

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina y Dermatología



**PERFIL INMUNOLÓGICO
DEL TUMOR PRIMARIO COMO
BIOMARCADOR PREDICTIVO DE AFECTACIÓN
DEL GANGLIO CENTINELA
EN CÁNCER DE MAMA TEMPRANO**

DOCTORANDO

Rosa María Villatoro Roldán

DIRECTORES


Dr.D. Antonio Rueda Domínguez

Dr.D. Emilio Alba Conejo



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Rosa María Villatoro Roldán

 <http://orcid.org/0000-0001-6275-8448>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



Tesis Doctoral

**PERFIL INMUNOLÓGICO DEL TUMOR PRIMARIO
COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO
DE AFECTACIÓN DEL GANGLIO CENTINELA
EN CÁNCER DE MAMA TEMPRANO**

**Tesis doctoral presentada por Dña. Rosa María Villatoro Roldán,
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Málaga.**

Málaga

Junio 2017



Málaga, 23 de junio de 2017

D. ANTONIO RUEDA DOMÍNGUEZ, Doctor en Medicina y Director de Área de Oncología del Hospital Costa del Sol de Marbella,

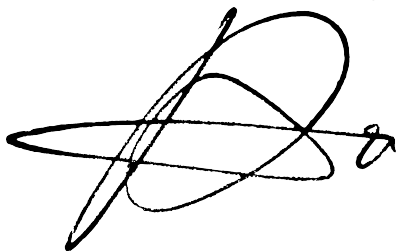
D. EMILIO ALBA CONEJO, Doctor en Medicina y Director de la Unidad de Oncología del Hospital Regional de Málaga,

CERTIFICAN: Que el presente trabajo de investigación titulado “PERFIL INMUNOLÓGICO DEL TUMOR PRIMARIO COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE AFECTACIÓN DEL GANGLIO CENTINELA EN CÁNCER DE MAMA TEMPRANO”, ha sido realizado bajo mi dirección por Dña. Rosa María Villatoro Roldán, para optar al título de Doctora por la Universidad de Málaga.

Y para que coste, firmo el presente certificado en Málaga a 23 de junio del 2017

Fdo.

Dr. D. Antonio Rueda Domínguez



Fdo.

Dr. D. Emilio Alba Conejo



v



A Xisco,

mi Amor,

porque fue un ejemplo de superación,

por ser la persona con quien comparto mi vida,

por hacerme tan feliz...



AGRADECIMIENTOS

No dispongo de palabras suficientes para expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han permitido que este trabajo se haya realizado.

Empiezo dando las gracias a mi querido Jefe, Director del Área de Oncología Médica de la Agencia Sanitaria Costa del Sol, Dr. Antonio Rueda Domínguez. Él, es y será, maestro e impulsor de crecimiento personal y profesional, para mí y para muchos.

La colaboración del Dr. Emilio Alba Conejo ha sido indispensable para el desarrollo de este trabajo. La generosidad de la Dra. Isabel Rodrigo y del Dr. Luis Robles demostrados en este trabajo, leyendo e interpretando las muestras, ha sido un ejemplo de colaboración entre distintos departamentos para un objetivo común que nos beneficia a todos.

Quiero resaltar el mérito que ha tenido en el desarrollo de esta tesis doctoral mi querida compañera la Dra. Elisabeth Pérez. Ella, con su ánimo inspirador y casi inagotable energía, me ayudó a desarrollar este proyecto siendo también, ella, parte activa del mismo.

A la Dra. Julia Alcaide y Dra. Irene Zarcos tengo que agradecerles que siempre están dispuestas a ayudar. Sus consejos y experiencias en el ámbito de la investigación han sido de gran ayuda para mí. Gracias a mi compañero y también muy querido el Dr. Diego Pérez, él me ha asesorado en múltiples ocasiones sobre los datos clínicos de las participantes de este trabajo. A Francisco Rivas, nuestro estadístico, le agradezco su infinita paciencia para realizar el análisis de los datos y solventar todas mis dudas.

