Son factores pronósticos positivos:

- La infiltración tumoral alta por CD3 al diagnóstico es un factor pronóstico positivo para SLE ($p=0,01$) y SLED ($p=0,02$).

Son factores pronósticos negativos:

- El ratio de infiltración FOXP3/CD3 elevado al diagnóstico es un factor pronóstico negativo para SG ($p=0,01$), SLE ($p=0,007$) y SLED ($p=0,003$).
- La ausencia de linfocitos CD20 pre-QT es factor de mal pronóstico para SLE ($p=0,02$)

En el estudio multivariante se ha perdido la significación pronóstica de dichos factores.

3. ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE LA INFILTRACIÓN LINFOCITARIA CON LA QUIMIOTERAPIA.

3.1. Estudio descriptivo de la variación de la infiltración linfocitaria con la quimioterapia.

La administración de quimioterapia (antraciclinas y taxanos) produce un descenso significativo en la infiltración tumoral por CD4 ($p=0,01$), CD20 ($p=0,04$) y CD68 ($p=0,03$), mientras que la disminución no es significativa en la infiltración por CD3 ($p=0,47$). Por el contrario, la quimioterapia da lugar a un aumento en la infiltración por CD8 ($p<0,001$) y FOXP3 ($p=0,86$) en las pacientes estudiadas en este trabajo (tabla 38).

Tabla 38. Variación de TIL con la QTn		
	TIL/mm ² media±DE	p
CD3 pre-QT	(n=71) 172,33 ± 334,50	p=0,47*
post-QT	(n=88) 100,43 ± 117,43	
Variación (post-QT - pre-QT)	(n=71) -78,46 ± 360,56	
CD4 pre-QT	(n=73) 67,33 ± 123,89	p=0,01*
post-QT	(n=88) 21,99 ± 69,64	
Variación (post-QT - pre-QT)	(n=73) -52,28 ± 122,94	
CD8 pre-QT	(n=73) 30,25 ± 101,97	p=0,0001*
post-QT	(n=89) 37,03 ± 66,65	
Variación (post-QT - pre-QT)	(n=73) 3,75 ± 110,74	
FOXP3 pre-QT	(n=68) 6,97 ± 17,98	p=0,86*
post-QT	(n=88) 16,51 ± 85,56	
Variación (post-QT - pre-QT)	(n=68) 0,48 ± 23,03	
CD20 pre-QT	(n=71) 42,08 ± 83,05	p=0,04*
post-QT	(n=88) 14,17 ± 53,89	
Variación (post-QT - pre-QT)	(n=71) -33,86 ± 78,03	
CD68 pre-QT	(n=61) 33,92 ± 45,09	p=0,03*
post-QT	(n=87) 39,08 ± 70,77	
Variación (post-QT - pre-QT)	(n=61) -7,04 ± 58,85	

*nivel de significación de los cambios producidos en las poblaciones linfocitarias con la QT (Wilcoxon)

3.2. Estudio del valor predictivo de respuesta de la variación de la infiltración linfocitaria con la quimioterapia.

Para el análisis de la variación de subpoblaciones linfocitarias con la quimioterapia se utilizó como medida la diferencia entre el valor de TIL_{post-QT} y el valor TIL_{pre-QT}, de tal manera que valores negativos implican un descenso del grado de infiltración y valores mayores o positivos de dicha diferencia indican un menor descenso o incluso un aumento de la infiltración por TIL. En dicho análisis encontramos que las pacientes con RCp tras la QT presentaban descensos de los TIL mayores que las pacientes que no habían presentado RCp: CD3; -259 vs -37 CD3/mm² (p=0,001); CD4; -119 vs. -36 CD4/mm² (p=0,01); CD20 -81 vs. -23 CD20/mm² (p=0,01); CD68; -36 vs. 0,27 CD68/mm² (p=0,02). Las variaciones de CD8 presentaron el sentido contrario y además no fueron significativas, CD8; 39 vs. -4 CD8/mm² (p=0,08) y lo mismo ocurrió con FOXP3; 1,17 vs. 0,3 FOXP3/ mm² (p=0,12). En la tabla 39 se muestran las variaciones de TIL en la población total, población con RCp y pacientes sin RCp, y además se comparan con los linfocitos pre y post-QT en cada grupo de pacientes.

Tabla 39. Análisis de la relación de las variaciones de TIL y RCp				
TIL/mm ² media±DE	Total	RCp	No RCp	P
CD3 pre-QT	(n=71) 172,33 ± 334,50	(n=13) 324,33 ± 233,18	(n=58) 138,26 ± 345,70	0,0004
post-QT	(n=88) 100,43 ± 117,43	(n=17) 94,98 ± 158,88	(n=71) 101,74 ± 106,58	0,25
Variación (post-QT - pre-QT)	(n=71) -78,46 ± 360,56 p=0,47*	(n=13) -259,59 ± 249,85	(n=58) -37,87 ± 370,61	0,001
CD4 pre-QT	(n=73) 67,33 ± 123,89	(n=14) 146,94 ± 161,77	(n=59) 48,44 ± 106,28	0,003
post-QT	(n=88) 21,99 ± 69,64	(n=17) 58,38 ± 145,88	(n=71) 13,27 ± 27,66	0,31
Variación (post-QT - pre-QT)	(n=73) -52,28 ± 122,94 p=0,01*	(n=14) -119,93 ± 175,28	(n=59) -36,23 ± 102,52	0,01
CD8 pre-QT	(n=73) 30,25 ± 101,97	(n=13) 3,58 ± 12,93	(n=60) 36,03 ± 111,65	0,15
post-QT	(n=89) 37,03 ± 66,65	(n=17) 65,61 ± 121,59	(n=72) 30,28 ± 43,95	0,35
Variación (post-QT - pre-QT)	(n=73) 3,75 ± 110,74 p=0,0001*	(n=13) 39,42 ± 46,51	(n=60) -3,97 ± 119,10	0,08
FOXP3 pre-QT	(n=68) 6,97 ± 17,98	(n=13) 8,37 ± 9,26	(n=55) 6,63 ± 19,53	0,01
post-QT	(n=88) 16,51 ± 85,56	(n=17) 53,73 ± 190,42	(n=71) 7,60 ± 19,86	0,82
Variación (post-QT - pre-QT)	(n=68) 0,48 ± 23,03 p=0,86*	(n=13) 1,17 ± 27,44	(n=55) 0,32 ± 22,15	0,12
CD20 pre-QT	(n=71) 42,08 ± 83,05	(n=13) 92,82 ± 94,10	(n=58) 30,71 ± 76,73	0,0002
post-QT	(n=88) 14,17 ± 53,89	(n=17) 40,83 ± 119,40	(n=71) 7,79 ± 11,70	0,73
Variación (post-QT - pre-QT)	(n=71) -33,86 ± 78,03 p=0,04*	(n=13) -81,31 ± 86,12	(n=58) -23,23 ± 72,71	0,01
CD68 pre-QT	(n=61) 33,92 ± 45,09	(n=12) 55,65 ± 65,73	(n=49) 28,60 ± 37,48	0,12
post-QT	(n=87) 39,08 ± 70,77	(n=16) 19,44 ± 23,52	(n=71) 43,51 ± 76,98	0,61
Variación (post-QT - pre-QT)	(n=61) -7,04 ± 58,85 p=0,03*	(n=12) -36,93 ± 62,27	(n=49) 0,27 ± 56,24	0,02

* nivel de significación de los cambios producidos en las poblaciones linfocitarias con la QT

Para analizar el valor predictivo para la RCp de la variación de la infiltración linfocitaria con la QTn se han usado modelos de regresión logística en los que la variación de TIL, definida como $TIL_{post-QT} - TIL_{pre-QT}$, fue incluida como variable dicotómica utilizando la mediana como punto de corte. En el análisis univariante para la RCp se confirma que los descensos menores de la infiltración por TIL CD4 ($p=0,02$), CD3 ($p=0,01$) y CD20 ($p=0,01$) con la quimioterapia se asociaban a una menor probabilidad de RCp y por tanto eran predictivos de resistencia al tratamiento (tabla 40). La relación de las variaciones de CD8 con la RCp mostró un sentido opuesto y no fue significativa.

Tabla 40. Análisis univariante de la variación de TIL inducida por la QTn y RCp

Variación de TIL > mediana ($TIL_{post-QT} - TIL_{pre-QT}$) > mediana	P	OR	IC 95% Inferior-superior
CD3	0,01	0,12	0,02 - 0,63
CD4	0,02	0,21	0,05 - 0,85
CD8	0,14	2,57	0,71 - 9,27
FOXP3	0,10	0,35	0,10 - 1,24
CD20	0,01	0,15	0,03 - 0,64
CD68	0,22	0,44	0,11 - 1,66

En el análisis multivariante para la RCp, que incluyó el fenotipo tumoral, se confirma el valor predictivo de RCp obtenido en el estudio univariante para la variación de la infiltración linfocitaria: menores descensos de la infiltración por TIL CD4 ($p=0,03$), CD3 ($p=0,005$) y CD20 ($p=0,006$) (diferencia post-pre mayor de la mediana) con la quimioterapia eran predictivos de la ausencia de RCp, y, por tanto, de resistencia a la quimioterapia con antraciclina y taxanos (Tabla 41).

Tabla 41. Análisis multivariante de la variación de TIL inducida por la QTn y RCp

Variación de TIL > mediana ($TIL_{post-QT} - TIL_{pre-QT}$) > mediana	P	OR	IC 95% Inferior-superior
CD3	0,005	0,06	0,00 - 0,43
CD4	0,03	0,17	0,03 - 0,85
CD8	0,21	2,53	0,59 - 10,84
FOXP3	0,33	0,49	0,11 - 2,05
CD20	0,006	0,06	0,09 - 0,45
CD68	0,43	0,54	0,11 - 2,50

Análisis del impacto de la infiltración linfoide en la RCp por subtipos.

A pesar de que ya se ha demostrado que la infiltración linfocitaria no tiene relación con los subtipos IHQ del cáncer de mama, se estudió si la variación inducida por la QT en las diferentes poblaciones de TIL era diferente según los subtipos IHQ tumorales. En general los descensos producidos con la QT en CD3, CD4, CD20 y CD68 en los diferentes subtipos IHQ son congruentes con lo objetivado en la población general, excepto en los subtipos hormonosensible Her2+ y triple negativo en los que se produce un aumento de las poblaciones linfocitarias. Este hecho requiere un mayor estudio en poblaciones con una N mayor.

En el análisis realizado para la asociación de los cambios de infiltración linfoide con la RCp solamente son estadísticamente significativos los descensos de CD4 en los tumores hormonosensibles y Her2+, así como las variaciones de CD8 en los tumores luminales y el descenso de CD68 en tumores Her2+ (tabla 42); aunque es posible que la escasa significación de los cambios sea debida al pequeño tamaño muestral en cada subtipo IHQ.

Tabla 42. Análisis de la variación de TIL inducida por la QTn y fenotipo tumoral				
TIL/mm ² media±DE	Hormonosensible	Hormonosensible Her2+	Her2+	Triple negativo
CD3 pre-QT	(n=36) 180,37 ± 408,12	(n=10) 79,95 ± 103,04	(n=10) 296,86 ± 355,28	(n=14) 140,98 ± 193,08
post-QT	(n=45) 83,29 ± 94,08 p=0,45	(n=11) 144,22 ± 172,16 p=0,33	(n=11) 74,38 ± 49,13 P=0,20	(n=20) 126,78 ± 150,71 P=0,68
CD4 pre-QT	(n=36) 57,53 ± 112,98	(n=11) 68,58 ± 118,26	(n=10) 155,00 ± 198,05	(n=15) 35,97 ± 68,58
post-QT	(n=45) 8,35 ± 20,93 p=0,03	(n=11) 35,93 ± 54,07 p=0,59	(n=11) 11,45 ± 23,76 p=0,02	(n=20) 51,33 ± 133,52 p=0,82
CD8 pre-QT	(n=37) 31,09 ± 91,94	(n=10) 5,47 ± 14,82	(n=10) 32,46 ± 101,56	(n=15) 45,25 ± 155,63
post-QT	(n=46) 26,34 ± 34,13 p=0,04	(n=11) 54,52 ± 85,63 p=0,01	(n=11) 29,02 ± 23,58 p=0,11	(n=20) 56,29 ± 113,05 p=0,09
FOXP3 pre-QT	(n=34) 5,01 ± 12,55	(n=10) 2,58 ± 3,62	(n=10) 15,57 ± 38,90	(n=13) 9,39 ± 11,33
post-QT	(n=45) 4,69 ± 13,95 p=0,56	(n=11) 11,46 ± 23,38 p=0,20	(n=11) 10,21 ± 26,31 p=0,95	(n=20) 49,50 ± 175,80 p=0,34
CD20 pre-QT	(n=35) 26,86 ± 57,74	(n=10) 23,31 ± 55,56	(n=10) 97,81 ± 144,44	(n=15) 55,77 ± 112,30
post-QT	(n=45) 6,89 ± 8,41 p=0,22	(n=11) 15,54 ± 16,60 p=0,79	(n=11) 7,50 ± 15,50 p=0,07	(n=20) 34,11 ± 110,83 p=0,48
CD68 pre-QT	(n 31) 24,01 ± 43,15	(n 9) 31,39 ± 34,15	(n 9) 69,97 ± 61,15	(n 11) 35,79 ± 34,40
post-QT	(n 45) 23,86 ± 43,36 p=0,43	(n 11) 38,90 ± 69,32 p=0,31	(n 11) 28,44 ± 43,11 p=0,02	(n 19) 74,31 ± 114,23 p=0,38

Así mismo, a pesar de las limitaciones antes comentadas respecto al tamaño muestral, han sido analizadas las diferencias existentes en las variaciones linfocitarias con la QT según los subtipos IHQ y la existencia o no de RCp (tabla 43). En las pacientes hormonosensibles Her2+ que no alcanzaron RCp se produce un aumento de CD8 (p=0,03), así como en las Her2+ con RCp tras la QT (p=0,04). En las pacientes triples negativas que alcanzaron RCp se objetivaron descensos estadísticamente significativos de CD3 (p=0,04) y CD68 (p=0,04). Estos resultados han de ser valorados con cautela dado el pequeño tamaño muestral de cada subtipo IHQ tumoral.

Tabla 43. Análisis de la variación de TIL según fenotipo tumoral y RCp					
TIL/mm ² media±DE	Hormonosensible	Hormonosensible Her2+	Her2+	Triple negativo	
CD3 RCp	pre-QT	(n=1) 191,46	(n=2) 212,53 ± 194,60	(n=5) 389,20 ± 308,02	(n=5) 330,76 ± 290,06
	post-QT	(n=2) 18,06 ± 24,61 p*	(n=3) 97,34 ± 61,31 p=0,65	(n=6) 58,91 ± 42,54 p=0,08	(n=6) 155,52 ± 262,72 p=0,04
	no RCp pre-QT	(n=35) 180,05 ± 414,08	(n=8) 46,81 ± 44,32	(n=5) 204,53 ± 409,65	(n=9) 35,55 ± 64,51
	post-QT	(n=43) 86,32 ± 95,12 p=0,58	(n=8) 161,80 ± 199,93 p=0,20	(n=5) 92,94 ± 54,62 p=0,50	(n=14) 114,47 ± 78,14 p=0,06
CD4 RCp	pre-QT	(n=1) 173,74	(n=3) 135,16 ± 118,14	(n=5) 233,97 ± 232,33	(n=5) 61,62 ± 72,40
	post-QT	(n=2) 0,94 ± 0,40 p*	(n=3) 66,03 ± 60,66 p=0,28	(n=6) 18,57 ± 31,42 p=0,08	(n=6) 113,50 ± 242,36 p=0,22
	no RCp pre-QT	(n=35) 54,21 ± 112,83	(n=8) 43,62 ± 115,67	(n=5) 76,04 ± 136,70	(n=10) 23,15 ± 66,63
	post-QT	(n=43) 8,69 ± 21,36 p=0,05	(n=8) 24,65 ± 50,90 p=0,88	(n=5) 2,90 ± 3,16 p=0,14	(n=14) 24,69 ± 30,29 p=0,26
CD8 RCp	pre-QT	(n=1) 0,00	(n=2) 0,00 ± 0,00	(n=5) 0,00 ± 0,00	(n=5) 9,32 ± 20,86
	post-QT	(n=2) 14,65 ± 19,79 p*	(n=3) 64,17 ± 30,43 p=0,18	(n=6) 33,06 ± 27,53 p=0,04	(n=6) 115,88 ± 201,90 p=0,34
	no RCp pre-QT	(n=36) 31,95 ± 93,09	(n=8) 6,84 ± 16,49	(n=5) 64,92 ± 143,43	(n=10) 63,22 ± 190,80
	post-QT	(n=44) 26,87 ± 34,68 p=0,06	(n=8) 50,9 ± 100,78 p=0,03	(n=5) 24,18 ± 19,73 p=0,68	(n=14) 30,75 ± 25,70 p=0,13
FOXP3 RCp	pre-QT	(n=1) 10,23	(n=2) 1,78 ± 2,52	(n=5) 5,51 ± 6,55	(n=5) 13,49 ± 12,14
	post-QT	(n=2) 1,80 ± 1,69 p*	(n=3) 2,66 ± 3,04 p=0,65	(n=6) 15,95 ± 35,90 p=1,00	(n=6) 134,35 ± 320,29 p=0,22
	no RCp pre-QT	(n=33) 4,85 ± 12,71	(n=8) 2,78 ± 3,96	(n=5) 25,62 ± 55,77	(n=8) 6,83 ± 10,79
	post-QT	(n=43) 4,82 ± 14,26 p=0,75	(n=8) 14,77 ± 27,07 p=0,20	(n=5) 3,32 ± 3,20 p=0,68	(n=14) 13,14 ± 31,10 p=1,00
CD20 RCp	pre-QT	(n=1) 48,34	(n=2) 97,74 ± 115,93	(n=5) 85,81 ± 61,32	(n=5) 106,75 ± 136,50
	post-QT	(n=2) 1,53 ± 2,17 p*	(n=3) 27,58 ± 17,48 p=0,65	(n=6) 3,26 ± 3,78 p=0,08	(n=6) 98,13 ± 197,80 p=0,13
	no RCp pre-QT	(n=34) 26,23 ± 58,49	(n=8) 4,70 ± 8,40	(n=5) 109,81 ± 159,21	(n=10) 30,28 ± 95,77
	post-QT	(n=43) 7,1 ± 8,51 p=0,34	(n=8) 11,02 ± 14,87 p=0,48	(n=5) 12,60 ± 22,87 p=0,68	(n=14) 6,66 ± 14,22 p=0,23
CD68 RCp	pre-QT	(n=1) 234,08	(n=2) 28,95 ± 40,95	(n=4) 34,36 ± 26,91	(n=5) 47,67 ± 45,51
	post-QT	(n=2) 7,16 ± 0,30 p*	(n=3) 24,05 ± 19,32 p=0,65	(n=6) 16,28 ± 11,04 p=0,14	(n=5) 25,40 ± 39,80 p=0,04
	no RCp pre-QT	(n=30) 17,01 ± 18,81	(n=7) 32,08 ± 35,68	(n=5) 98,46 ± 68,21	(n=6) 25,88 ± 21,24
	post-QT	(n=43) 24,63 ± 44,22 p=0,61	(n=8) 44,47 ± 81,41 p=0,39	(n=5) 43,05 ± 47,62 p=0,08	(n=14) 91,78 ± 127,79 p=0,68
p* dato no disponible, dado el pequeño tamaño muestral					

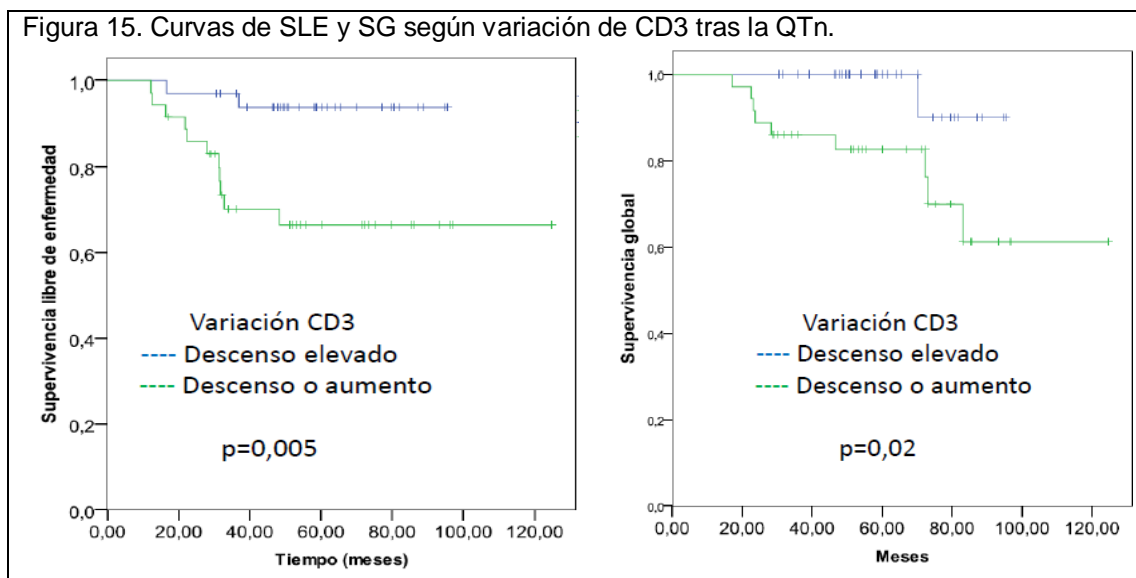
3.3. Estudio del valor pronóstico de la variación de la infiltración linfocitaria inducida por la quimioterapia.

En el análisis pronóstico de las variaciones de TIL inducidas por la QTn, solamente fueron estadísticamente significativos los descensos mayores en la infiltración tumoral por CD3 tras quimioterapia, que se comportaron como un factor de buen pronóstico para SLE ($p=0,005$), SLED y SG (tabla 44). Estos datos apoyan la hipótesis inicial del proyecto de que las variaciones producidas por la QT en la infiltración linfocitaria T basal son un factor relevante desde el punto de vista pronóstico; lo que subraya la idea del efecto inmunológico de la QT, especialmente en tumores con infiltración linfocitaria basal alta (figura 15).

Tabla 44. Análisis de supervivencia según la variación de TIL.

Variación de TIL > mediana ($TIL_{post-QT} - TIL_{pre-QT}$) > mediana	SG (log-rank)	SLE (log-rank)	SLED (log-rank)
CD3 (post-pre) alto	$p=0,02$	$p=0,005$	$p=0,009$
CD4 (post-pre) alto	$p=0,44$	$p=0,58$	$p=0,76$
CD8 (post-pre) alto	$p=0,86$	$p=0,45$	$p=0,62$
FOXP3 (post-pre) alto	$p=0,76$	$p=0,41$	$p=0,27$
CD20 (post-pre) alto	$p=0,21$	$p=0,99$	$p=0,14$
CD68 (post-pre) alto	$p=0,23$	$p=0,41$	$p=0,62$

Figura 15. Curvas de SLE y SG según variación de CD3 tras la QTn.



En el análisis multivariante para SLE y SG, en el que se incluyeron las variables clínicas significativas (SG: cN2-3; SLE: RCp y cN2-3), la variación de CD3 con la QTn perdió su valor pronóstico de forma independiente para SLE y SG (tabla 31), aunque en el caso de la SLE mostró una tendencia que rozó la significación estadística ($p=0,08$) y una OR clínicamente significativa (4.54) (tabla 45).

Tabla 45. Análisis multivariante de las variaciones de TIL y supervivencia.

Variable independiente	SLE			SG		
	p	OR	IC 95% Inf - sup	p	OR	IC 95% Inf - sup
RCp	0,63	0,57	0,05 – 5,73			
Afectación ganglionar: N2-N3	0,009	4,95	1,48 – 16,54	0,01	7,81	1,62 – 37,50
CD3 (post-pre) alto	0,08	4,54	0,82 – 24,91	0,11	7,17	0,63 – 81,01

3.4 Conclusiones del estudio de la variación de la infiltración linfocitaria inducida por la quimioterapia.

En el estudio de la variación de la infiltración linfocitaria inducida por QT se obtuvieron los siguientes resultados:

- Con la administración de QT (antraciclinas y taxanos) las subpoblaciones de TIL varían de forma significativa. Existe una disminución significativa en la infiltración por CD4 ($p=0,01$), CD20 ($p=0,04$), CD68 ($p=0,037$), mientras que el descenso de CD3 no fue estadísticamente significativo ($p=0,47$). Por el contrario, tras la QTn se produce un aumento en la infiltración tumoral por CD8 ($p=0,0001$) y FOXP3 ($p=0,86$), aunque este último no es significativo.
- Las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama sometidas a QTn con RCp presentaban, respecto a las pacientes que no presentaron RCp con la administración de QTn:
 - Descensos mayores tras la administración de QTn en los TIL CD3 ($p=0,001$), CD4 ($p=0,01$), CD20 ($p=0,01$), ($p=0,02$).

Estudio del valor predictivo de respuesta.

En el análisis univariante realizado para RCp, son factores predictores de RCp:

- Los descensos altos (mayores de la mediana de descenso) en la infiltración linfocitaria producida por la QT en CD3 ($p=0,01$), CD4 ($p=0,02$), y CD20 ($p=0,01$).

En el análisis multivariante realizado para RCp, incluyendo el fenotipo tumoral, son factores predictores independientes de RCp

- Descensos importantes (mayores de la mediana de descenso) de la infiltración por TIL CD3 ($p=0,005$), CD4 ($p=0,03$), y CD20 ($p=0,006$) con la quimioterapia.

Estudio del valor pronóstico.

Son factores pronósticos positivos:

- El descenso elevado de CD3 producido por la QT es un factor pronóstico positivo para SG ($p=0,02$), SLE ($p=0,005$) y SLED ($p=0,009$). La significación del descenso de CD3 fue mayor que la obtenida con su valor pre-QT y con la infiltración post-QT, lo que sugiere que el cambio inducido por QT en el perfil de respuesta inmune es más relevante que la respuesta inmune basal, lo que subraya la idea del efecto inmunológico de la QT, especialmente en tumores con infiltración linfocitaria basal alta. El valor pronóstico del descenso de CD3 se acerca también a la significación estadística en el análisis multivariante ($p=0,08$).

4. ESTUDIO DE LA INFILTRACIÓN LINFOCITARIA TRAS LA QUIMIOTERAPIA.

4.1 Estudio descriptivo de la infiltración linfocitaria tras la quimioterapia.

En la tabla 46 se muestran la infiltración linfocitaria post-QT por las diferentes subpoblaciones de TIL, según las principales características clínico-anatomopatológicas del tumor. Los recuentos de TIL post-QT no se asocian de forma estadísticamente significativa a ninguna de las variables clínico-patológicas del tumor al diagnóstico con valor pronóstico. Como excepción se encontró una mayor infiltración post-QT de CD8 ($p=0,01$) y CD20 ($p=0,03$) en tumores poco diferenciados (grado 3) al diagnóstico. Los recuentos de TIL post-QT tampoco se asocian de forma estadísticamente significativa a ninguna de las variables anatomopatológicas del tumor residual tras la QTn (tabla 47).

Tabla 46. Subpoblaciones linfocitarias post-QTy características clínico-anatomopatológicas del tumor al diagnóstico.

	CD3/mm ² post-QT media±DE	CD4/mm ² post-QT media±DE	CD8/mm ² post-QT media±DE	FOXP3/mm ² post-QT media±DE	CD20/mm ² post-QT media±DE	CD68/mm ² post-QT media±DE
Estatus menopáusico Premenopausia Postmenopausia	108,17 ± 105,43 93,04 ± 128,61 p=0,07	16,82 ± 28,89 26,92 ± 93,50 p=0,16	36,75 ± 50,76 37,29 ± 79,78 p=0,42	25,05 ± 117,99 7,58 ± 20,52 p=0,96	17,64 ± 74,36 10,54 ± 13,99 p=0,07	47,06 ± 87,70 31,29 ± 48,77 p=0,94
Tipo histológico Ductal Lobulillar	101,61 ± 120,54 79,66 ± 45,35 p=0,88	22,79 ± 22,79 6,59 ± 2,64 p=0,64	36,93 ± 68,28 25,84 ± 15,16 p=0,67	16,82 ± 87,98 12,76 ± 25,52 p=0,21	14,43 ± 55,41 9,04 ± 16,03 p=0,55	39,09 ± 72,30 39,75 ± 49,17 p=0,58
Estadio clínico IIA IIB IIIA IIIB IIIC cT1-cT2 cT3-cT4 cN0-cN1 cN2-cN3	88,29 ± 127,92 87,87 ± 82,18 116,98 ± 124,14 91,81 ± 55,66 109,66 ± 166,46 p=0,89 109,67 ± 142,75 93,41 ± 94,75 p=0,76 97,52 ± 110,56 106,68 ± 132,89 p=0,73	16,55 ± 36,67 15,79 ± 30,44 13,40 ± 30,30 4,09 ± 4,08 58,69 ± 153,67 p=0,27 30,91 ± 100,78 15,20 ± 28,87 p=0,84 15,75 ± 33,05 35,34 ± 113,88 p=0,87	23,88 ± 42,00 34,20 ± 36,13 33,38 ± 57,95 21,86 ± 19,78 65,99 ± 127,56 p=0,44 42,55 ± 86,16 32,72 ± 46,66 p=0,77 33,12 ± 48,43 45,55 ± 95,68 p=0,74	8,65 ± 24,25 12,23 ± 28,65 5,94 ± 10,57 0,69 ± 0,98 54,6 ± 202,90 p=0,45 27,26 ± 128,17 8,35 ± 20,90 p=0,68 9,72 ± 23,88 31,07 ± 148,39 p=0,45	5,77 ± 8,44 11,53 ± 15,53 6,79 ± 9,95 9,84 ± 15,63 41,07 ± 127,68 p=0,32 22,38 ± 80,16 7,93 ± 14,57 p=0,23 9,72 ± 13,35 23,71 ± 93,97 p=0,13	40,13 ± 78,92 46,04 ± 89,69 45,70 ± 64,62 13,40 ± 14,99 18,66 ± 25,34 p=0,70 32,77 ± 60,34 43,75 ± 77,86 p=0,27 41,44 ± 78,10 33,83 ± 51,79 p=0,84
Grado histológico G I - II G III	75,63 ± 94,83 117,40 ± 134,87 p=0,66	9,46 ± 24,46 32,46 ± 91,95 p=0,05	22,37 ± 33,50 48,69 ± 85,32 p=0,01	5,95 ± 17,29 26,04 ± 115,85 p=0,25	4,93 ± 6,63 21,60 ± 72,93 p=0,03	24,63 ± 47,85 45,32 ± 80,17 p=0,13
Afectación linfovascular Ausente Presente	104,14 ± 124,86 80,86 ± 65,18 p=0,93	24,22 ± 75,29 10,17 ± 10,17 p=0,46	39,19 ± 71,98 25,45 ± 20,13 p=0,89	19,08 ± 93,17 2,94 ± 3,22 p=0,74	16,11 ± 58,58 3,91 ± 5,67 p=0,14	42,01 ± 75,54 23,82 ± 34,96 p=0,40
Hormonosensibilidad No Si	108,19 ± 125,85 95,26 ± 114,31 p=0,35	37,18 ± 108,88 13,77 ± 31,69 p=0,39	46,62 ± 91,95 31,78 ± 48,69 p=0,39	35,56 ± 142,02 6,02 ± 16,20 p=0,76	24,67 ± 89,59 8,59 ± 10,89 p=0,32	57,49 ± 94,89 26,81 ± 49,13 p=0,11
Sobreexpresión Her2 Negativo Positivo	96,67 ± 115,05 109,30 ± 128,61 p=0,56	21,57 ± 77,42 23,69 ± 42,64 p=0,63	35,42 ± 68,81 41,77 ± 62,66 p=0,46	18,48 ± 98,71 10,84 ± 24,30 p=0,37	15,27 ± 62,09 11,52 ± 16,20 p=0,56	38,83 ± 74,70 33,67 ± 53,58 p=0,47
Subgrupos IHQ RE+ y/o RP+ y Her2- RE+ y/o RP+ y Her2+ RE- y RP- y Her2+ RE- y RP- y Her2-	83,29 ± 94,08 144,22 ± 172,16 74,38 ± 49,13 126,78 ± 150,71 p=0,26	8,35 ± 20,93 35,93 ± 54,07 11,45 ± 23,76 51,33 ± 133,52 p=0,11	26,34 ± 34,13 54,52 ± 85,63 29,02 ± 23,58 56,29 ± 113,05 p=0,29	4,69 ± 13,95 11,46 ± 23,38 10,21 ± 26,31 49,50 ± 175,80 p=0,27	6,89 ± 8,41 15,54 ± 16,60 7,50 ± 15,50 34,11 ± 110,83 p=0,30	23,86 ± 43,36 38,90 ± 69,32 28,44 ± 34,11 74,31 ± 114,23 p=0,06

Tabla 47. Subpoblaciones linfocitarias post-QTy características clínico-anatomopatológicas del tumor post-QT.