Y para finalizar quiero agradecer y nombrar a Mi Familia, columna vertebral de mi vida. Xisco, mis niños María y Jaime, mi madre y mis hermanos, todos ellos me han dado el equilibrio necesario para poder centrarme en este proyecto.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

x

*“El don de la CIENCIA no es propiedad nuestra, ni, menos aún,
sólo de algunos, sino un don maravilloso que Dios nos ha dado para
que la cuidemos y la utilicemos con respeto en beneficio de todos”*

Papa Francisco

Mayo 2014



Resumen

Introducción: El cáncer de mama tiene gran impacto en nuestra sociedad por su elevada incidencia y por la morbilidad asociada a los tratamientos administrados. La afectación ganglionar en la axila es el principal predictor de supervivencia. La biopsia selectiva del ganglio centinela (GC) emergió como una alternativa a la linfadenectomía para evitar las temidas complicaciones de ésta, y sin embargo, su uso aún genera debate al no presentar beneficios terapéuticos. Es por ello que predecir el estado del GC podría ayudar a individualizar y/o abolir las indicaciones de esta técnica. El sistema inmune (SI) desempeña un papel central en la patogénesis del cáncer, con efectos tanto inhibidores como promotores de la progresión tumoral. La presencia de infiltrados linfocitarios tumorales (TILs) y PD-L1 constituye un factor pronóstico en la supervivencia de pacientes con cáncer de mama y puede influir en los mecanismos de diseminación regional de esta patología.

Objetivos: El objetivo primario de nuestro estudio fue analizar el papel predictivo de los TILs, linfocitos T CD3, linfocitos T CD8 y PD-L1 para la presencia o ausencia de metástasis en GC entre pacientes con cáncer de mama temprano y establecer un punto de corte de las variables estudiadas que permitiera evitar la estadificación ganglionar quirúrgica. Se relacionaron las variables de estudio con los datos clínico-patológicos de las pacientes, con la probabilidad de afectación del GC según el fenotipo y con la supervivencia libre de enfermedad (SLE).

Material y Métodos: Analizamos 138 biopsias incluidas en parafina del tumor primario procedentes de pacientes con cáncer de mama resecadas en Hospital Costa del Sol. En cada una de las biopsias se cuantificaron los TILs, linfocitos T CD3 y CD8, en forma de una variable continua y expresada en porcentaje de infiltración en estroma tumoral. La expresión de PD-L1 se midió como variable continua en celularidad

inmune en estroma y en epitelio tumoral. Se categorizó en PD-L1+ si $\geq 1\%$ y PD-L1- si $< 1\%$. Los anticuerpos empleados fueron CD3(clona 2GV6), CD8(SP57) y PDL-1(SP142).

Resultados: En las 138 muestras, la mediana de las variables analizadas fue: TILs 2% (RI 4%, 1%-5%); CD3 1,6% (RI 3,95%; 0,8%-4,75%), CD8 1,4% (RI 3,57%; 0,70%-4,27%). Resultó PD-L1+ en ic y epitelio tumoral en el 40,2% (n:35) y 9,2% (n:8) de las pacientes. No se encontró relación entre la infiltración de TILs, CD3, CD8 o PD-L1 con la presencia de metástasis en GC. No se encontró punto de corte para ninguna de las variables que permitiera predecir el estado del GC. TILs, CD3, CD8 y PD-L1 se asociaron de forma significativa con G3, Ki67 y RE- ($p < 0,05$). Los fenotipos HER2 y triple negativo presentaron más TILs y PD-L1 ($p < 0,05$). En el análisis univariante la afectación del GC tuvo un efecto negativo en la supervivencia libre de enfermedad (71,7 meses vs 78,9 meses, $p: 0,036$).

Conclusiones: Nuestro estudio no encuentra una relación entre la infiltración de TILs, CD3, CD8 ó PD-L1 en el tumor primario y el estado del GC. El predominio de pacientes con fenotipo luminal puede haber condicionado estos resultados, si bien son necesarios más estudios para aclarar la función de estos marcadores inmunológicos como predictores de afectación ganglionar en el cáncer de mama temprano.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	7
A. EL CÁNCER DE MAMA TEMPRANO.	8
A.1 <i>Epidemiología</i>	8
A.2 <i>Etiopatogenia</i>	11
A.3 <i>Diagnóstico clínico y patológico</i>	16
A.4 <i>Estadificación</i>	20
A.5 <i>Tratamiento quirúrgico del tumor primario</i>	25
A.6 <i>Tratamiento quirúrgico de la enfermedad regional</i>	25
A.7 <i>Tratamiento adyuvante en el cáncer de mama</i>	32
A.8 <i>Factores pronósticos y predictivos</i>	35
B. SISTEMA INMUNOLÓGICO Y CÁNCER DE MAMA.	44
B.1 <i>Inmunidad relacionada con el cáncer</i>	44
B.2 <i>Inmunología del Cáncer de mama</i>	49
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	57
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO	61
A. HIPÓTESIS	62
B. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	62
B.1 <i>Primarios</i>	62
B.2 <i>Secundarios</i>	62
4. MATERIAL Y MÉTODOS	65
A. DISEÑO DEL ESTUDIO, POBLACIÓN, CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN Y TRATAMIENTO.	66
A.1 <i>Diseño</i>	66