	CD3/mm ² post-QT media±DE	CD4/mm ² post-QT media±DE	CD8/mm ² post-QT media±DE	FOXP3/mm ² post-QT media±DE	CD20/mm ² post-QT media±DE	CD68/mm ² post-QT media±DE
Enfermedad residual No Enfermedad Enfermedad	92,21 ± 148,54 103,57 ± 95,47 p=0,07	38,15 ± 108,36 12,29 ± 24,49 p=0,61	53,80 ± 100,43 27,14 ± 31,14 p=0,76	28,70 ± 137,18 9,20 ± 22,31 p=0,38	23,99 ± 86,50 8,28 ± 12,25 p=0,98	22,56 ± 40,41 48,69 ± 82,35 p=0,06
Estadio clínico patológico pTmic pT1-T2 pT3-T4	47,98 ± 42,96 112,83 ± 119,89 85,16 ± 69,54 p=0,48	1,43 ± 2,02 16,23 ± 32,18 8,01 ± 13,49 p=0,45	11,84 ± 7,24 34,49 ± 51,13 23,11 ± 20,90 p=0,52	1,98 ± 1,07 8,92 ± 22,87 5,34 ± 11,94 p= 0,73	2,27 ± 1,02 8,79 ± 12,83 6,28 ± 9,31 p=0,57	4,81 ± 6,80 52,02 ± 88,90 29,08 ± 40,29 p=0,41
pNmic pN1-N2 pN3	162,66 ± 161,62 104,69 ± 72,68 78,42 ± 60,92 p=0,28	25,79 ± 41,53 6,65 ± 9,10 9,79 ± 17,03 p=0,08	37,46 ± 54,35 28,65 ± 23,07 18,82 ± 18,42 p=0,58	16,04 ± 34,43 5,47 ± 10,24 1,93 ± 2,05 p=0,27	10,04 ± 12,93 9,25 ± 12,04 1,30 ± 1,39 p=0,34	105,9 ± 191,52 35,40 ± 50,22 38,05 ± 50,76 p=0,20
Grado histológico G I - II G III	92,96 ± 113,13 124,13 ± 97,77 p=0,08	12,76 ± 30,77 15,70 ± 23,09 p=0,34	31,47 ± 50,66 28,91 ± 31,70 p=0,76	7,78 ± 22,22 8,03 ± 16,50 p=0,30	7,22 ± 11,14 7,39 ± 9,54 p=0,91	32,10 ± 51,74 69,19 ± 109,09 p=0,19
Hormonosensibilidad No Si	111,24 ± 74,23 92,03 ± 106,47 p=0,09	20,18 ± 29,02 14,65 ± 30,80 p=0,90	29,95 ± 25,19 33,01 ± 47,05 p=0,55	8,67 ± 26,46 7,62 ± 18,86 p=0,90	9,15 ± 17,16 8,79 ± 13,24 p=0,79	80,60 ± 118,76 30,13 ± 50,23 p=0,13
Sobreexpresión Her2 Negativo Positivo	103,72 ± 112,30 136,02 ± 52,78 p=0,06	14,76 ± 29,56 7,17 ± 4,46 p=0,81	31,39 ± 46,81 30,52 ± 17,07 p=0,40	8,21 ± 21,32 4,45 ± 5,55 p=0,58	7,67 ± 10,96 4,80 ± 5,26 p=0,92	44,04 ± 79,85 73,05 ± 72,75 p=0,13

4.2 Estudio del valor pronóstico de la infiltración linfocitaria tras la quimioterapia.

En el análisis de la supervivencia según las subpoblaciones de TIL tras la QTn, se ha objetivado que las pacientes con niveles mayores de la media de infiltración por CD68 presentaban peor SLE que las pacientes con niveles menores de CD68 en el tumor residual (tabla 48) (figura 16).

Tabla 48 . Análisis de supervivencia según TIL post-QT			
TIL post-QT > mediana	SG (log-rank)	SLE (log-rank)	SLED (log-rank)
CD3	p=0,95	p=0,08	p=0,33
CD4	p=0,75	p=0,69	p=0,51
CD8	p=0,98	p=0,51	p=0,47
FOXP3	p=0,14	p=0,58	p=0,72
CD20	p=0,08	p=0,82	p=0,82
CD68	p=0,71	p=0,03	p=0,17
CD4/CD8	p=0,82	p=0,79	p=0,58
FOXP3/CD3	p=0,15	p=0,06	p=0,08
FOXP3/CD8	p=0,55	p=0,82	p=0,59
CD68/CD8	p=0,23	p=0,57	p=0,16

Se realizó también un análisis multivariante para SLE y SG, donde se incluyeron las variables clínicamente relevantes (RCp y afectación ganglionar para SLE, afectación ganglionar para SG) y los distintos parámetros de infiltración linfocitaria con valor pronóstico para SLE en el análisis univariante. La infiltración post-QT por CD68 (p=0,07 para SLE y p=0,39 para SG) perdió su significación en el estudio multivariante.

Análisis de la infiltración linfoide en la enfermedad tumoral residual (resistente a QTn)

El tumor residual tras la QTn podría ser considerado como la fracción del tumor resistente a la quimioterapia, por lo que el análisis de las características del infiltrado inmune en él podría ofrecer información válida sobre cuál es el perfil de respuesta en el microambiente tumoral que puede mediar la resistencia al tratamiento. El estudio de la infiltración linfoide tumoral en aquellas pacientes que no habían conseguido respuesta completa del tumor primario tras QTn no mostró diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las distintas poblaciones linfoides.

El análisis pronóstico de la infiltración linfocitaria tumoral en las pacientes que no alcanzaron RCp confirma el valor pronóstico negativo de la infiltración residual por CD68 (p=0,05) para la SLE, si bien no hubo diferencias para la SG ni la SLED (tabla 49). En el análisis multivariante para SLE, donde se incluyeron las variables clínicamente relevantes, se confirma el valor pronóstico negativo de la infiltración por CD68 en la neoplasia residual tras QTn (tabla 50).

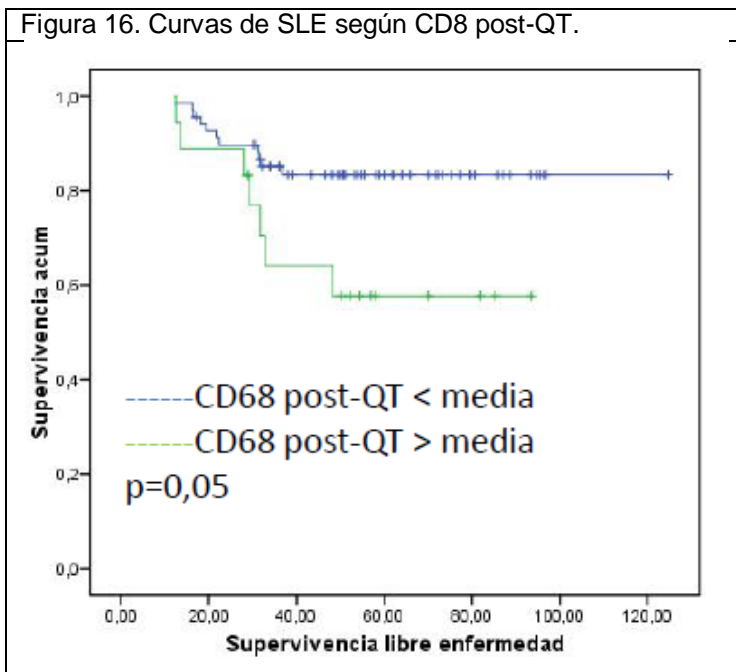
Tabla 49. Análisis univariante de supervivencia según TIL post-QT en pacientes sin RCp.

TIL post-QT > mediana	SG (log-rank)	SLE (log-rank)	SLED (log-rank)
CD3	p=0,89	p=0,06	p=0,26
CD4	p=0,39	p=0,88	p=0,64
CD8	p=0,73	p=0,21	p=0,19
FOXP3	p=0,17	p=0,69	p=0,84
CD20	p=0,09	p=0,96	p=0,60
CD68	p=0,77	p=0,05	p=0,24
CD4/CD8	p=0,75	p=0,92	p=0,84
FOXP3/CD3	p=0,24	p=0,09	p=0,13
FOXP3/CD8	p=0,94	p=0,97	p=0,79
CD68/CD8	p=0,33	p=0,65	p=0,20

Tabla 50. Análisis multivariante de SLE y TIL post-QT en pacientes sin RCp

Variable independiente	SLE		
	p	OR	IC 95% Inf - sup
Afectación ganglionar: N2-3	0,007	3,72	1,43 - 9,65
CD68	0,05	2,54	0,96 - 6,67

Figura 16. Curvas de SLE según CD8 post-QT.



Análisis del impacto pronóstico de la infiltración linfoide post-QTn por subtipos.

Por otra parte, los mecanismos de resistencia mediados por la respuesta inmune podrían ser diferentes en los distintos grupos de neoplasia. Por ello se ha realizado un análisis pronóstico en función del fenotipo tumoral al diagnóstico y de la infiltración linfoide post-QTn tanto en el conjunto de las pacientes como en aquellas que no alcanzaron la respuesta completa en el tumor primario y que presentaban tumor residual (tabla 51). Así, se ha objetivado que en las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama subtipo hormonossensible la infiltración alta post-QT por CD8 ($p=0,04$), CD20 ($p=0,05$) y CD68 ($p=0,04$) es un factor pronóstico adverso para SLE. Además en las pacientes con cáncer de mama hormonossensible que no alcanzaron RCp, la alta infiltración linfocitaria por CD8 se relaciona con menor SLE ($p=0,04$). En las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama Her2+ la infiltración linfocitaria del tumor residual por CD68 es un factor de mal pronóstico para SLE, tanto en el conjunto de estas pacientes ($p=0,02$), como en el subgrupo que no alcanzó RCp ($p=0,04$). Los resultados de este subestudio requieren confirmación en una serie mayor de pacientes.

Tabla 51. Análisis de SLE según fenotipo tumoral, TIL post-QT y RCp.

TIL post-QT > mediana	Hormonossensible		Her2		Triple negativo	
	Total	no RCp	Total	no RCp	Total	no RCp
CD3	$p=0,27$	$p=0,31$	$p=0,70$	$p=0,22$	$p=0,49$	$p=0,88$
CD4	$p=0,65$	$p=0,64$	$p=0,62$		$p=0,48$	$p=0,37$
CD8	$p=0,03$	$p=0,04$	$p=0,94$	$p=0,22$	$p=0,17$	$p=0,14$
FOXP3	$p=0,18$	$p=0,19$	$p=0,62$		$p=0,20$	$p=0,20$
CD20	$p=0,05$	$p=0,07$	$p=0,62$	$p=0,61$	$p=0,08$	$p=0,30$
CD68	$p=0,04$	$p=0,06$	$p=0,02$	$p=0,04$	$p=0,98$	$p=0,54$
CD4/CD8	$p=0,69$	$p=0,67$	$p=0,27$	$p=0,61$	$p=0,58$	$p=0,48$
FOXP3/CD3	$p=0,29$	$p=0,34$	$p=0,62$		$p=0,12$	$p=0,20$
FOXP3/CD8	$p=0,99$	$p=0,90$	$p=0,90$	$p=0,41$	$p=0,43$	$p=0,55$
CD68/CD8	$p=0,15$	$p=0,15$	$p=0,90$	$p=0,61$	$p=0,97$	$p=0,88$
CD4/CD8/CD68	$p=0,52$	$p=0,51$	$p=0,55$	$p=0,61$	$p=0,50$	$p=0,96$

4.3 Conclusiones del estudio de la infiltración linfocitaria tras la quimioterapia.

En el estudio de la infiltración linfocitaria tras la quimioterapia se han encontrado los siguientes resultados:

- Los TIL presentes en el tumor residual no se asocian de forma estadísticamente significativa a ninguna de las variables clínico-patológicas del tumor al diagnóstico con valor pronóstico. Como excepción hayamos una mayor infiltración post-QT de CD4 ($p=0,05$), CD8 ($p=0,01$) y CD20 ($p=0,03$) en tumores poco diferenciados al diagnóstico.
- Las pacientes que presentaron infiltración linfocitaria tumoral alta post-QT por CD68 tras la administración de QTn presentaron menor SLE ($p=0,03$).
- Las pacientes sin RCp tras la QTn con alta infiltración alta pos-QT por CD68 presentan menor SLE ($p=0,05$). En el análisis multivariante se confirma el valor pronóstico negativo en estas pacientes.
- El análisis por subtipos IHQ de cáncer de mama ha permitido demostrar un significado distinto para las distintas poblaciones inmunes en los distintos tipos de neoplasia:
 - En los tumores hormonosensibles son factores pronósticos negativos para SLE:
 - En general, la infiltración alta post-quimioterapia por CD68 ($p=0,04$), por CD8 ($p=0,03$) y CD20 ($p=0,05$). Además, en pacientes hormonosensibles que no alcanzaron RCp con la QTn, la infiltración alta del tumor residual post-QT por CD8 ($p=0,04$) se asocia a una disminución de la SLE
 - En los tumores Her2+ la infiltración alta post-QT por CD68, en el conjunto de las pacientes ($p=0,02$), así como en las pacientes sin RCp ($p=0,04$) se asocia con disminución de SLE.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

- 1. Factores predictivos de respuesta y pronósticos dependientes del tumor***
- 2. Factores predictivos de respuesta y pronósticos dependientes de la infiltración linfocitaria***
 - 2.1 Determinación de la infiltración linfocitaria basal***
 - 2.2 Infiltración linfoide elevada inicial como marcador de buen pronóstico y marcador de respuesta***
 - 2.3 Variación inducida por la quimioterapia en la población linfocitaria con la respuesta al tratamiento como factor pronóstico y predictivo de respuesta***
 - 2.4 Análisis de la relevancia pronostica del infiltrado linfocitario en el tumor residual***
 - 2.5 Perspectivas de futuro. Implicaciones clínicas y terapéuticas***

En este trabajo se han estudiado 121 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama estadio II-III sometidas a tratamiento de QTn (antraciclinas y taxanos secuenciales en su mayor parte), diagnosticadas la mayoría entre 2004 y 2008 y con una mediana de seguimiento de 5 años. El hallazgo principal de este trabajo ha sido la identificación de factores predictivos de respuesta y pronósticos en íntima relación con la infiltración por células inmunes existente en el microambiente tumoral, que además son independientes de los factores predictivos y pronósticos clásicos dependientes del propio tumor.

A continuación se analiza la relevancia tanto de los factores predictivos y pronósticos dependientes del propio tumor como los dependientes de la infiltración linfocitaria del tumor encontrados en este estudio.

1. FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA Y PRONÓSTICOS DEPENDIENTES DEL TUMOR.

Las pacientes incluidas en nuestra serie, en general tienen un perfil similar a las incluidas en otras series de neoadyuvancia¹⁶⁷. La tasa de RCp (ypT0/ypTis ypN0) fue del 17,4%: en el 20,8% de las pacientes se objetivó RCp a nivel del tumor primario y hasta 26,4% de RCp axilares. Estos datos son congruentes con lo publicado en estudios previos⁴⁰. Aunque la definición estricta de RCp es ypT0 ypN0, la inclusión de pacientes sin carcinoma invasor pero con carcinoma ductal in situ tras la QTn, no modifica significativamente los resultados en los análisis de RCp como factor pronóstico^{40, 168}. La distribución de RCp según el fenotipo tumoral al diagnóstico mostró diferencias significativas ($p < 0,001$), dato en concordancia con lo publicado en la literatura^{50, 88, 169, 170}. Barghava y col⁸⁸, en un estudio con 359 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama y tratadas con QTn, observaron que el 13% de las pacientes alcanzaron RCp y que fueron los subtipos IHQ HER2 (33%) y triple negativo (30%) los que alcanzaron mayor tasa de RCp. Resultados similares fueron publicados por Rouzier y col⁵⁰, que determinaron el perfil de expresión génica de 82 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama y tratadas con QTn: el 45% de los tumores Her2 y el 45% de los triples negativos alcanzaron RCp. En el presente estudio el 61% de los tumores Her2 y el 27% de los triples negativos alcanzaron RCp con la QTn frente al 3,3% de los hormonosensibles Her2 negativos y al 18% de los hormonosensibles Her2 positivos.

En este estudio la tasa de cirugía conservadora tras la QTn en pacientes con cáncer de mama fue del 41,3%. En las pacientes con indicación de neoadyuvancia por carcinoma de mama operable al diagnóstico no susceptible de cirugía conservadora al diagnóstico se realizó cirugía conservadora tras la QTn en el 62% de las pacientes. Estudios clásicos y muy sólidos demostraron en su momento el aumento de la tasa de cirugía conservadora en estos tumores operables de entrada. Rouzier y col¹⁷¹ analizaron de forma retrospectiva 594 pacientes con cáncer de mama T2-T3 que recibieron tratamiento con QTn: el 48% de las pacientes fue susceptible de cirugía conservadora tras el tratamiento. Bonadonna¹⁷² estudió 536 pacientes con cáncer de mama incluidas en ensayos prospectivos que incluían tratamiento de QT neo y adyuvante. En el 62% de las pacientes incluidas con tumores mayores de 5 cm se realizó cirugía conservadora. En el estudio NSABP-18¹⁵ se incluyeron 1523 pacientes con cáncer de mama que fueron randomizadas a quimioterapia esquema AC neoadyuvante ó adyuvante. La tasa de cirugía conservadora fue mayor en las pacientes que recibieron QTn (67,8% vs, 59,7%).

En el análisis de factores predictivos de respuesta (RCp) fueron significativos el grado histológico y el fenotipo tumoral. Sin embargo, solamente el fenotipo tumoral se comportó como factor predictivo independiente en el estudio multivariante ($p=0,006$). Estos datos reflejan la relevancia creciente de la clasificación fenotípica o molecular del cáncer de mama, que también ha sido comunicada por otros autores^{173, 174}. Yoo¹⁷³ analizó de forma retrospectiva 276 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama que habían sido tratadas con QTn: el 16,3% de

las pacientes alcanzaron RCp, y el subtipo triple negativo fue un factor predictivo de respuesta independiente (OR= 3,21; p=0,02).

En nuestra serie la RCp y el estadio clínico ganglionar al diagnóstico son factores pronósticos para SLE y la afectación ganglionar al diagnóstico lo es para la SG. El valor pronóstico de la RCp ha sido demostrado ampliamente por varios grupos. Así, Kuerer y col ¹⁷⁵ describen en una serie de 372 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama localmente avanzado e incluidas en dos ensayos de neoadyuvancia, que las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en tratamiento con QTn y RCp presentaban mayor SG y SLE que las que no alcanzaron RCp (SG a 5 años 89 vs. 64%; SLE a 5 años 87 vs. 58%), aunque no demuestran el valor pronóstico de la afectación ganglionar al diagnóstico. Yoo ¹⁷³ en su serie retrospectiva, previamente comentada, encontró que la RCp se asociaba de forma significativa a mayor SLE de las pacientes (p=0,008). La relevancia del valor pronóstico de la afectación ganglionar al diagnóstico en el cáncer de mama también ha sido demostrada. Mendoza y col ¹⁷⁶ estudian en una serie retrospectiva de 215 pacientes con cáncer de mama (54% estadio precoz y 46% localmente avanzado) los factores predictores de desarrollo precoz de metástasis (< 24 meses tras cirugía y adyuvancia) y concluyen que el tamaño tumoral y la afectación ganglionar son los mayores predictores de aparición precoz de metástasis óseas y viscerales junto con el fenotipo triple negativo. Un estudio retrospectivo con mayor número de pacientes (813) demuestran que las pacientes con mayor afectación ganglionar al diagnóstico presentan menor supervivencia tras la recaída de la enfermedad (42 meses en N0 vs. 20 meses en N1 vs 13 en N2-N3), confirmando además en el análisis uni y multivariante su valor independiente como factor predictor de muerte relacionada con el cáncer ¹⁷⁷. Resultados similares han sido descritos en otros estudios ¹⁷⁸.

2. FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA Y PRONÓSTICO DEPENDIENTES DE LA INFILTRACIÓN LINFOCITARIA.

2.1 Determinación de la infiltración linfoide basal (pre-quimioterapia).

En los estudios publicados hasta la fecha la determinación de TIL y sus puntos de corte son muy variables, y los recuentos de TIL en su mayoría manuales. Este hecho hace difícilmente interpretables los resultados y podrían ser una dificultad añadida para la implantación de la técnica como parte del estudio anatomopatológico rutinario del cáncer de mama. Por ello, la introducción de sistemas de análisis morfométrico automatizado podría simplificar su realización a la vez que hacer más objetiva y reproducible la valoración de cada caso. En este estudio, el análisis de la infiltración linfocitaria ha sido por tanto realizado con este tipo de abordaje: tras un escaneado a alta resolución con escáner de portas Leica SCN400F, las imágenes digitalizadas fueron analizadas con un programa de análisis de imagen, previa optimización de la técnica mediante la comparación con la evaluación anatomopatológica habitual hasta conseguir recuentos consistentes. Un segundo punto clave metodológico es la localización de la infiltración linfocitaria, dado que algunos trabajos han evaluado de forma diferenciada los linfocitos intratumorales y los estromales. Sin embargo, las definiciones son muy variables entre los diferentes estudios^{124, 125} y, por otra parte, esta distinción no parece ser relevante a la luz de lo publicado por Mahmoud¹⁴⁴ y por Loi y col¹⁷⁹, que determinan que ambos tipos de poblaciones, y probablemente los linfocitos de estroma peritumoral (cercano y distante) en mayor medida, se asocian con el pronóstico y la respuesta al tratamiento. En consecuencia, en nuestro estudio no se ha hecho distinción entre los linfocitos intratumorales y estromales para el recuento de TIL. Por otro lado la determinación cuantitativa de la infiltración linfoide tumoral no es sinónimo de la actividad de los linfocitos presentes en dicho infiltrado; sin embargo, es un abordaje que puede ser fácilmente integrable en el estudio inmunohistoquímico inicial de la neoplasia, lo cual le confiere un valor añadido como potencial marcador clínico predictivo de respuesta y pronóstico. Desde el punto de vista metodológico, la serie estudiada, a pesar de tener un pequeño tamaño muestral que ha sido limitante en la obtención de datos significativos en el análisis por subgrupos, es una serie muy homogénea en cuanto al diagnóstico llevado a cabo en todas las pacientes, tratamiento de QT y determinación de respuesta en las mismas, hecho este último de vital importancia para la obtención e interpretación de los datos.

En este estudio en general no se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre las subpoblaciones linfocitarias pre-QT y las principales características clínico-patológicas del tumor. Como excepciones se ha visto que la infiltración pre-QT por CD68 es mayor en tumores cT3-4, en tumores no hormonossensibles, y tiende a ser mayor en los subtipos tumorales IHQ HER2+ y triple negativos. Los datos publicados previamente respecto a la relación existente entre la infiltración linfocitaria en general y las características clínico-patológicas del tumor son heterogéneos y a veces contradictorios entre los diferentes estudios. Existen datos de que en tumores Her2+ la infiltración linfocitaria total es mayor¹⁴⁷, así como la infiltración por FOXP3¹³⁶. Además los tumores no hormonossensibles se relacionan con infiltración por CD8^{56, 158}, FOXP3¹³⁶ y CD20¹³⁷. Por otro lado, la presencia de metástasis ganglionares axilares y el grado histológico alto se asocian con más frecuencia a infiltración linfocitaria tumoral^{124, 125, 128}. Además, existen datos de asociación de diferentes subtipos de TIL con las características del tumor, que en este estudio no se ha demostrado, muy probablemente debido a las limitaciones que el tamaño muestral para este tipo de subestudios. Los TIL CD8 se han relacionado con tumores indiferenciados, no hormonossensibles y con afectación ganglionar^{56, 158}; la infiltración por FOXP3 se ha relacionado con tumores HER2+, indiferenciados y no hormonossensibles¹³⁶; los TIL CD20 son más frecuentes en tumores indiferenciados, no hormonossensibles y basales¹³⁷.

Por último, en el análisis realizado de las subpoblaciones de TIL en relación con la edad encontramos que la media de infiltración por CD8 pre-QT era mayor en mujeres mayores de 40

años, dato congruente con lo publicado ⁵⁶. Además en mujeres mayores de 40 años la infiltración por CD20 es en todos los casos mayor a la media de infiltración, dato que contrasta con lo publicado por Mahmoud que estudio el impacto pronóstico de la infiltración linfocitaria B en 1902 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama, las cuales fueron sometidas a cirugía y diferentes tratamientos adyuvantes. Encontró que la alta infiltración por CD20 era inversamente proporcional a la edad de las pacientes ¹³⁶. Estos datos no son congruentes con los resultados de otro estudio publicado ¹²⁴, en el que la revisión de la anatomía patológica de 1919 casos de cáncer de mama intervenidas reveló una tasa de infiltración linfocitaria del 17% independientemente de la edad de la paciente; sin embargo, en el mismo trabajo se observó que en pacientes menores de 40 años la infiltración linfocitaria se relacionaba con una mayor supervivencia de las pacientes. Posiblemente la diferencia en los diferentes estudios del porcentaje de pacientes jóvenes justifique en parte la diversidad de resultados obtenidos en la posible relación de la edad y la infiltración linfocitaria. Además, puede que el tamaño muestral de nuestra serie sea limitante a la hora de encontrar relaciones significativas entre la infiltración tumoral y las características clínico-anatomopatológicas del tumor. Sin embargo, el hecho de que la infiltración por TIL no esté en relación con el fenotipo o el estadio tumoral, sugieren que el tipo de respuesta inmune en el microambiente tumoral no es explicable únicamente por otras características del tumor y apoyan su valor independiente predictivo y pronóstico.

2.2 Infiltración linfoide elevada inicial como marcador de buen pronóstico y marcador de respuesta.

En esta serie, los niveles más elevados de TIL pre-QT: CD3 ($p < 0,001$), CD4 ($p = 0,003$), FOXP3 ($p = 0,01$) y CD20 pre-QT ($CD20/mm^2$, $p < 0,001$) se asociaron a la aparición de respuesta completa patológica tras QT neoadyuvante. Además tanto el análisis univariante como el multivariante confirman el valor predictivo para la RCp de TIL pre-QT CD3, CD4 y CD20 elevados (mayor de la mediana de infiltración). Estos datos ponen de manifiesto la cooperación entre la respuesta inmune y los efectos del tratamiento (por mecanismos de liberación antigénica y de modulación inmune), que aparentemente es mayor en aquellos tumores que ya tienen una respuesta inmune importante antes del tratamiento. Otras publicaciones han mostrado resultados similares. Denkert y col ⁵⁴ estudian retrospectivamente 1058 biopsias diagnósticas de pacientes incluidas en estudios multicéntricos de neoadyuvancia en cáncer de mama. Sus resultados muestran que las pacientes con tasa de infiltración linfocitaria mayor al 60% presentaban incremento en la tasa total de RCp (40 vs. 7,2%) respecto a las pacientes con menor tasa de infiltración linfocitaria al diagnóstico. En el presente estudio las pacientes con infiltración linfocitaria (CD3, CD4 y CD20) mayor a la media duplican la tasa de RCp de forma significativa (tabla 13). Ono y col ¹⁵⁹ estudiaron 474 pacientes con cáncer de mama estadios II-III y tratadas con QTn, y encontraron que las pacientes Her2+ y triples negativas tenían mayor tasa de RCp; además, las pacientes triples negativas con altos niveles de TIL presentaban RCp en mayor medida que las pacientes con bajos niveles de TIL (37 vs 16%). Ignatidis ¹⁶¹ investigó la asociación entre los módulos de expresión génica y la respuesta a la QTn en el cáncer de mama. Sus conclusiones fueron que los tumores con alta expresión de módulos de respuesta inmune presentaron mayor tasa de RCp independientemente del subtipo tumoral. West y col ¹⁵⁷ demuestran también en otra cohorte de cáncer de mama no hormonosensible que recibió tratamiento QT neoadyuvante, que las pacientes con alta expresión genética de mediadores inmunes presentaban mayor tasa de RCp que las pacientes con baja expresión génica inmune (74 vs. 31%).

La infiltración elevada inicial por linfocitos como marcador de buen pronóstico ya ha sido demostrada en otras series ¹³⁶ y probablemente traduce la existencia de una respuesta inmune antitumoral robusta en el microambiente tumoral. En este trabajo solamente los CD3 altos (mayores de la media de infiltración) se han identificado como factor de buen pronóstico para SG, SLE y SLED. Este resultado está en la misma línea de lo publicado por Zhang y col ¹⁸⁰ en cuya serie de 186 cánceres de ovario se demuestra que las pacientes cuyos tumores estaban infiltrados por CD3 al diagnóstico tenían una supervivencia mayor a los 5 años que las que no presentaban infiltración por CD3 (38 vs. 4,5%). Resultados similares han sido publicados posteriormente por otros autores ¹⁸¹ también en cáncer de mama. West ¹⁵⁷ estudió

255 pacientes con cáncer de mama no hormonossensible tratadas con QT adyuvante: las pacientes con mayores niveles de infiltración tumoral por CD3 que recibieron antraciclinas presentaron mayor SLE ($p=0,002$) que las que tenían niveles menores de CD3. Esta asociación no se observó en aquellas pacientes en las que el esquema de quimioterapia no incluía antraciclinas. El hecho de que tumores con mayor infiltración linfocitaria tumoral al diagnóstico se relacione con mejor pronóstico ha sido también descrito por otros autores ^{125, 128}.

Por otro lado y en íntima relación con lo expuesto, en esta serie, se ha identificado que la ausencia de infiltración por CD20 ($p=0,01$) es un marcador de quimiorresistencia y conlleva una disminución significativa de la tasa de RCp objetivada en cada subtipo. Por el contrario, infiltraciones mayores de la media se relacionan con una mayor tasa de RCp en los tumores sometidos a tratamiento de QTn. En el estudio de Denkert ⁵⁴, comentado previamente, en el que se incluía la determinación de CD3, CD20 y CXCR3, la alta tasa de infiltración linfocitaria fue un factor predictivo de RCp. Además, en este trabajo, la ausencia de CD20 en el infiltrado tumoral es un factor de mal pronóstico para SLE ($p=0,02$); sin embargo, no se ha establecido la que la alta infiltración por CD20 pre-QT sea un factor de buen pronóstico. Estos datos son congruentes con lo publicado en la literatura: infiltraciones altas por CD20 en pacientes diagnosticados de melanoma y cáncer de ovario son predictivos de buen pronóstico ^{182, 183}. Mahmoud ¹³⁶ estudió una serie de 1470 pacientes con cáncer de mama localizado y tratadas con cirugía, en la que se demostró que las pacientes con mayor tasa de infiltración tumoral por CD20 al diagnóstico presentaron mayor supervivencia específica por cáncer de mama ($p=0,03$) y tiempo a la recaída ($p=0,001$). De los diversos mecanismos que se han involucrado en la actividad antitumoral que tienen los TIL CD20, destacan principalmente tres: En primer lugar, los CD20 actúan como células presentadores de Ag a linfocitos CD4 y CD8; de esta forma las células CD20 se unen a los Ag tumorales a través de moléculas Ig de su superficie y tras procesarlos presentan los péptidos a los linfocitos T a través del sistema MHC clase I y II. Además, las células B secretan linfotoxinas que inducen la secreción de moléculas de adhesión por las células del estroma; la secreción de citoquinas y chemoquinas es la responsable del reclutamiento de otras células linfoides. Por último, y no menos importante, los linfocitos B tienen la propiedad de polarizar las células T a TH1 o Th2, según la secreción de IFN_{alfa} o IL4 ^{184, 185}.

Con respecto a los Foxp3, no está claro su valor como factor predictivo, ni como factor pronóstico. En la literatura existen datos tanto que apoyan su valor pronóstico adverso, como otros apoyando su comportamiento como factor de buen pronóstico ^{98, 133, 158, 186, 187}. Es probable que para una mejor identificación de los linfocitos T reguladores sea más correcto la determinación de CD25+ FOXP3+, dado que la especificidad de Foxp3 para la identificación de Treg no es absoluta ¹⁸⁸.

Los macrófagos que infiltran los tumores (TAM) se clasifican, en analogía con la diferenciación Th1 Th2 linfocitaria, en TAM M1 y M2. Los macrófagos M1 están regulados por IFN-gamma, TNF-alfa y GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos), lo cual produce la activación de su capacidad citotóxica, producción de citoquinas proinflamatorias y presentación antigénica ^{189, 190}. Los M2 pueden ser activados por IL4, IL3, IL10, TGF-B e incluso por corticoides, y su activación pone en marcha procesos que alteran la señalización de citoquinas e inactivan las APC; por otro lado, su activación puede iniciar mecanismos a través de PTX3 (*long pentraxin 3*, factor de crecimiento fibroblástico) fibronectinas y otros mediadores que inducen la remodelación del estroma y endotelio favoreciendo así la angiogénesis ¹⁰⁴. La respuesta a la QT está en parte regulada por el microambiente tumoral: se ha demostrado en modelos murinos de cáncer de mama que entre otros mecanismos produce reclutamiento de los monocitos/macrófagos mediante la unión de éstos con factores inducidos en el contexto de la acción de la QT, como CSF-1 e IL34 ¹⁴¹. De hecho, se ha demostrado que el bloqueo de la señal CSF-1 en combinación con la QT produce una disminución de la generación metástasis y de los procesos implicados en la progresión tumoral, que traduce aumento de supervivencia de las pacientes ¹⁴¹. En el presente estudio se ha objetivado que la QTn produjo un descenso significativo de CD68; sin embargo, a diferencia de lo publicado por otros autores ^{141, 191, 192}, no se ha objetivado que la infiltración alta pre-QT por CD68 ni sus variaciones con la QT fuera factor predictivo de respuesta ni factor pronóstico.

En este estudio las pacientes que alcanzaron RCp tenían valores por encima de la media de infiltración de CD4, siendo además la infiltración elevada de CD4 un predictor de RCp tanto en el análisis univariante como en el multivariante. Además, se han encontrado similares resultados para la ratio de infiltración CD4/CD8 ($p < 0,001$). Sin embargo, no se ha establecido el significado pronóstico de la infiltración basal alta por CD4 ni de la ratio CD4/CD8 elevada, a diferencia de lo publicado por Khort y col ¹³⁰ que estableció el valor pronóstico de la infiltración por CD4 CD8 y CD1a en los ganglios axilares de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama. El hecho de que la ratio CD4/CD8 elevada se relacione con un aumento de la SLE queda patente en el trabajo de Recchia y col ¹⁹³ que administraron a pacientes metastásicas en respuesta a QT (antraciclinas y paclitaxel) un tratamiento de inmunoterapia de mantenimiento a base de dosis bajas de IL2 y ácido cis-retinoico, observado que las pacientes que elevaban el ratio CD4/CD8 con el tratamiento presentaban mayor SLE. En otros trabajos se reconoce la importancia de la alta infiltración por CD4 como mecanismo importante para la erradicación tumoral ¹⁹⁴.