A.2	<i>Criterios de inclusión y exclusión</i>	66
A.3	<i>Procedimiento quirúrgico</i>	67
A.4	<i>Variables</i>	68
B.	PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO	71
B.1	<i>Selección de muestras</i>	71
B.2	<i>Procesado de las muestras biológicas</i>	71
C.	PLAN ESTADÍSTICO.	77
D.	ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO.	78
5.	RESULTADOS	81
A.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA COHORTE DE ESTUDIO.....	82
A.1	<i>Análisis descriptivo de los TILs, CD3, CD8 y PD-L1 evaluados en cáncer de mama temprano</i>	83
A.2	<i>Relación entre la expresión de TILs, CD3 y CD8 con la afectación del ganglio centinela</i>	86
A.3	<i>Relación entre la expresión de PD-L1 con la afectación del ganglio centinela</i>	86
A.4	<i>Relación entre TILs, CD3, CD8 con variables clínico-patológicas conocidas</i>	87
A.5	<i>Relación de PD-L1 con variables clínico-patológicas conocidas</i>	89
A.6	<i>Relación entre TILs, CD3, CD8 con diferentes fenotipos de cáncer de mama</i>	90
A.7	<i>Relación entre PD-L1 con los diferentes fenotipos de cáncer de mama</i>	90
A.8	<i>Relación entre TILs, CD3, CD8 en fenotipos y la afectación de ganglio centinela</i> ...	90
A.9	<i>Relación entre la expresión de PD-L1 en fenotipos y la afectación de ganglio centinela</i>	91
A.10	<i>Relación de la infiltración por TILs, linfocitos CD3 y linfocitos CD8 en el tumor primario y la supervivencia libre de enfermedad</i>	92



A.11	<i>Relación entre la expresión de PD-L1 en el tumor primario y la supervivencia libre de enfermedad.</i>	92
A.12	<i>Supervivencia libre de enfermedad según estado del GC.</i>	93
6.	DISCUSIÓN	95
7.	CONCLUSIONES	113
8.	ANEXOS	115
A.	GLOSARIO	116
B.	COMITÉ DE ÉTICA DEL HOSPITAL COSTA DEL SOL. INFORME	120
9.	BIBLIOGRAFÍA	121

Lista de Figuras

FIGURA 1. INCIDENCIA DE CÁNCER EN LA POBLACIÓN FEMENINA EN ESPAÑA EN 2012	9
FIGURA 2. EFECTO DEMOGRÁFICO SOBRE LA INCIDENCIA DE CÁNCER DE MAMA EN MUJERES ESPAÑOLAS EN 2020	10
FIGURA 3. EFECTO DEMOGRÁFICO DEL AUMENTO DE LA MORTALIDAD EN MUJERES ESPAÑOLAS EN 2020	11
FIGURA 4. BIOPSIA SELECTIVA DE GANGLIO CENTINELA EN CÁNCER DE MAMA	27
FIGURA 5. MICROAMBIENTE TUMORAL	43
FIGURA 6. EL CICLO DE LA INMUNIDAD TUMORAL	49
FIGURA 7. TEORÍA DE LA INMUNOEDICIÓN DEL CÁNCER.....	51
FIGURA 8. TILS EN EL CÁNCER.....	53
FIGURA 9. METODOLOGÍA DE LECTURA DE LOS TILS	76
FIGURA 10. 80% TILS EN ESTROMA (x10).....	85
FIGURA 11. <1% TILS EN ESTROMA (x10).....	85
FIGURA 12. 65% LINFOCITOS CD3 EN ESTROMA (20x)	85
FIGURA 13. 50% LINFOCITOS CD8 EN ESTROMA (20x)	85
FIGURA 14. <1% LINFOCITOS CD3 EN ESTROMA (20x)	85
FIGURA 15. <1% LINFOCITOS CD8 EN ESTROMA (20x)	85
FIGURA 16. PD-L1 5% EN EPITELIO TUMORAL (40x)	85
FIGURA 17. PD-L1 30% EN CELULARIDAD INMUNE (20x)	85
FIGURA 18. SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD SEGÚN EL ESTADO DEL GC	93



Lista de Tablas

TABLA 1. ESTIMACIÓN DE LA INCIDENCIA DE CÁNCER DE MAMA EN ESPAÑA PARA 2020.....	9
TABLA 2. NÚMERO ESTIMADO DE MUERTES POR CÁNCER DE MAMA EN LOS AÑOS 2012 Y 2020	10
TABLA 3. DEFINICIÓN DE LOS SUBTIPOS INTRÍNSECOS DE CÁNCER DE MAMA SEGÚN LA CONFERENCIA DE CONSENSO DE S. GALLEN 2015 Y GUÍAS DE PRÁCTICA CLÍNICA DE LA ESMO(23).....	19
TABLA 4. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA EN LA 7ª EDICIÓN DE LA AJCC(24). TUMOR PRIMARIO (T)	20
TABLA 5. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA EN LA 7ª EDICIÓN DE LA AJCC(24). GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)	21
TABLA 6. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA EN LA 7ª EDICIÓN DE LA AJCC(24). GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (PN) PATOLÓGICO	22
TABLA 7. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA EN LA 7ª EDICIÓN DE LA AJCC(24). METÁSTASIS A DISTANCIA (M).....	23
TABLA 8. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA EN LA 7ª EDICIÓN DE LA AJCC(24). ESTADIOS	24
TABLA 9. VARIABLES A ESTUDIO	68
TABLA 10. VARIABLES DEMOGRÁFICAS	68
TABLA 11. VARIABLES DEL TUMOR.....	69
TABLA 12. VARIABLES DE SEGUIMIENTO	70
TABLA 13. DESCRIPCIÓN DE LA COHORTE	82
TABLA 14. DESCRIPCIÓN DEL PORCENTAJE DE INFILTRACIÓN DE TILs, CD3, CD8 Y PD-L1 EN LA COHORTE DE ESTUDIO.....	84
TABLA 15. DESCRIPCIÓN DEL PD-L1 CATEGORIZADO EN POSITIVO Y NEGATIVO EN LA COHORTE DE ESTUDIO.....	84
TABLA 16. PORCENTAJE DE INFILTRACIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO SEGÚN EL GRADO DEL GC	87
TABLA 17. PORCENTAJE DE INFILTRACIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO SEGÚN FACTORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS.....	88
TABLA 18. PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DE PD-L1 SEGÚN FACTORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS.....	89
TABLA 19. PORCENTAJE DE INFILTRACIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO SEGÚN SU FENOTIPO Y EL ESTADO DEL GC.....	91
TABLA 20. PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DE PD-L1 POR FENOTIPOS SEGÚN EL ESTADO DEL GC.....	91
TABLA 21. HAZARD RATIO DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO CON LA SLE	92
TABLA 22. HAZARD RATIO DE PD-L1 CON LA SLE.....	92







1. INTRODUCCIÓN

A. EL CÁNCER DE MAMA TEMPRANO.

A.1 Epidemiología.

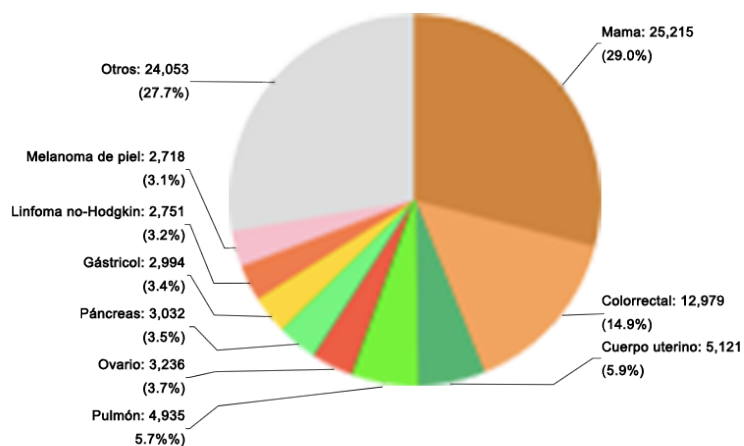
El cáncer de mama es un importante problema de salud pública. Es la neoplasia en la mujer con mayor incidencia en Europa con tasas de 71 casos por cada 100000 habitantes según el informe GLOBOCAN para el año 2012. Si atendemos a su mortalidad, es el tumor que produce mayor número de muertes en la población europea tras el cáncer de pulmón, con tasas de 23,1 fallecidos por cada 100000. Un 25% de los cánceres de mama aparecen antes de los 50 años y menos de un 5%, antes de los 35 años (1).

Entre los años 2000 y 2007, la supervivencia relativa a 5 años para esta neoplasia en Europa fue del 82% (con un rango comprendido entre el 74% en Europa del Este y 82% para el norte de Europa). Los mejores datos de supervivencia se obtuvieron para mujeres de países en los que se ofrecía cribado masivo, como ocurría en todos los países nórdicos, excepto Dinamarca (82%) e Irlanda/Reino Unido (79%). Los países del sur Croacia (76%) y Eslovenia (79%) tuvieron la tasa más baja de supervivencia a 5 años (1).

En relación con la edad, la supervivencia a 5 años fue mayor en el grupo comprendido entre los 45-54 años y 55-64 años, descendiendo significativamente entre pacientes ancianas. La diferencia absoluta en supervivencia relativa a 5 años entre el grupo de mujeres de 45-54 años y mujeres ancianas fue de 13-16% (llegando incluso a un 22% en Irlanda/Reino Unido) (1).