Muy probablemente el equilibrio o la relación entre distintas poblaciones de células inmunes tumorales pueden reflejar de forma más exacta el perfil de respuesta inmune en el microambiente tumoral que el análisis de las poblaciones aisladas ¹³⁸⁻¹⁴⁰. Nuestros resultados en la determinación de la importancia predictiva de respuesta y pronóstica de las ratios FOXP3/CD8 (ratio elevada es factor predictivo de RCp) y FOXP3/CD3 (ratio elevada como factor pronóstico adverso para SG, SLE y SLED) están de acuerdo con otros trabajos previos. Liu y col ¹³⁷ encontraron que la ratio elevada FOXP3/CD8 en pacientes diagnosticados de carcinoma de pulmón no microcítico estadio III-IV ($n=159$) era un factor predictivo de respuesta a esquemas basados en platino. Suzuki y col ¹³⁸ estudiaron en 956 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de pulmón estadio I la relevancia pronóstica de la infiltración linfocitaria tumoral, y entre otros resultados observaron que los tumores con una ratio FOXP3/CD3 elevada presentaban mayor tasa de recurrencia a los cinco años que los pacientes con ratios bajas (85 vs. 77%; $p=0,004$). Por otra parte, se ha descrito que la relación entre macrófagos y CD8 es inversamente proporcional. En el trabajo de DeNardo y col, la ratio elevada CD68/CD8 se relacionó con disminución de la tasa de RCp en pacientes con cáncer de mama en tratamiento con QTn y con menor supervivencia de las mismas ¹⁴¹. En el presente estudio se ha encontrado que las pacientes con RCp presentan ratios elevadas de CD68/CD8. Los datos hallados en nuestro estudio son contrarios a los publicados por DeNardo ¹⁴¹, que validó sus resultados en una serie amplia de pacientes con cáncer de mama con y sin afectación ganglionar. Sin embargo, el análisis del perfil inmune en la serie neoadyuvante se realizó mediante rtPCR de CD8 y CD68 en muestras obtenidas mediante aspiración con aguja fina, que probablemente tienen un contenido que en la mayoría de casos es exclusivamente tumoral y con escasa o nula representación del estroma peritumoral. Por el contrario, en nuestra serie el análisis se ha basado en estudios con aguja gruesa, que incluyen tanto tumor como estroma. Aunque no disponemos en nuestro trabajo de un análisis diferenciado de la infiltración de CD8 y CD68 de acuerdo a su localización, es posible que la representatividad de la muestra sea distinta entre ambos estudios. Por otra parte, de acuerdo a Loi (13), la infiltración linfocitaria estromal, cercana o distante, parece ser más relevante que la intratumoral, lo que podría explicar los resultados discordantes con nuestros datos.

Por último, se ha sugerido que la repercusión pronóstica de la infiltración linfocitaria basal es variable dependiendo del subtipo de cáncer de mama. Esta variabilidad ha sido puesta de manifiesto especialmente en grandes series de pacientes tratadas con quimioterapia adyuvante, en las que el impacto pronóstico ha sido en ocasiones únicamente significativo en tumores no hormonodependientes o/y del grupo Her2 ¹⁷⁹. En esta serie, el impacto pronóstico de la infiltración linfocitaria basal no mostró heterogeneidad entre los distintos fenotipos, si bien el tamaño muestral puede haber limitado los resultados y de hecho la división de la muestra condujo a la pérdida de la significación estadística ($p=0,10-0,15$ en los tres subgrupos) del impacto en supervivencia de la infiltración por CD3.

2.3 Variaciones inducidas por la quimioterapia en las poblaciones linfocitarias con la respuesta al tratamiento como factor pronóstico y predictivo de respuesta a la QT.

La quimioterapia sistémica induce cambios en la respuesta inmune, que están todavía poco caracterizados, aunque hay una evidencia creciente de la existencia de mecanismos de cooperación entre QT e inmunidad. Se sabe, por estudios realizados en cáncer de mama con linfocitos de sangre periférica, que una linfopenia excesiva inducida por quimioterapia puede ser un marcador de mal pronóstico^{195, 196}. Sin embargo, más allá del análisis poco detallado de la inmunosupresión producida por la QT, el análisis del cambio inducido por QT en el patrón de respuesta inmune del microambiente tumoral ha sido abordado solo en unos pocos trabajos. El cáncer de mama tratado con QTn es un modelo ideal para valorar estos cambios, dada la posibilidad de estudio histológico pre- y post-tratamiento, y de hecho varios artículos recogen el patrón de cambio en el infiltrado inmune tras tratamiento^{55, 157, 158, 162}, aunque los resultados han sido dispares.

Precisamente el que consideramos como resultado más novedoso de este trabajo es la demostración de que el tipo de cambio de infiltración linfocitaria tumoral inducido por QTn está asociado tanto a la respuesta anti-tumoral como a la supervivencia, lo que sugiere la existencia tanto de mecanismos de cooperación QT-inmunidad en la destrucción tumoral como de modulación por la QTn de la respuesta inmune anti-tumoral a largo plazo.

En nuestra serie, la administración de quimioterapia produce un descenso en la infiltración tumoral por CD4, CD20 y CD68; y un aumento en la infiltración por CD8, sin variaciones significativas en FOXP3. La cifra global de infiltración T (CD3) mostró una tendencia a aumentar, que no fue significativa probablemente por la dirección opuesta de los cambios de CD4 y CD8. La comparación de estos cambios globales con lo referido por otros autores es difícil por la ausencia de datos en muchos trabajos, si bien otros estudios han mostrado también estabilidad de las cifras de CD3 y CD8¹⁵⁸ y disminuciones de CD68¹⁶². Más llamativos son los resultados que muestran una asociación entre la variación de las distintas subpoblaciones de células inmunes y la respuesta al tratamiento. Así, las pacientes con RCp tras la QTn presentaban descensos significativamente mayores de CD3, CD4, CD20 y CD68 en comparación con las pacientes que no habían presentado RCp. En el análisis multivariante se mantenían como factores predictivos de quimiorresistencia (no RCp) los descensos menores de CD4, CD3 y CD20. La tendencia fue la opuesta para CD8, con cifras estables o aumentadas en pacientes con RCp, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística ($p=0,08$). El aumento de CD8 ya ha sido relacionado con la respuesta en dos publicaciones anteriores^{55, 158}, así como el descenso de FOXP3 que produce la QTn en las pacientes que alcanzan RCp¹⁵⁸. Solamente Ruffell y cols, describen una pequeña serie de pacientes con cáncer de mama ($n=6$) tratadas con QTn en la que el análisis exhaustivo del infiltrado leucocitario muestra un descenso de CD4 y de CD20 asociado a un aumento de CD8, que se interpretó como un indicador del descenso de la respuesta Th2, aunque no se aportan datos de respuesta al tratamiento¹⁹⁷.

Por otra parte, no existen, hasta donde sabemos, estudios previos que demuestren un impacto pronóstico del cambio de infiltrado linfocitario inducido por la QTn. En nuestra serie los descensos mayores de CD3 con la QT se asociaban a mayor SG, SLE y SLED. Se podría sugerir que estos datos están condicionados por el mayor efecto de la QTn en tumores con infiltración linfocitaria basal alta, en los que es más fácil que ésta también induzca un descenso mayor en la infiltración por TIL. Así, el impacto pronóstico del descenso de CD3 podría relacionarse con la mayor frecuencia de RCp, uno de los factores clave en la supervivencia. Si bien en el análisis multivariante para la SLE, el valor del descenso de CD3 perdió su valor independiente, la $p=0,08$ roza la significación estadística y sugiere que el efecto inmunológico de la QT puede estar relacionado con la respuesta inmune antitumoral post-tratamiento a largo plazo y no solo con la respuesta a la quimioterapia. La modificación del perfil de infiltración por la QTn podría estar relacionada con cambios en el balance de la respuesta inmune en el microambiente tumoral. Existen datos experimentales amplios que demuestran que cuando la infiltración linfocitaria del tumor tiene un perfil Th2, el resultado es la proliferación tumoral¹⁹⁸.

Por el contrario, la infiltración predominante por CD8 y CD4 Th1 conlleva la destrucción tumoral¹⁹⁸. Teniendo en cuenta que nuestros resultados parecen ser similares al cambio de perfil de respuesta inmune inducido por QTn en el estudio de Ruffell y cols, es posible que el cambio de patrón de infiltración por TIL traduzca un descenso de Th2 a favor de Th1: disminución de CD3, CD4, CD20, CD68 y aumento significativo de CD8. Esta modulación de la respuesta inmune anti-tumoral probablemente es llevada a cabo tanto por la actividad citotóxica de la quimioterapia como por la activación de las células inmunes preexistentes¹²². Aunque el análisis del tipo de respuesta requeriría otro abordaje metodológico, nuestros datos sugieren que el descenso más acusado de CD3 puede ser un marcador de la capacidad de la quimioterapia para modular el balance de la respuesta inmune, relacionado con la eficacia de la respuesta linfocitaria anti-tumoral post-tratamiento y con su impacto en la supervivencia a largo plazo.

Por último, la aparente discordancia que plantea el impacto pronóstico tanto de la mayor infiltración basal como de la mayor disminución de la infiltración por TIL, podría sugerir que el perfil de infiltrado inmune asociado a una mayor respuesta a QTn (y, por tanto, relacionado con una mayor cooperación inmunidad-QT en la destrucción celular) es distinto del patrón de infiltrado linfocitario post-tratamiento, asociado a una respuesta anti-tumoral más robusta y por tanto más relevante para la supervivencia.

Con respecto al análisis de las variaciones de TIL según el fenotipo tumoral al diagnóstico, potencialmente relacionado con diferentes mecanismos de modulación inmune¹⁶¹, nuestros datos sugieren que este problema debe ser abordado en una serie mayor de pacientes, ya que el limitado número de pacientes en el análisis por subtipos tumorales impide obtener conclusiones válidas.

2.4 Análisis de la relevancia pronóstica del infiltrado linfocitario en el tumor residual.

El análisis de la composición del microambiente tumoral en el tumor residual de las pacientes que no responden a la QTn, es sin lugar a dudas un punto de partida excelente en el estudio de la quimiorresistencia y un marco ideal para diseñar nuevas estrategias terapéuticas en estas pacientes de mal pronóstico¹⁹⁹⁻²⁰¹. Existen varios estudios previos en cáncer de mama que han evaluado el perfil de infiltración por células inmunes en el tejido tumoral residual. De Maria en su serie de 25 pacientes con cáncer de mama y tratamiento neoadyuvante, determinó que la presencia de TIL tras la QT se relacionaba con la respuesta a la misma, siendo en su serie la infiltración post-QT predominante la infiltración por CD8⁵⁵. Así mismo, otros autores demostraron que las pacientes con tumor residual tras la QTn presentaban la ratio CD8/CD4 elevada¹⁹⁷. Sin embargo en otros estudios se concluye que la infiltración linfocitaria en el cáncer de mama tras la QTn disminuía en el tumor residual de las pacientes que no habían alcanzado RCp, mientras que la infiltración por macrófagos aumentaba¹⁶². En nuestra serie, los recuentos de TIL post-QT no se asociaban de forma significativa a ninguna de las variables anatomopatológicas del tumor residual. Además no se encontraron diferencias significativas en la infiltración por los diferentes subtipos de TIL según la existencia o no de RCp con la QTn (tabla 25). Este hecho apoya que la infiltración linfocitaria tras la QT es independiente del tumor residual.

El análisis de la muestra post-QT, tanto de las pacientes respondedoras como las no respondedoras, encontramos que las pacientes con mayor infiltración por CD68 post-QT presentaban peor SLE (p=0,03). Existen trabajos publicados donde se describe que la infiltración tumoral por macrófagos es factor predictivo de mal pronóstico²⁰²⁻²⁰⁴, pero no existe hasta la fecha ningún trabajo sobre el significado pronóstico de la infiltración linfocitaria residual tras la QT. Aunque en el estudio de Hornychova comentado previamente¹⁶², las pacientes sin RCp presentaban aumento de CD68 a diferencia de las que alcanzaron RCp, no se analizó la trascendencia pronóstica que este hecho pudiera tener.

Es muy posible que los mecanismos de resistencia mediados por la repuesta inmune difieran entre los diversos fenotipos tumorales. En el análisis según los subtipos tumorales al diagnóstico, en el fenotipo Her2 la alta infiltración por CD68 es un factor de mal pronóstico para SLE. Además, en los tumores hormonossensibles al diagnóstico se ha objetivado que la alta infiltración post-QT por CD8 ($p=0,04$), CD20 ($p=0,05$) y CD68 ($p=0,04$) era un factor pronóstico adverso para SLE. Estos datos parecen estar en contradicción con los perfiles relacionados con la respuesta en lo que respecta a la infiltración por CD8, y son necesarios estudios adicionales y con tamaños muestrales mayores para aclarar el valor de la respuesta inmune en el tumor residual post-QTn.

2.5 Perspectivas de futuro. Implicaciones clínicas y terapéuticas.

El hallazgo principal de este trabajo ha sido la identificación de factores predictivos de respuesta y pronósticos en íntima relación con la infiltración por células inmunes existente en el microambiente tumoral, que además son independientes de los factores predictivos y pronósticos clásicos dependientes del propio tumor.

En este estudio se ha puesto de manifiesto que la infiltración elevada pre-QT linfocitaria tumoral por CD3, CD4 y CD20, así como las ratios elevadas CD4/CD8 y FOXP3/CD8 tienen un valor independiente (análisis univariante y multivariante) como factor predictivo de RCp. Este hecho lleva consigo la posibilidad de poder seleccionar a priori las pacientes respondedoras a la QT para tratamiento neoadyuvante, especialmente en el caso de que la indicación de neoadyuvancia sea con intención de cirugía conservadora. Además el hecho de que no exista relación significativa entre la infiltración linfocitaria tumoral y el fenotipo de cáncer de mama, significa que podríamos seleccionar a estas pacientes desde la combinación de dos factores predictivos de respuesta: los dependientes del tumor y los dependientes del microambiente tumoral. Si bien es verdad que habría que validar los datos obtenidos en una serie mayor de pacientes, también lo es que el hecho de poder determinar la infiltración linfocitaria por métodos rutinarios de IHQ supondría una implantación fácil y no costosa de la técnica desde el punto de vista asistencial. Está claro, que habría que determinar el punto de corte de infiltración tumoral para la toma de decisiones de forma estandarizada, pero es probable que con la validación de los datos en una serie mayor, el valor del punto de corte de infiltración tumoral alta vs baja quedara también estandarizado.

Por otro lado, los resultados de este trabajo permiten plantear la posibilidad de nuevas dianas terapéuticas inmunes. Las pacientes con cáncer de mama y sometidas a tratamiento neoadyuvante que no alcanzan RCp son las pacientes con peor pronóstico y mayor riesgo de recaída, pero a día de hoy no está claro si el tratamiento adyuvante adicional con QT proporciona una ventaja añadida. Por ello, este grupo es el ideal para el estudio de nuevas estrategias terapéuticas que incrementen la supervivencia. En este estudio las pacientes con alta infiltración post-QT de CD68 presentan peor SLE tanto en pacientes respondedoras como no respondedoras. Este dato podría servir para seleccionar a las pacientes potencialmente incluíbles como población diana de nuevas estrategias de tratamiento inmune adyuvante. En particular, el ejemplo de las pacientes con cáncer de mama Her2, que son las que alcanzan mayores tasas de RCp con el tratamiento neoadyuvante desde la inclusión de trastuzumab en el esquema de tratamiento, hace pensar que la actividad inmunológica de los tratamientos, como ocurre con el trastuzumab, puede contribuir a la mejoría de la supervivencia.

Es muy probable que el mejor tratamiento que podamos ofrecer a las pacientes con cáncer de mama en un futuro sea una combinación de armas terapéuticas, que, además de la QT, la cirugía, el tratamiento hormonal y los tratamientos antidiana ya consolidados como tratamiento efectivo (tratamiento antiHer2), incluirá también otros tratamientos frente a potenciales dianas inmunológicas. En este sentido y a la luz de los resultados alcanzados en este estudio quizá sea clave el estudio de tratamientos antiCD68 y de fármacos capaces de modular el balance Th1/Th2. Existen diversos trabajos publicados que investigan la potencial

efectividad en la erradicación tumoral de mecanismos basados en el papel de la IL-2 como inductor de la proliferación de CD8, o en la actividad de IFN-gamma, cuyo efecto es probable que se lleve a cabo mediante la maduración de las células dendríticas y terapias celulares adoptivas. En el caso particular del cáncer de mama se está investigando entre otros la vacuna Eps8 y el papel del tratamiento de mantenimiento con dosis baja de IL2 y ácido cis-retinoico ²⁰⁵.