En la mayoría de los países europeos la mortalidad ha disminuido en los últimos años especialmente en mujeres jóvenes debido a la mejora de tratamientos y la detección más precoz. Sin embargo, el cáncer de mama sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer en mujeres jóvenes (2).

Los datos para España, según el informe GLOBOCAN 2012, sitúan el cáncer de mama como el primero en frecuencia entre las mujeres de la población española de todas las edades (3). Ver Figura 1.



GLOBOCAN 2012 (IARC) - 12.10.2016

Figura 1. Incidencia de cáncer en la población femenina en España en 2012

La estimación de la incidencia global de cáncer de mama en España para el año 2020 será de 28010 casos, con un incremento gradual respecto al año 2012 (4). (ver Tabla 1, Figura 2)

Tabla 1. Estimación de la incidencia de cáncer de mama en España para 2020

Año	Número estimado de cáncer de mama de nuevo diagnóstico (todos los rangos de edad)	Mujer
2012		25215
	Edad < 65 años	15625
	Edad > o = 65 años	9590
2020		28010
	Edad < 65 años	17044
	Edad > o = 65 años	10966
	Cambio demográfico	2795
	Edad < 65 años	1419
	Edad > o = 65 años	1376

Datos tomados de GLOBOCAN 2012 (IARC)

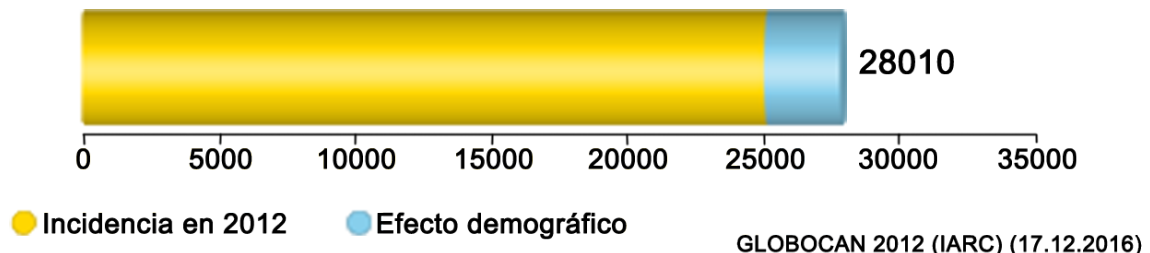


Figura 2. Efecto demográfico sobre la incidencia de cáncer de mama en mujeres españolas en 2020

Respecto a la mortalidad en España, las estimaciones extraídas del informe para el año 2020 indican un aumento del número de muertes en todos los grupos de edad, llegado a 6856 muertes (4). (Ver Tabla 2, Figura 3)

Tabla 2. Número estimado de muertes por cáncer de mama en los años 2012 y 2020

Año	Número estimado de muertes por cáncer de mama (todos los rangos de edad)	Mujer
2012		6075
	Edad < 65 años	2188
	Edad > o = 65 años	3887
2020		6856
	Edad < 65 años	2445
	Edad > o = 65 años	4411
	Cambio demográfico	781
	Edad < 65 años	257
	Edad > o = 65 años	534

Datos tomados de GLOBOCAN 2012 (IARC)

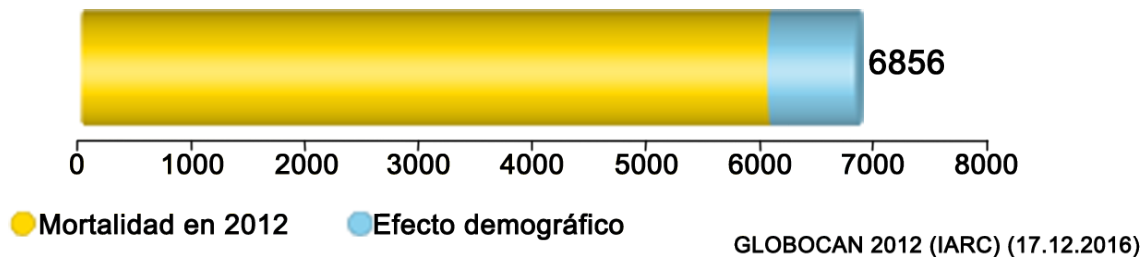


Figura 3. Efecto demográfico del aumento de la mortalidad en mujeres españolas en 2020

A.2 Etiopatogenia.