En resumen, la neoadyuvancia es el contexto ideal para la exploración de nuevas dianas terapéuticas, dado que por un lado permite estudiar *in vivo* potenciales marcadores predictivos de respuesta y por otro la enfermedad residual tras la QT constituye un escenario rico en factores pronósticos y marcadores de resistencia que pueden facilitar la selección de las pacientes candidatas a tratamiento adicionales. En este trabajo se ha puesto de manifiesto la importancia del microambiente tumoral, concretamente los TIL como factor predictivo de respuesta y pronóstico, aunque es necesaria la validación de los resultados hallados en este estudio.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos propuestos, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. En relación a la evaluación del tipo de infiltración tumoral linfocitaria previa al tratamiento con QTn en el cáncer de mama, definida por las subpoblaciones T (CD3), CD4, CD8, Treg (Foxp3) y B (CD20), macrófagos (CD68) y su valor como marcador de respuesta y factor pronóstico:
 - a. La infiltración del cáncer de mama por las diferentes subpoblaciones de linfocitos y macrófagos no se relaciona con las características clínicas y anatomopatológicas al diagnóstico.
 - b. La infiltración elevada (superior a la media) por las subpoblaciones linfocitarias CD3, CD4 y CD20 se asocia a un aumento significativo de la tasa de respuesta completa patológica (RCp) tras quimioterapia neoadyuvante, de forma independiente al fenotipo tumoral. Por el contrario, la ausencia de infiltración por CD20 y por FOXP3 conlleva una disminución significativa de la tasa de RCp.
 - c. Las ratios elevadas CD4/CD8 y FOXP3/CD8 predicen de forma independiente la aparición de RCp tras el tratamiento.
 - d. La infiltración global basal elevada por linfocitos T (CD3) se asocia a una mayor supervivencia libre de enfermedad y global de las pacientes. Por el contrario, la ratio FOXP3/CD3 elevada y la ausencia de linfocitos CD20 se relacionaron con peor supervivencia libre de enfermedad y global. Aunque estos resultados no fueron confirmados en el análisis multivariante para supervivencia global, sí mostraron una tendencia fuerte, muy cercana a la significación estadística, para la supervivencia libre de enfermedad.
2. En relación a la evaluación de las variaciones inducidas por la quimioterapia neoadyuvante (QTn) en la infiltración linfocitaria definida por las subpoblaciones T (CD3), CD4, CD8, Treg (Foxp3) y B (CD20), macrófagos (CD68) y su valor como marcador de respuesta a la QT y factor pronóstico las conclusiones de este estudio son:
 - a. Con la administración de QT (antraciclina y taxanos) existe una disminución significativa en la infiltración por CD4, CD20, CD68, y un descenso no significativo de CD3. Por el contrario, con la QTn se produce un aumento significativo en la infiltración tumoral por CD8.
 - b. Las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama que alcanzaron una RCp tras la QTn presentaron descensos mayores de la infiltración tumoral por CD3, CD4, CD20. Estas variaciones han sido además identificadas como factores predictores independientes de RCp.
 - c. El descenso elevado de CD3 producido por la QT se ha relacionado con mayor supervivencia global y libre de enfermedad de las pacientes, si bien solamente en el análisis multivariante para la supervivencia libre de enfermedad se observa una tendencia cercana a la significación estadística.
3. En relación a la evaluación en la infiltración linfocitaria definida por las subpoblaciones T (CD3), CD4, CD8, Treg (Foxp3) y B (CD20), macrófagos (CD68) tras la quimioterapia y su valor como factor pronóstico las conclusiones de este estudio son:
 - a. Los linfocitos y macrófagos presentes en el tumor residual no se asocian de forma estadísticamente significativa a ninguna de las variables clínico-patológicas del tumor con valor pronóstico.

- b. La infiltración post-QT alta por CD68 se ha relacionado con peor supervivencia tanto en pacientes con RCp como en aquellas pacientes resistentes al tratamiento. En estas últimas, la infiltración elevada por CD68 en el tumor residual es un factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de enfermedad.
4. Como conclusión general, en el cáncer de mama estadio II-III tratado con QTn, al margen de los factores predictivos y pronósticos clásicos dependientes del propio tumor, el tipo de infiltración por células inmunes del microambiente tumoral se comporta también como un factor independiente predictivo de respuesta y con valor pronóstico. El conocimiento del perfil de respuesta inmune tumoral en cada paciente podría permitir una mejor selección de las pacientes para el manejo neoadyuvante del cáncer de mama, así como para la selección de subgrupos de pacientes con peor pronóstico en las que, además del tratamiento convencional, podrían plantearse nuevas estrategias terapéuticas, iniciales o de mantenimiento, dirigidas a dianas relacionadas con la modulación de la respuesta inmune antitumoral.

ANEXO. PUBLICACIONES

Baseline CD4/CD8 tumor infiltrating lymphocytes (TIL) ratio predicts pathologic response to neoadjuvant chemotherapy (NC) in breast cancer

Elena García-Martínez, Ginés Luengo Gil, Asunción Chaves Benito, Teresa García García, Ma Angeles Vicente Conesa, Marta Zafra Poves, Elisa García Garre, Vicente Vicente García, Francisco Ayala de la Peña, Hospital G. Universitario Morales Meseguer. Murcia, Spain



Abstract

Background: Tumor microenvironment immune response has been correlated with chemotherapy efficacy. The aim of this study was to determine whether baseline and post-treatment CD4 and CD8 TIL predict tumor response in women with breast cancer (BC) receiving NC.

Methods: We analyzed TIL CD4 and CD8 subpopulations in BC patients treated with sequential anthracyclines and taxanes NC. A tissue microarray with paired pre- and post-NC biopsies was built, and immunohistochemically stained for CD4 and CD8. Tumor area-adjusted morphometric analysis was performed with Image J software after slide scanning and digitalization (results expressed as TIL count/mm²). Statistical analysis was done with SPSS 15.0 software.

Results: We included 121 consecutive patients. Clinical stages: 15.7% IIA, 28% IIB, 33.3% IIIA, 6.6% IIIB, 16.5% IIIC. Histology: 93% ductal infiltrating carcinomas. Phenotypic classification by immunohistochemistry (IHC): 50.4% RE+ and/or RP+ and HER2NEU negative, 13.2% RE+ and/or RP+ and HER2NEU positive, 9.9% RE- and RP- and HER2NEU positive, 21.5% RE- and RP- and HER2NEU negative, 5% non-classifiable. Treatment: 80.2% AC x 4 courses followed by docetaxel x 4 courses. Pathological response: complete pathologic response (pCR) rate was 17.4% (primary tumor pCR: 20.7%; axillary pCR: 35.5%). After a median follow up of 52 months neither overall survival (OS) nor disease free survival (DFS) has been reached.

Mean pre-chemotherapy CD4 count was 59,98 (± 107,53, SD). We did not find any association with clinical or pathological tumor characteristic at diagnosis (stage, grade, homogeneity, HER2NEU overexpression or IHC tumor classification). Mean CD4 count was significantly higher in patients achieving pCR than in patients without pCR (112,43 vs 49,91 CD4/mm²; p=0,009). Mean pre-chemotherapy CD8 count was 16,23 (± 56,96, SD) and was higher in grade 3 carcinomas (32,83 vs 22,37; p=0,03); no other association with tumor characteristics or with pCR was found.

Mean variation in CD4 after NC (postNC - preNC count) was 47,35 (± 104,49) CD4/mm², and it was larger in patients with pCR (102,01 vs 36,85 CD4/mm²; p=0,010). An opposite non-significant trend was observed for CD8 variation after NC (pCR: 39,42 vs non-pCR: 20,22; p=0,14).

To integrate the influence of both CD4 and CD8 on response to chemotherapy, the predictive value of pre-treatment ratio between CD4 and CD8 counts (CD4/CD8) was analyzed. We found a highly significant difference for CD4/CD8 between patients with and without pCR to NC (103 vs 17; p<0.002). Multivariate logistic regression analysis demonstrated that only a high pretreatment CD4/CD8 ratio (p=0.006), hormone sensitivity (p=0.03) and Her2 overexpression (p=0.01) independently predicted pCR after NC. No differences in overall or disease-free survival were demonstrated for high vs. low CD4/CD8 pre-NC ratio.

Conclusion: A high pretreatment CD4/CD8 ratio independently predicted pathological complete response in patients with invasive breast cancer receiving anthracyclines chemotherapy and taxanes NC. Our results support the contribution of tumor microenvironment immunologic response to effects on breast cancer. [Supported by GEICAM-Beca Ana Balli]

Background

Breast cancer is the most common cancer among women(1). Locally advanced breast cancer (LABC) and operable breast cancer are currently considered as indications for neoadjuvant chemotherapy (NCT).

Interactions between the tumor and the immune system following immunosurveillance may result in sculpting of the tumor for increasingly aggressive growth and further resistance to immune destruction(2). Tumor immunosurveillance includes both adaptive and innate immune responses that may limit the development and growth of neoplasms. T cells seem to be critical for immunosurveillance, although the balance of their subpopulations may favor either tumor elimination or tumor escape.

Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) modulates tumor invasion, growth, metastasis, and patient outcomes (3). Several studies have shown that higher infiltration by TIL are associated with improved outcome (4-6)

Methods

Patients Clinical data were retrospectively collected from 121 consecutive patients with stage II or III breast cancer who received NCT in the Department of Hematology and Medical Oncology, University Hospital Morales Meseguer.

Pathology Assessment ER and PR status were assessed by IHC, and Her-2 status was assessed by either fluorescent in situ hybridization or a validated IHC method (Herceptest, Dako North America, 5 Inc.).

Pathological complete response (pCR) was defined as the absence of invasive carcinoma both in the breast and the axilla, regardless of the presence of carcinoma in situ.

We performed an immunohistochemical classification of breast tumor: RE+ and/or RP+ and HER2NEU negative; RE+ and/or RP+ and HER2NEU positive; RE- and RP- and HER2NEU positive; RE- and RP- and HER2NEU negative; 5% non-classifiable.

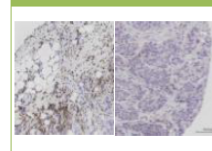
Treatment Preoperative chemotherapy included both taxanes and anthracyclines. NSABP-B27 regimen was the most frequently used, including cyclophosphamide (600 mg/m²/21 days) and doxorubicin (60 mg/m²/21 days) for 4 courses, followed by docetaxel (100 mg/m²/21 days) for 4 cycles. After its approval, trastuzumab was administered concomitantly with taxanes to those patients whose tumors overexpressed HER2.

After definitive surgery, hormone therapy, trastuzumab and radiotherapy was administered following standard indications.

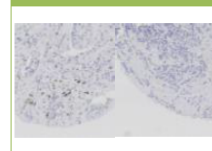
Tumoral Lymphocytes Assessment A tissue microarray with paired pre- and post-NC biopsies was built, and immunohistochemically stained for CD4 and CD8. Tumor area-adjusted morphometric analysis was performed with Image J software after slide scanning and digitalization (results expressed as TIL count/mm²).

Statistical Analyses Statistical analysis was carried out with SPSS 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

High expression CD4 preNC Low expression CD4 postNC



High expression CD8 preNC Low expression CD8 postNC



Results

Patients demographics are summarized in Tables 1 and 2. Pathological response: complete pathologic response (pCR) rate was 17.4% (primary tumor pCR: 20.7%; axillary pCR: 35.5%) (Figure 1). After a median follow up of 52 months neither overall survival (OS) nor disease free survival (DFS) has been reached.

Mean pre-chemotherapy CD4 count was 59,98 (± 107,53, SD). We did not find any association with clinical or pathological tumor characteristic at diagnosis (stage, grade, homogeneity, HER2NEU overexpression or IHC tumor classification). Mean CD4 and CD8 count were significantly higher in patients achieving pCR than in patients without pCR (Table 3).

To integrate the influence of both CD4 and CD8 on response to chemotherapy, the predictive value of pre-treatment ratio between CD4 and CD8 counts (CD4/CD8) was analyzed. We found a highly significant difference for CD4/CD8 between patients with and without pCR to NC (103 vs 17; p<0.002). Multivariate logistic regression analysis demonstrated that only a high pretreatment CD4/CD8 ratio (p=0.006), hormone sensitivity (p=0.03) and Her2 overexpression (p=0.01) independently predicted pCR after NC (Table 4). No differences in overall or disease-free survival were demonstrated for high vs. low CD4/CD8 pre-NC ratio.

Table 1. Patients demographics

N	121	100%
Age (years)		
Median	56,4	
Range	(21-79)	
Menopausal status		
Postmenopausal	60	49,6
Premenopausal	61	50,4
Operable breast cancer	66	54,5
Locally advanced breast cancer	55	45,5
Clinical stage		
IIA	19	15,7
IIB	34	28,1
IIIA	40	33,1
IIIB	6	5,0
IIIC	20	16,5
N Stage		
N0	39	32,2
N1	36	29,8
N2	25	20,7
N3	21	17,4
Type		
Ductal	113	93,4
Lobular	5	4,1
Others	3	2,5
Histologic Grade		
I	7	5,8
II	37	30,6
III	60	49,6
Unknown	12	10,0
IHC subtype		
RE+ y/o RP+ y HER2NEU-	61	50,4
RE+ y/o RP+ y HER2NEU+	16	13,2
RE- y RP- y HER2NEU+	12	9,9
RE- y RP- y HER2NEU-	26	21,5
Non classifiable	6	5,0

Table 2. Patients demographics

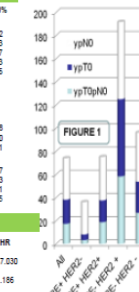
N	121	100%
Chemotherapy scheme		
AC34 + Docetaxel x 4	97	80,2
Anthracycline and Taxanes	10	8,3
Non Anthracycline	2	1,7
Non Anthracycline-Taxane	4	3,3
Anthracycline-Taxane concomitant	8	6,6
Adjuvant chemotherapy		
No	107	88
Yes	14	
Trastuzumab treatment		
No	99	81,8
Yes	17	14,0
Local treatment		
Mastectomy	62	51,7
Breast conservation surgery BCT	60	49,3
BCT and mastectomy	5	4,1
BCT and resection	3	2,5

Table 4. Logistic regression model for pCR

	P	HR
Her2 positivity	0,16	7,030
Hormone sensitivity	0,03	1,06
High CD4/CD8 ratio	0,06	9,548
Constant High CD4/CD8 ratio	0,04	1,15

Table 3. Relationship between CD4-CD8 and pCR (Tueli C32)

TIL/mm ²	pCR	No pCR	(p=0,009)
Pre chemotherapy CD4	112,4	49,9	(p=0,010)
Variation CD4 (pre-post chemotherapy)	102	36,85	(p=0,14)
Variation CD8 (pre-post chemotherapy)	39	20	(p=0,002)
Pre chemotherapy CD4/CD8	103	14	



Conclusions

A high pretreatment CD4/CD8 ratio independently predicted pathological complete response in patients with invasive breast cancer receiving anthracyclines and taxanes NC.

Our results support the contribution of tumor microenvironment immunologic response to chemotherapy effects on breast cancer. [Supported by GEICAM-Beca Ana Balli]

References

1. Jemal A. *CA Cancer J Clin*. 2011
2. Reiman. *Semin Cancer Biol*. 2007
3. Mouawad. *J Clin Oncol*. 2011
4. Aaltonen S. *Eur J Cancer*. 1992
5. Alexe G. *Cancer Res*. 2007
6. Mahmoud SM. *J Clin Oncol*. 2011

QR Code will be placed here

Predictive value of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) for response to breast cancer neoadjuvant chemotherapy (NCT).

Elena Garcia-Martinez, Gines Luengo-Gil, Asuncion Chaves, Lorena Velazquez, Enrique Gonzalez-Billalabeitia, Maria Angeles Vicente-Conesa, Teresa Garcia, Elisa Garcia-Garre, Vicente Vicente, Francisco Ayala
Hospital G. Universitario Morales Meseguer, Murcia, Spain



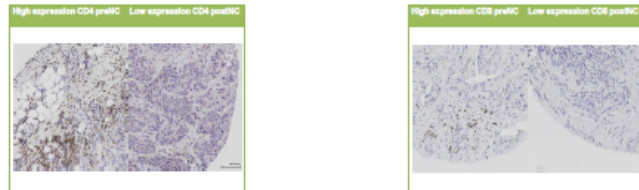
Abstract

Background: The association of tumor microenvironment immune response with outcome after breast cancer (BC) NCT has been suggested by several studies. However, the relevance of each TIL subpopulation is still controversial. The objective of this study was to evaluate the predictive and prognostic value of TIL before and after NCT in patients with BC.

Methods: We analyzed TIL and CD68 cells in pre- and post-chemotherapy biopsies of BC patients treated with NCT (80.4% sequential AC-docetaxel). A tissue microarray with paired pre- and post-NCT biopsies was built, and stained with Immunohistochemistry (IHC) for CD3, CD4, CD8, CD20, FOXP3 and CD68. Morphometric analysis (TIL count/mm²) was performed after slide scanning and digitalization.

Results: We included 121 consecutive patients with invasive BC, most of them with stages IIB (28%) or IIIA-C (56.4%). IHC phenotype: 50.4% Her2- hormone-sensitive (HS), 13.2% Her2+ HS, 10.7% Her2+ non-HS, and 21.5% triple negative. Pathologic complete response (pCR): 17.4%. Median overall survival (OS) and disease free survival (DFS) has not been reached (median follow-up: 60 months). Higher than median pre-NCT TIL infiltration was predictive of pCR to NCT: CD3 > 172/mm² (p=0.001; Hazard Ratio [HR]: 9.61, 95% confidence interval [95%CI] 2.49-37.02); CD4 > 67/mm² (p=0.001; HR: 8.82, 95%CI 2.43-31.96); CD20 > 42/mm² (p=0.001; HR: 8.71, 95%CI 2.31-32.74). Logistic regression multivariate models including grade and IHC phenotype confirmed the independent predictive value of higher pre-NCT CD3, CD4, and CD20 for pCR. In the group of patients with HS Her2- BC without pCR (n=44), higher infiltration (cut-point: median value) by some TIL subpopulations and by CD68 cells in post-NCT residual tumor associated to lower DFS: CD8 > 37/mm² (log-rank; p=0.04), CD20 > 14/mm² (p=0.07) and CD68 > 39/mm² (p=0.06).

Conclusion: Higher pre-treatment CD3, CD4 and CD20 TIL predicted pCR in patients with invasive BC receiving anthracyclines and taxanes NCT, while higher infiltration of residual tumor by CD8 associated to worse DFS in patients with HS Her2- BC without pCR after NCT. TIL might be useful as predictive factors in the setting of NCT for BC [Supported by GEICAM-Beca Ana Balli].



Background

Breast cancer is the most common cancer among women(1). Locally advanced breast cancer (LABC) and operable breast cancer are currently considered as indications for neoadjuvant chemotherapy (NCT).

Interactions between the tumor and the immune system following immunosurveillance may result in sculpting of the tumor for increasingly aggressive growth and further resistance to immune destruction(2). Tumor immunosurveillance includes both adaptive and innate immune responses that may limit the development and growth of neoplasms. T cells seem to be critical for immunosurveillance, although the balance of their subpopulations may favor either tumor elimination or tumor escape.

Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) modulates tumor invasion, growth, metastasis, and patient outcomes (3). Several studies have shown that higher infiltration by TIL are associated with improved outcome (4-6).

Methods

Patients: Clinical data were retrospectively collected from 121 consecutive patients with stage II or III breast cancer who received NCT in the Department of Hematology and Medical Oncology, University Hospital Morales Meseguer.

Pathology Assessment: ER and PR status were assessed by IHC, and Her-2 status was assessed by either fluorescent in situ hybridization or a validated IHC method (Herceptest, Dako North America, 5 Inc.).

Pathological complete response (pCR) was defined as the absence of invasive carcinoma both in the breast and the axilla, regardless of the presence of carcinoma in situ.

We performed an Immunohistochemical classification of breast tumor: RE+ and/or RP+ and HER2NEU negative; RE+ and/or RP+ and HER2NEU positive; RE- and RP- and HER2NEU positive; RE- and RP- and HER2NEU negative; non-classifiable.

Treatment: Preoperative chemotherapy included both taxanes and anthracyclines. NSABP-B27 regimen was the most frequently used, including cyclophosphamide (600 mg/m²/21 days) and doxorubicin (60 mg/m²/21 days) for 4 courses, followed by docetaxel (100 mg/m²/21 days) for 4 cycles. After its approval, trastuzumab was administered concomitantly with taxanes to those patients whose tumors overexpressed HER2.

After definitive surgery, hormone therapy, trastuzumab and radiotherapy was administered following standard indications.

Tumoral Lymphocytes Assessment: A tissue microarray with paired pre- and post-NCT biopsies was built, and immunohistochemically stained for CD3, CD4, CD8, CD20, FOXP3 and CD68. Tumor area-adjusted morphometric analysis was performed with Image J software after slide scanning and digitalization (results expressed as TIL count/mm²).

Statistical Analysis: Statistical analysis was carried out with SPSS 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Patients demographics are summarized in Table 1. Pathological response: complete pathologic response (pCR) rate (ypT0 ypN0) was 17.4% (primary tumor pCR: 20.7%; axillary pCR: 26.4%). In the Figure 1 it is showed the relationship between pCR and IHC phenotype. After a median follow up of 60 months neither overall survival (OS) nor disease free survival (DFS) has been reached. Patients with pCR had better DFS (Figure 2).

The pre-NCT TIL infiltration is showed in figure 3. Patients with pCR had higher pre-NCT TIL infiltration than patients without pCR (Figure 4), what it is more, higher than median pre-NCT TIL infiltration was predictive of pCR to NCT: CD3 > 172/mm² (p=0.001; Hazard Ratio [HR]: 9.61, 95% confidence interval [95%CI] 2.49-37.02); CD4 > 67/mm² (p=0.001; HR: 8.82, 95%CI 2.43-31.96); CD20 > 42/mm² (p=0.001; HR: 8.71, 95%CI 2.31-32.74). Logistic regression multivariate models including grade and IHC phenotype confirmed the independent predictive value of higher pre-NCT CD3, CD4, and CD20 for pCR (table 2). In the group of patients with HS Her2- BC without pCR (n=44), higher infiltration (cut-point: median value) by some TIL subpopulations and by CD68 cells in post-NCT residual tumor associated to lower DFS: CD8 > 37/mm² (log-rank; p=0.04), CD20 > 14/mm² (p=0.07) and CD68 > 39/mm² (p=0.06), Table 3.

Conclusions

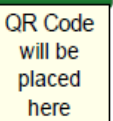
Higher pre-treatment CD3, CD4 and CD20 TIL predicted pCR in patients with invasive BC receiving anthracyclines and taxanes NCT, while higher infiltration of residual tumor by CD8 associated to worse DFS in patients with HS Her2- BC without pCR after NCT. TIL might be useful as predictive factors in the setting of NCT for BC.

Our results support the contribution of tumor microenvironment immunologic response to chemotherapy effects on breast cancer. [Supported by GEICAM-Beca Ana Balli]



References

1. Jemal A. CA Cancer J Clin. 2011
2. Reiman. Semin Cancer Biol. 2007
3. Mowatow. J Clin Oncol. 2011
4. Aaltomaa S. Eur J Cancer 1992
5. Alexe G. Cancer Res. 2007
6. Mahmoud SM. J Clin Oncol. 2011



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012 Jul;62(4):220-41.
- (2) Sanchez MJ, Payer T, De AR, Larranaga N, Capocaccia R, Martinez C. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol* 2010 May;21 Suppl 3:iii30-iii36.
- (3) varo-Meca A, Debon A, Gil PR, Gil de MA. Breast cancer mortality in Spain: Has it really declined for all age groups? *Public Health* 2012 Aug 22.
- (4) Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005 Dec 17;366(9503):2087-106.
- (5) Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002 Oct 17;347(16):1233-41.
- (6) Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med* 2003 Aug 7;349(6):546-53.
- (7) Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2011 Feb 9;305(6):569-75.
- (8) Olivetto IA, Bajdik CD, Ravdin PM, Speers CH, Coldman AJ, Norris BD, et al. Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005 Apr 20;23(12):2716-25.
- (9) Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L, Moliterni A, Terenziani M, et al. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute. *J Clin Oncol* 1998 Jan;16(1):93-100.
- (10) Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002 Sep 1;20(17):3628-36.
- (11) Chollet P, Charrier S, Brain E, Cure H, van P, I, Feillel V, et al. Clinical and pathological response to primary chemotherapy in operable breast cancer. *Eur J Cancer* 1997 May;33(6):862-6.
- (12) Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Hortobagyi G. Inflammatory breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 1992 Jun;10(6):1014-24.
- (13) Khan A, Sabel MS, Nees A, Diehl KM, Cimmino VM, Kleer CG, et al. Comprehensive axillary evaluation in neoadjuvant chemotherapy patients with ultrasonography and sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2005 Sep;12(9):697-704.
- (14) Bear HD, Anderson S, Brown A, Smith R, Mamounas EP, Fisher B, et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 2003 Nov 15;21(22):4165-74.
- (15) Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998 Aug;16(8):2672-85.
- (16) Valachis A, Mauri D, Polyzos NP, Chlouverakis G, Mavroudis D, Georgoulas V. Trastuzumab combined to neoadjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast* 2011 Dec;20(6):485-90.
- (17) von Minckwitz G, Raab G, Caputo A, Schutte M, Hilfrich J, Blohmer JU, et al. Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPAR DUO study of the German Breast Group. *J Clin Oncol* 2005 Apr 20;23(12):2676-85.

- (18) von Minckwitz G, Blohmer JU, Raab G, Lohr A, Gerber B, Heinrich G, et al. In vivo chemosensitivity-adapted preoperative chemotherapy in patients with early-stage breast cancer: the GEPARTRIO pilot study. *Ann Oncol* 2005 Jan;16(1):56-63.
- (19) Huober J, von MG, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat* 2010 Nov;124(1):133-40.
- (20) Moebus V, Jackisch C, Lueck HJ, du BA, Thomssen C, Kurbacher C, et al. Intense dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin, paclitaxel, and cyclophosphamide compared with conventionally scheduled chemotherapy in high-risk primary breast cancer: mature results of an AGO phase III study. *J Clin Oncol* 2010 Jun 10;28(17):2874-80.
- (21) Green MC, Buzdar AU, Smith T, Ibrahim NK, Valero V, Rosales MF, et al. Weekly paclitaxel improves pathologic complete remission in operable breast cancer when compared with paclitaxel once every 3 weeks. *J Clin Oncol* 2005 Sep 1;23(25):5983-92.
- (22) Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Guillem P, V, Semiglazov V, Lluch A, et al. Feasibility and tolerability of sequential doxorubicin/paclitaxel followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil and its effects on tumor response as preoperative therapy. *Clin Cancer Res* 2005 Dec 15;11(24 Pt 1):8715-21.
- (23) Hutcheon AW, Heys SD, Sarkar TK. Neoadjuvant docetaxel in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003;79 Suppl 1:S19-S24.
- (24) Evans TR, Yellowlees A, Foster E, Earl H, Cameron DA, Hutcheon AW, et al. Phase III randomized trial of doxorubicin and docetaxel versus doxorubicin and cyclophosphamide as primary medical therapy in women with breast cancer: an anglo-celtic cooperative oncology group study. *J Clin Oncol* 2005 May 1;23(13):2988-95.
- (25) Chang J, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Clark GM, Makris A, et al. Biologic markers as predictors of clinical outcome from systemic therapy for primary operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1999 Oct;17(10):3058-63.
- (26) Ellis P, Smith I, Ashley S, Walsh G, Ebbs S, Baum M, et al. Clinical prognostic and predictive factors for primary chemotherapy in operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998 Jan;16(1):107-14.
- (27) Rouzier R, Mathieu MC, Sideris L, Youmsi E, Rajan R, Garbay JR, et al. Breast-conserving surgery after neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy for large breast tumors. *Cancer* 2004 Sep 1;101(5):918-25.
- (28) Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, Kau SW, Broglio K, Theriault RL, et al. Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *J Clin Oncol* 2005 Jan 1;23(1):41-8.
- (29) Mathieu MC, Rouzier R, Llombart-Cussac A, Sideris L, Koscielny S, Travagli JP, et al. The poor responsiveness of infiltrating lobular breast carcinomas to neoadjuvant chemotherapy can be explained by their biological profile. *Eur J Cancer* 2004 Feb;40(3):342-51.
- (30) Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005 Jun 1;23(16):3676-85.
- (31) Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjulandin S, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet* 2010 Jan 30;375(9712):377-84.
- (32) Untch M, Rezai M, Loibl S, Fasching PA, Huober J, Tesch H, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. *J Clin Oncol* 2010 Apr 20;28(12):2024-31.
- (33) Untch M, Loibl S, Bischoff J, Eidtmann H, Kaufmann M, Blohmer JU, et al. Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012 Feb;13(2):135-44.
- (34) Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di CS, de AE, Aura C, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet* 2012 Feb 18;379(9816):633-40.

- (35) Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012 Jan;13(1):25-32.
- (36) Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999 Feb;17(2):460-9.
- (37) Scholl SM, Pierga JY, Asselain B, Beuzeboc P, Dorval T, Garcia-Giralt E, et al. Breast tumour response to primary chemotherapy predicts local and distant control as well as survival. *Eur J Cancer* 1995 Nov;31A(12):1969-75.
- (38) Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol* 2008 Feb 10;26(5):778-85.
- (39) Mazouni C, Peintinger F, Wan-Kau S, Andre F, Gonzalez-Angulo AM, Symmans WF, et al. Residual ductal carcinoma in situ in patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome. *J Clin Oncol* 2007 Jul 1;25(19):2650-5.
- (40) von MG, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2012 May 20;30(15):1796-804.
- (41) Ogston KN, Miller ID, Payne S, Hutcheon AW, Sarkar TK, Smith I, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast* 2003 Oct;12(5):320-7.
- (42) Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007 Oct 1;25(28):4414-22.
- (43) Buzdar AU, Singletary SE, Booser DJ, Frye DK, Wasaff B, Hortobagyi GN. Combined modality treatment of stage III and inflammatory breast cancer. M.D. Anderson Cancer Center experience. *Surg Oncol Clin N Am* 1995 Oct;4(4):715-34.
- (44) Chen AM, Meric-Bernstam F, Hunt KK, Thames HD, Outlaw ED, Strom EA, et al. Breast conservation after neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 2005 Feb 15;103(4):689-95.
- (45) Jeruss JS, Mittendorf EA, Tucker SL, Gonzalez-Angulo AM, Buchholz TA, Sahin AA, et al. Combined use of clinical and pathologic staging variables to define outcomes for breast cancer patients treated with neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2008 Jan 10;26(2):246-52.
- (46) Mittendorf EA, Jeruss JS, Tucker SL, Kolli A, Newman LA, Gonzalez-Angulo AM, et al. Validation of a novel staging system for disease-specific survival in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2011 May 20;29(15):1956-62.
- (47) Rouzier R, Pusztai L, Delaloge S, Gonzalez-Angulo AM, Andre F, Hess KR, et al. Nomograms to predict pathologic complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 2005 Nov 20;23(33):8331-9.
- (48) Esserman LJ, Berry DA, Cheang MC, Yau C, Perou CM, Carey L, et al. Chemotherapy response and recurrence-free survival in neoadjuvant breast cancer depends on biomarker profiles: results from the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657). *Breast Cancer Res Treat* 2012 Apr;132(3):1049-62.
- (49) Goldstein NS, Decker D, Severson D, Schell S, Vicini F, Margolis J, et al. Molecular classification system identifies invasive breast carcinoma patients who are most likely and those who are least likely to achieve a complete pathologic response after neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 2007 Oct 15;110(8):1687-96.
- (50) Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005 Aug 15;11(16):5678-85.
- (51) Kaufmann M, von MG, Mamounas EP, Cameron D, Carey LA, Cristofanilli M, et al. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2012 May;19(5):1508-16.

- (52) Andre F, Berrada N, Desmedt C. Implication of tumor microenvironment in the resistance to chemotherapy in breast cancer patients. *Curr Opin Oncol* 2010 Nov;22(6):547-51.
- (53) Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 2009 Jan;15(1):68-74.
- (54) Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010 Jan 1;28(1):105-13.
- (55) Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, Yee HT, Oratz R, Formenti SC, et al. Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001 Oct;7(10):3025-30.
- (56) Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2011 May 20;29(15):1949-55.
- (57) Puztai L. Current status of prognostic profiling in breast cancer. *Oncologist* 2008 Apr;13(4):350-60.
- (58) Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004 Dec 30;351(27):2817-26.
- (59) van 't V, Dai H, van de V, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002 Jan 31;415(6871):530-6.
- (60) Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005 Feb 19;365(9460):671-9.
- (61) Cianfrocca M, Gradishar W. New molecular classifications of breast cancer. *CA Cancer J Clin* 2009 Sep;59(5):303-13.
- (62) Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
- (63) Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010 Nov 1;16(21):5222-32.
- (64) 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.
- (65) Haakensen VD, Lingjaerde OC, Luders T, Riis M, Prat A, Troester MA, et al. Gene expression profiles of breast biopsies from healthy women identify a group with claudin-low features. *BMC Med Genomics* 2011;4:77.
- (66) Tang P, Skinner KA, Hicks DG. Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready? *Diagn Mol Pathol* 2009 Sep;18(3):125-32.
- (67) 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 11;98(19):10869-74.
- (68) Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009 Mar 10;27(8):1160-7.
- (69) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012 Oct 4;490(7418):61-70.
- (70) Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res* 2008;10(4):R65.
- (71) Colombo PE, Milanezi F, Weigelt B, Reis-Filho JS. Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction. *Breast Cancer Res* 2011 Jun 27;13(3):212.
- (72) Hornberger J, Alvarado MD, Rebecca C, Gutierrez HR, Yu TM, Gradishar WJ. Clinical validity/utility, change in practice patterns, and economic implications of risk stratifiers to predict outcomes for early-stage breast cancer: a systematic review. *J Natl Cancer Inst* 2012 Jul 18;104(14):1068-79.

- (73) Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE, Ellis IO, Caldas C. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol* 2007;8(8):R157.
- (74) Bergamaschi A, Tagliabue E, Sorlie T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, et al. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol* 2008 Feb;214(3):357-67.
- (75) Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 2008 May;14(5):518-27.
- (76) Tang P, Wang J, Bourne P. Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same? *Hum Pathol* 2008 Apr;39(4):506-13.
- (77) Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol* 2009 Apr;20(4):628-35.
- (78) Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011 Aug;22(8):1736-47.
- (79) Chia SK, Bramwell VH, Tu D, Shepherd LE, Jiang S, Vickery T, et al. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2012 Aug 15;18(16):4465-72.
- (80) Brouckaert O, Laenen A, Vanderhaegen J, Wildiers H, Leunen K, Amant F, et al. Applying the 2011 St Gallen panel of prognostic markers on a large single hospital cohort of consecutively treated primary operable breast cancers. *Ann Oncol* 2012 Oct;23(10):2578-84.
- (81) Tamimi RM, Colditz GA, Hazra A, Baer HJ, Hankinson SE, Rosner B, et al. Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012 Jan;131(1):159-67.
- (82) Millar EK, Graham PH, McNeil CM, Browne L, O'Toole SA, Boulghourjian A, et al. Prediction of outcome of early ER+ breast cancer is improved using a biomarker panel, which includes Ki-67 and p53. *Br J Cancer* 2011 Jul 12;105(2):272-80.
- (83) Wang Y, Yin Q, Yu Q, Zhang J, Liu Z, Wang S, et al. A retrospective study of breast cancer subtypes: the risk of relapse and the relations with treatments. *Breast Cancer Res Treat* 2011 Nov;130(2):489-98.
- (84) Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol* 2010 Apr 1;28(10):1684-91.
- (85) Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepak T, Costello D, Crowley P, et al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)* 2010;4:35-41.
- (86) Kornegoor R, Verschuur-Maes AH, Buerger H, Hogenes MC, de Bruin PC, Oudejans JJ, et al. Molecular subtyping of male breast cancer by immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2012 Mar;25(3):398-404.
- (87) Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast* 2012 Feb;21(1):50-7.
- (88) Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ, Ozbek U, Soran A, Johnson RR, et al. Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy: a single institutional experience with 359 cases. *Cancer* 2010 Mar 15;116(6):1431-9.
- (89) Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre 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* 2008 Mar 10;26(8):1275-81.
- (90) Goldstein NS, Decker D, Severson D, Schell S, Vicini F, Margolis J, et al. Molecular classification system identifies invasive breast carcinoma patients who are most likely and those who are least likely to achieve a complete pathologic response after neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 2007 Oct 15;110(8):1687-96.