La mitad de los cánceres de mama diagnosticados puede ser explicados por factores de riesgo conocidos tales como la menarquia precoz, nacimiento del primer hijo, menopausia tardía y procesos proliferativos del epitelio de los conductos mamarios. Un 10% adicional se asocian con historia familiar. Por otro lado, se debe tener en cuenta que el riesgo puede ser modificado por factores demográficos, estilo de vida y factores medio ambientales aunque su asociación aún no ha sido claramente demostrada. Entre estos, destacamos:

- Edad: El riesgo de cáncer de mama aumenta con la edad. Según la base de datos de Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) (2), la probabilidad de desarrollar un cáncer de mama en USA entre el 2006 y 2008 fue:

Entre el nacimiento y 49 años → 1,9 (1 de cada 53 mujeres)

50 y 69 años → 2,3 (1 de cada 44 mujeres)

60 y 69 años → 3,5 (1 de cada 29 mujeres)

A partir de los 70 años → 6,7 (1 de cada 15 mujeres)

- Sexo: el cáncer de mama es 100 veces más frecuente en la mujer que en el hombre (2).

- Peso: el riesgo de cáncer de mama asociado con el índice de masa corporal (IMC) parece depender del estado menopáusico de la mujer. Un IMC elevado y/o una ganancia de peso durante la fase perimenopáusica se ha asociado consistentemente con mayor riesgo. En el estudio “Nurses’ Health”, las mujeres que ganaron 10 kg o más desde la menopausia tuvieron más riesgo de cáncer de mama comparado con las mujeres que se mantuvieron en su peso (400 vs 339 por cada 100.000 personas/año; RR 1.18, 95% IC 1.03-1.35) (5). El impacto de ganar peso después de los 40 años fue evaluado por el “European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition” e incluyó a más de 200.000 mujeres. Ganar peso se asoció a un ligero pero significativo aumento de riesgo de cáncer de mama (HR 1.09, 95% IC 1.01-1.18) (6). La asociación entre un IMC alto y el riesgo de cáncer de mama en la fase postmenopáusica puede explicarse por altos niveles de estrógenos resultantes de la conversión periférica de sus precursores en el tejido adiposo. Al contrario que las mujeres postmenopáusicas, un IMC elevado se asocia con menos riesgo de cáncer de mama en mujeres premenopáusicas. En un estudio con más de 2000 mujeres se objetivó que las mujeres premenopáusicas con un IMC >31 tuvieron un 46% menos de riesgo de desarrollar un cáncer de mama que aquellas con un IMC <21 (7). Sin embargo, este aspecto es controvertido. En los últimos años, han aparecido datos que indican que la obesidad central incrementa el riesgo de cáncer de mama independientemente del estado menopáusico de la mujer (8).

- Exposición a los estrógenos: Niveles altos de estrógenos aumentan el riesgo de cáncer de mama tanto en fase post- como premenopáusica (9). Sobre la influencia de los estrógenos durante la fase premenopáusica, se realizó un estudio por el grupo “Nurses’ Health” que incluyó 591 mujeres premenopáusicas; aquellas que tenían niveles de estrógenos por encima del cuartil tuvieron un riesgo mayor de desarrollar

cáncer de mama comparado con aquellas que estaban por debajo del cuartil (RR 2.4, 95% IC 1.3-4.5) (10).

- Patología mamaria: un amplio espectro de entidades patológicas de la mama son consideradas benignas. Entre todas éstas, las lesiones proliferativas (sobre todo aquellas con atipia histológica) están asociadas a un riesgo mayor de cáncer de mama (11). Del mismo modo, las mujeres con tejido mamario denso en la mamografía (definido como el tejido denso que comprende más de un 75% de la mama) tienen 4-5 veces más riesgo de desarrollar un cáncer de mama comparado con mujeres de edad similar con menos o sin densidad mamográfica (12).

- Factores reproductivos: mujeres con una menarquia a los quince años o después tienen menos riesgo de desarrollar un cáncer de mama hormono-dependiente que aquellas mujeres que tuvieron la menarquia antes de los 13 años. (HR 0.76, 95% IC 0.68-0.85) (13). Por el contrario, el riesgo de cáncer de mama aumenta cuando la menopausia es tardía. Dicho riesgo aumenta un 1% por cada año de retraso en la menopausia (14). Por otro lado, las mujeres nulíparas tienen un riesgo mayor de cáncer de mama comparado con las mujeres con hijos (RR 1.2 a 1.7) (15). La asociación entre infertilidad y riesgo de cáncer de mama es controvertido. Varios estudios epidemiológicos sugieren que la infertilidad debido a trastornos anovulatorios disminuye el riesgo de cáncer de mama (16). En otro estudio la incidencia acumulada de cáncer de mama fue de un 20%, 10% y 5% menos entre las mujeres que tuvieron su primer hijo a los 20, 25 y 35 años respectivamente comparado con mujeres nulíparas (17).

- Antecedentes de cáncer de mama: el antecedente personal de carcinoma ductal in situ o cáncer infiltrante aumenta el riesgo de desarrollar otro cáncer de mama invasivo en la mama contralateral. Datos extraídos de SEER tras un análisis de 340000 mujeres con cáncer de mama, pusieron de manifiesto que un 4% de las pacientes tuvieron cáncer de mama contralateral de tipo invasivo tras un seguimiento de 7.5 meses (18). La historia familiar de cáncer de mama también duplica el riesgo en familiares de primer grado. Influye el número de casos en la familia y la edad de presentación (RR: 2.9 en casos de menores de 30 años, RR: 1.5 si es mayor de 60 años) (19).

- Cáncer de mama hereditario: Destacamos los siguientes síndromes:

1. *Síndrome De Cáncer De Mama Y Ovario Hereditario* es el causante del 5-10% del total de casos de cáncer de mama y ovario respectivamente. Su desarrollo se debe a mutaciones germinales en Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein (BRCA1), la principal, localizada en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21) y que es responsable de un 42% de los casos de agregación familiar exclusiva de cáncer de mama y de un 80% de los casos de herencia de cáncer de mama-ovario. También puede ocurrir por mutaciones en Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein (BRCA2), la más frecuente localizada en el cromosoma 13 (13q12) siendo la causante de otro 10-30% de los casos de agregación familiar de cáncer de mama exclusivamente.

2. *Síndrome de Li-Fraumeni* por mutación de p53 (cromosoma 17p13.1). El 17% de los cánceres de mama presentan esta mutación.

3. *Síndrome de Cowden:* síndrome autosómico dominante con hamartomas, tumores benignos y alto riesgo de cáncer de mama por mutación PTEN (en cromosoma 10q22-23).



4. *Síndrome de ataxia-teleangiectasia*. El riesgo en portadores heterocigóticos de la mutación es del 2 % debido a mutación en ATM (cromosoma 11q22-23).

- Factores relacionados con el estilo de vida: son muchos los factores analizados y posiblemente sean los más importantes a tener en cuenta en la génesis del cáncer de mama porque pueden ser modificados, entre ellos destacan:

1. El consumo de alcohol y tabaco se relacionan directamente con un riesgo mayor de cáncer de mama.
2. El trabajo en turnos nocturnos es reconocido por la IARC (International Agency For Research On Cancer) y la OMS (Organización Mundial para la salud) como un posible carcinógeno. En 2012 un estudio en personal de enfermería publicó que los turnos nocturnos podrían asociarse a un riesgo aumentado de cáncer de mama (OR 1.8, 95% 1.26-1.65). Esta relación podría ser debida a la supresión nocturna de melatonina por la glándula pineal por lo que bajos niveles de melatonina se asociarían con un aumento del riesgo de cáncer de mama (20).
3. El ejercicio físico es un factor protector frente al cáncer de mama según arroja un meta-análisis publicado recientemente. Dependiendo de la intensidad y de la duración del ejercicio, el riesgo puede verse reducido hasta un 20% (21).
4. La dieta con alto contenido en grasas puede aumentar el riesgo, sobre todo con las grasas poli-insaturadas, mientras que los ácidos grasos omega-3 y el aceite de oliva tendrían un papel protector. El consumo de fruta, verdura y fibra tendrían también un papel protector. La soja y los fitoestrógenos podrían ser factor protector, sin embargo algunos estudios experimentales muestran un efecto proliferativo sobre los tumores hormono-sensibles. Actualmente esta asociación es controvertida (22).

A.3 Diagnóstico clínico y patológico.

Diagnóstico clínico.

Para llevar a cabo un adecuado diagnóstico de cáncer de mama son necesarias e imprescindibles las siguientes pruebas complementarias:

- Examen clínico: palpación bimanual de las mamas y de los ganglios linfáticos locorregionales así como la detección de posibles metástasis a distancia (hueso, hígado y pulmón).
- Pruebas de imagen: mamografía y ecografía bilateral junto con ecografía de los ganglios linfáticos regionales en caso de sospecha clínica de afectación. La resonancia magnética de la mama (RMN) no se recomienda de rutina, pero deberá tenerse en cuenta en casos especiales: cáncer de mama familiar con mutación BRCA presente, implantes mamarios, cáncer lobulillar, sospecha de multifocalidad/multicentricidad o bien grandes discrepancias entre exámenes convencionales y exámenes clínicos.
- Estudio histológico: es necesario realizar una biopsia del tumor primario mediante aguja gruesa. En el caso de sospecha de los ganglios linfáticos, se recomienda una PAAF de los mismos para confirmar o no la presencia de metástasis.