- (91) Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol* 2009;2(5):444-55.
- (92) rb-Esfahani S, Loibl S, Muller BM, Roller M, Denkert C, Komor M, et al. Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormone and HER2 receptor expression in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2009;11(5):R69.
- (93) Guarneri V, Broglio K, Kau SW, Cristofanilli M, Buzdar AU, Valero V, et al. Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. *J Clin Oncol* 2006 Mar 1;24(7):1037-44.
- (94) de Ronde JJ, Hannemann J, Halfwerk H, Mulder L, Straver ME, Vrancken Peeters MJ, et al. Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. *Breast Cancer Res Treat* 2010 Jan;119(1):119-26.
- (95) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- (96) Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 2008 Oct 6;27(45):5904-12.
- (97) Castells M, Thibault B, Delord JP, Couderc B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci* 2012;13(8):9545-71.
- (98) Liu F, Li Y, Ren M, Zhang X, Guo X, Lang R, et al. Peritumoral FOXP3(+) regulatory T cell is sensitive to chemotherapy while intratumoral FOXP3(+) regulatory T cell is prognostic predictor of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012 Sep;135(2):459-67.
- (99) Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002 Dec 19;420(6917):860-7.
- (100) Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010 Mar 19;140(6):883-99.
- (101) Ruffell B, DeNardo DG, Affara NI, Coussens LM. Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010 Feb;21(1):3-10.
- (102) DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2007;9(4):212.
- (103) Tan TT, Coussens LM. Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007 Apr;19(2):209-16.
- (104) DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* 2010 Jun;29(2):309-16.
- (105) Hussein MR, Hassan HI. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. *J Clin Pathol* 2006 Sep;59(9):972-7.
- (106) Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003 Jan 16;348(3):203-13.
- (107) Vial T, Descotes J. Immunosuppressive drugs and cancer. *Toxicology* 2003 Apr 1;185(3):229-40.
- (108) de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006 Jan;6(1):24-37.
- (109) Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 2007 May;117(5):1137-46.
- (110) de IC-M, Grande-Pulido E, bero-Tamarit A, Codes-Manuel de Villena ME. Cancer and immune response: old and new evidence for future challenges. *Oncologist* 2008 Dec;13(12):1246-54.
- (111) Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol* 2007 Apr;19(2):203-8.
- (112) Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001 Dec;7(12):1339-46.

- (113) Kremer KN, Kumar A, Hedin KE. Haplotype-independent costimulation of IL-10 secretion by SDF-1/CXCL12 proceeds via AP-1 binding to the human IL-10 promoter. *J Immunol* 2007 Feb 1;178(3):1581-8.
- (114) Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006 May 25;441(7092):431-6.
- (115) Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004 Jan;4(1):71-8.
- (116) Rollins BJ. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer* 2006 Apr;42(6):760-7.
- (117) Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996 Oct 15;56(20):4625-9.
- (118) Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, et al. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res* 2005 Jun 15;65(12):5278-83.
- (119) Reiman JM, Kmiecik M, Manjili MH, Knutson KL. Tumor immunoeediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin Cancer Biol* 2007 Aug;17(4):275-87.
- (120) Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006 Sep;25(3):409-16.
- (121) Mouawad R, Spano JP, Khayat D. Lymphocyte infiltration in breast cancer: a key prognostic factor that should not be ignored. *J Clin Oncol* 2011 May 20;29(15):1935-6.
- (122) Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008 Jan;8(1):59-73.
- (123) Marsigliante S, Biscozzo L, Marra A, Nicolardi G, Leo G, Lobreglio GB, et al. Computerised counting of tumour infiltrating lymphocytes in 90 breast cancer specimens. *Cancer Lett* 1999 May 3;139(1):33-41.
- (124) Menard S, Tomasic G, Casalini P, Balsari A, Pilotti S, Cascinelli N, et al. Lymphoid infiltration as a prognostic variable for early-onset breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 1997 May;3(5):817-9.
- (125) Lee AH, Gillett CE, Ryder K, Fentiman IS, Miles DW, Millis RR. Different patterns of inflammation and prognosis in invasive carcinoma of the breast. *Histopathology* 2006 May;48(6):692-701.
- (126) 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 21;109(8):2796-801.
- (127) Schmidt M, Bohm D, von TC, Steiner E, Puhl A, Pilch H, et al. The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer Res* 2008 Jul 1;68(13):5405-13.
- (128) Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, et al. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer* 1992;28A(4-5):859-64.
- (129) Wong PY, Staren ED, Tereshkova N, Braun DP. Functional analysis of tumor-infiltrating leukocytes in breast cancer patients. *J Surg Res* 1998 Apr;76(1):95-103.
- (130) Kohrt HE, Nouri N, Nowels K, Johnson D, Holmes S, Lee PP. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Med* 2005 Sep;2(9):e284.
- (131) Chin Y, Janseens J, Vandepitte J, Vandenbrande J, Opdebeek L, Raus J. Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from human breast cancer. *Anticancer Res* 1992 Sep;12(5):1463-6.
- (132) Sheu BC, Kuo WH, Chen RJ, Huang SC, Chang KJ, Chow SN. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in neoplastic progression and lymph node metastasis of human breast cancer. *Breast* 2008 Dec;17(6):604-10.
- (133) Liu F, Lang R, Zhao J, Zhang X, Pringle GA, Fan Y, et al. CD8(+) cytotoxic T cell and FOXP3(+) regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 2011 Nov;130(2):645-55.
- (134) Coronella JA, Telleman P, Kingsbury GA, Truong TD, Hays S, Junghans RP. Evidence for an antigen-driven humoral immune response in medullary ductal breast cancer. *Cancer Res* 2001 Nov 1;61(21):7889-99.
- (135) Coronella-Wood JA, Hersh EM. Naturally occurring B-cell responses to breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2003 Dec;52(12):715-38.

- (136) Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2012 Apr;132(2):545-53.
- (137) Liu H, Zhang T, Ye J, Li H, Huang J, Li X, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2012 Oct;61(10):1849-56.
- (138) Suzuki K, Kadota K, Sima CS, Nitadori J, Rusch VW, Travis WD, et al. Clinical impact of immune microenvironment in stage I lung adenocarcinoma: tumor interleukin-12 receptor beta2 (IL-12Rbeta2), IL-7R, and stromal FoxP3/CD3 ratio are independent predictors of recurrence. *J Clin Oncol* 2013 Feb 1;31(4):490-8.
- (139) Rogers PR, Croft M. CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of antigen. *J Immunol* 2000 Mar 15;164(6):2955-63.
- (140) Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Curr Opin Immunol* 2009 Apr;21(2):153-60.
- (141) DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov* 2011 Jun;1(1):54-67.
- (142) Chin Y, Janseens J, Vandepitte J, Vandenbrande J, Opdebeek L, Raus J. Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from human breast cancer. *Anticancer Res* 1992 Sep;12(5):1463-6.
- (143) Alexe G, Dalgin GS, Scandfeld D, Tamayo P, Mesirov JP, DeLisi C, et al. High expression of lymphocyte-associated genes in node-negative HER2+ breast cancers correlates with lower recurrence rates. *Cancer Res* 2007 Nov 15;67(22):10669-76.
- (144) Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Lee AH, Ellis IO, et al. An evaluation of the clinical significance of FOXP3(+) infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010 Jun 17.
- (145) Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van EF, et al. Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol* 2013 Mar 1;31(7):860-7.
- (146) Pupa SM, Bufalino R, Invernizzi AM, Andreola S, Rilke F, Lombardi L, et al. Macrophage infiltrate and prognosis in c-erbB-2-overexpressing breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1996 Jan;14(1):85-94.
- (147) Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreola S, Baldini MT, Bufalino R, et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer* 1991 Aug 19;49(1):44-9.
- (148) Teschendorff AE, Gomez S, Arenas A, El-Ashry D, Schmidt M, Gehrmann M, et al. Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules. *BMC Cancer* 2010;10:604.
- (149) Hsu DS, Kim MK, Balakumaran BS, Acharya CR, Anders CK, Clay T, et al. Immune signatures predict prognosis in localized cancer. *Cancer Invest* 2010 Aug;28(7):765-73.
- (150) Sabatier R, Finetti P, Cervera N, Lambaudie E, Esterni B, Mamessier E, et al. A gene expression signature identifies two prognostic subgroups of basal breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011 Apr;126(2):407-20.
- (151) Ascierto ML, Kmiecik M, Idowu MO, Manjili R, Zhao Y, Grimes M, et al. A signature of immune function genes associated with recurrence-free survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012 Feb;131(3):871-80.
- (152) Acs G, Esposito NN, Kiluk J, Loftus L, Laronga C. A mitotically active, cellular tumor stroma and/or inflammatory cells associated with tumor cells may contribute to intermediate or high Oncotype DX Recurrence Scores in low-grade invasive breast carcinomas. *Mod Pathol* 2012 Apr;25(4):556-66.
- (153) Alexe G, Dalgin GS, Scandfeld D, Tamayo P, Mesirov JP, DeLisi C, et al. High expression of lymphocyte-associated genes in node-negative HER2+ breast cancers correlates with lower recurrence rates. *Cancer Res* 2007 Nov 15;67(22):10669-76.
- (154) Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buyse M, Larsimont D, Bontempi G, et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2008 Aug 15;14(16):5158-65.

- (155) Lake RA, van der Most RG. A better way for a cancer cell to die. *N Engl J Med* 2006 Jun 8;354(23):2503-4.
- (156) Lake RA, Robinson BW. Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat Rev Cancer* 2005 May;5(5):397-405.
- (157) West NR, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011;13(6):R126.
- (158) Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2008 Apr 15;14(8):2413-20.
- (159) Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012 Apr;132(3):793-805.
- (160) Yamaguchi R, Tanaka M, Yano A, Tse GM, Yamaguchi M, Koura K, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Hum Pathol* 2012 Oct;43(10):1688-94.
- (161) Ignatiadis M, Singhal SK, Desmedt C, Haibe-Kains B, Criscitiello C, Andre F, et al. Gene modules and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes: a pooled analysis. *J Clin Oncol* 2012 Jun 1;30(16):1996-2004.
- (162) Hornychova H, Melichar B, Tomsova M, Mergancova J, Urminska H, Ryska A. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer Invest* 2008 Dec;26(10):1024-31.
- (163) Apetoh L, Tesniere A, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies. *Cancer Res* 2008 Jun 1;68(11):4026-30.
- (164) Carson WE, III, Shapiro CL, Crespino TR, Thornton LM, Andersen BL. Cellular immunity in breast cancer patients completing taxane treatment. *Clin Cancer Res* 2004 May 15;10(10):3401-9.
- (165) Kotlan B, Simsa P, Teillaud JL, Fridman WH, Toth J, McKnight M, et al. Novel ganglioside antigen identified by B cells in human medullary breast carcinomas: the proof of principle concerning the tumor-infiltrating B lymphocytes. *J Immunol* 2005 Aug 15;175(4):2278-85.
- (166) Nzula S, Going JJ, Stott DI. Antigen-driven clonal proliferation, somatic hypermutation, and selection of B lymphocytes infiltrating human ductal breast carcinomas. *Cancer Res* 2003 Jun 15;63(12):3275-80.
- (167) Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE, Jr., Mamounas EP, Fisher B, et al. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 2006 May 1;24(13):2019-27.
- (168) Mazouni C, Peintinger F, Wan-Kau S, Andre F, Gonzalez-Angulo AM, Symmans WF, et al. Residual ductal carcinoma in situ in patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome. *J Clin Oncol* 2007 Jul 1;25(19):2650-5.
- (169) Sanchez-Munoz A, Garcia-Tapiador AM, Martinez-Ortega E, Duenas-Garcia R, Jaen-Morago A, Ortega-Granados AL, et al. Tumour molecular subtyping according to hormone receptors and HER2 status defines different pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer. *Clin Transl Oncol* 2008 Oct;10(10):646-53.
- (170) Straver ME, Rutgers EJ, Rodenhuis S, Linn SC, Loo CE, Wesseling J, et al. The relevance of breast cancer subtypes in the outcome of neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 2010 Sep;17(9):2411-8.
- (171) Rouzier R, Mathieu MC, Sideris L, Youmsi E, Rajan R, Garbay JR, et al. Breast-conserving surgery after neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy for large breast tumors. *Cancer* 2004 Sep 1;101(5):918-25.
- (172) Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L, Moliterni A, Terenziani M, et al. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute. *J Clin Oncol* 1998 Jan;16(1):93-100.
- (173) Yoo C, Ahn JH, Jung KH, Kim SB, Kim HH, Shin HJ, et al. Impact of immunohistochemistry-based molecular subtype on chemosensitivity and survival in patients

with breast cancer following neoadjuvant chemotherapy. *J Breast Cancer* 2012 Jun;15(2):203-10.

(174) Ring AE, Smith IE, Ashley S, Fulford LG, Lakhani SR. Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Br J Cancer* 2004 Dec 13;91(12):2012-7.

(175) Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999 Feb;17(2):460-9.

(176) Rosa Mendoza ES, Moreno E, Caguioa PB. Predictors of early distant metastasis in women with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013 Apr;139(4):645-52.

(177) Rack B, Janni W, Gerber B, Strobl B, Schindlbeck C, Klanner E, et al. Patients with recurrent breast cancer: does the primary axillary lymph node status predict more aggressive tumor progression? *Breast Cancer Res Treat* 2003 Nov;82(2):83-92.

(178) Jatoi I, Hilsenbeck SG, Clark GM, Osborne CK. Significance of axillary lymph node metastasis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1999 Aug;17(8):2334-40.

(179) Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van EF, et al. Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol* 2013 Mar 1;31(7):860-7.

(180) Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003 Jan 16;348(3):203-13.

(181) Tomsova M, Melichar B, Sedlakova I, Steiner I. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2008 Feb;108(2):415-20.

(182) Ladanyi A, Kiss J, Mohos A, Somlai B, Liskay G, Gilde K, et al. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2011 Dec;60(12):1729-38.

(183) Milne K, Kobel M, Kalloger SE, Barnes RO, Gao D, Gilks CB, et al. Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS One* 2009;4(7):e6412.

(184) Nielsen JS, Nelson BH. Tumor-infiltrating B cells and T cells: Working together to promote patient survival. *Oncoimmunology* 2012 Dec 1;1(9):1623-5.

(185) Nelson BH. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 2010 Nov 1;185(9):4977-82.

(186) West NR, Kost SE, Martin SD, Milne K, Deleeuw RJ, Nelson BH, et al. Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer* 2013 Jan 15;108(1):155-62.

(187) Lee S, Cho EY, Park YH, Ahn JS, Im YH. Prognostic impact of FOXP3 expression in triple-negative breast cancer. *Acta Oncol* 2013 Jan;52(1):73-81.

(188) Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecedrada JL, Ling KL, et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 2005 Jun;35(6):1681-91.

(189) Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 2007 Jan;37(1):14-6.

(190) Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008 Dec;8(12):958-69.

(191) Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002 Mar;196(3):254-65.

(192) Mukhtar RA, Nseyo O, Campbell MJ, Esserman LJ. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2011 Jan;11(1):91-100.

(193) Recchia F, Sica G, Candeloro G, Necozone S, Bisegna R, Bratta M, et al. Maintenance immunotherapy in metastatic breast cancer. *Oncol Rep* 2008 Nov;20(5):1173-9.

(194) Corthay A, Lørvik KB, Bogen B. Is secretion of tumour-specific antigen important for cancer eradication by CD4(+) T cells?--Implications for cancer immunotherapy by adoptive T cell transfer. *Scand J Immunol* 2011 Jun;73(6):527-30.

- (195) Vicente Conesa MA, Garcia-Martinez E, Gonzalez BE, Chaves BA, Garcia GT, Vicente G, 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.
- (196) Papatestas AE, Lesnick GJ, Genkins G, Aufses AH, Jr. The prognostic significance of peripheral lymphocyte counts in patients with breast carcinoma. *Cancer* 1976 Jan;37(1):164-8.
- (197) 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 21;109(8):2796-801.
- (198) Disis ML. Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol* 2010 Oct 10;28(29):4531-8.
- (199) Balko JM, Cook RS, Vaught DB, Kuba MG, Miller TW, Bhola NE, et al. Profiling of residual breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies DUSP4 deficiency as a mechanism of drug resistance. *Nat Med* 2012 Jul;18(7):1052-9.
- (200) Chakrabarty A, Bhola NE, Sutton C, Ghosh R, Kuba MG, Dave B, et al. Trastuzumab-resistant cells rely on a HER2-PI3K-FoxO-survivin axis and are sensitive to PI3K inhibitors. *Cancer Res* 2013 Feb 1;73(3):1190-200.
- (201) Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol* 2011 Nov 20;29(33):4452-61.
- (202) Campbell MJ, Tonlaar NY, Garwood ER, Huo D, Moore DH, Khramtsov AI, et al. Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2011 Aug;128(3):703-11.
- (203) Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010 Mar 11;362(10):875-85.
- (204) Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996 Oct 15;56(20):4625-9.
- (205) Recchia F, Sica G, Candeloro G, Necozone S, Bisegna R, Bratta M, et al. Maintenance immunotherapy in metastatic breast cancer. *Oncol Rep* 2008 Nov;20(5):1173-9.