Para completar la valoración inicial diagnóstica se debe llevar a cabo lo siguiente:

- Anamnesis completa.
- Antecedentes familiares relacionados con cáncer de mama u otras neoplasias.
- Estudio analítico completo que incluya parámetros hematológicos y bioquímicos con test de función renal, hepática, fosfatasa alcalina y calcio. Es fundamental conocer el estado menopáusico de la mujer y en caso de duda medir los niveles de estradiol y hormona folículo estimulante (FSH).



- Estudio radiológico de extensión: radiografía PA y lateral de tórax en todas las mujeres. Estudio abdominal (TAC o ecografía) y gammagrafía ósea en mujeres con alta carga ganglionar o estadios IIIA tras la evaluación locorregional.

Diagnóstico patológico.

Una vez tomada la biopsia del tejido mamario afecto y tras la cirugía, es importante analizar el tejido obtenido para conocer una serie de datos anatómo-patológicos que nos permitirán conocer el tipo de cáncer de mama ante el que nos encontramos y sus características principales, lo que va a condicionar el tratamiento posterior del mismo.

El primer dato que se extraerá al analizar la biopsia de la mama es el tipo de tumor. La clasificación histopatológica de los tipos de cáncer de mama por microscopio de luz convencional realizado por el patólogo y basada en la clasificación de la OMS es la siguiente:

- Carcinoma ductal invasivo: la mayoría son "sin otra especificación". El resto son carcinoma de tipo mixto, carcinoma pleomórfico, carcinoma con células gigantes osteoclastos o carcinoma con rasgos de coriocarcinoma.
- Carcinoma lobular invasivo.
- Carcinoma tubular.
- Carcinoma cribriforme invasivo
- Carcinoma medular
- Carcinoma mucinoso
- Carcinoma de células en anillo de sello
- Tumores neuroendocrinos: entre ellos tenemos el carcinoma neuroendocrino sólido, el tumor carcinoide atípico, el carcinoma de célula pequeña, el carcinoma neuroendocrino de célula grande.
- Carcinoma papilar invasivo.

- Carcinoma micropapilar invasivo
- Carcinoma apocrino
- Carcinoma metaplásico: entre ellos tenemos el carcinoma metaplásico puro epitelial, el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma con metaplasia de células fusiformes, el carcinoma adenoescamoso, el carcinoma mucoepidermoide.
- Carcinomas mixtos epitelio/mesénquima
- Carcinoma rico en lípidos
- Carcinoma secretor
- Carcinoma oncocítico
- Carcinoma adenoide quístico
- Carcinoma de células actínicas
- Carcinoma de células claras rico en glucógeno
- Carcinoma sebáceo

Además del tipo histológico el informe patológico debe incluir:

- Grado de diferenciación.
- Invasión linfo-vascular.
- Tamaño tumoral infiltrante.
- Estudio inmunohistoquímico (IHQ) del receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER2/neu. El estudio de amplificación del gen HER2 puede ser determinado directamente en todos los tumores infiltrantes usando la técnica de “hibridación in situ”, sustituyendo a la IHQ, o realizándose sólo en aquellos tumores que son ambiguos por IHQ (score +2).
- Índice de proliferación Ki67.
- Estado ganglionar: número de ganglios extraídos, número de ganglios afectados, micrometástasis, macrometástasis, presencia de células aisladas o afectación extracapsular.



Estos datos extraídos del estudio de la pieza tumoral permitirán clasificar al cáncer de mama en diferentes subtipos como se recoge en la siguiente tabla:

Tabla 3. Definición de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama según la conferencia de consenso de S. Gallen 2015 y guías de práctica clínica de la ESMO(23)

Suptipo intrínseco	Definición subrogada clínicopatológica	Notas
Luminal A	<u>Luminal A-like</u>	.
	RE positivo	
	HER2-negativo	
	Ki67 bajo	El score Ki67 debe ser interpretado según la mediana de los valores de laboratorio obtenidos en cada centro
	RP alto	Se sugiere el corte en 20%
	Firma molecular de bajo riesgo (si está disponible)	
Luminal B	<u>Luminal B-like</u>	
	RE positivo	
	HER2 negativo	
	Ki67 elevado o RP bajo	
	Firma molecular de alto riesgo si está disponible	
	<u>Luminal B-like (HER2 positivo)</u>	
	RE positivo	
	HER2 positivo	
	Cualquier Ki67	
Cualquier RP		
Sobreexpresión HER 2	<u>HER2 positivo (no luminal)</u>	
	HER2 positivo	
	Ausencia RE y RP	
Basal-Like	<u>Triple negativo</u>	En un 80% de los casos se solapa el fenotipo triple negativo con basal-like.
	RE y RP ausente	El fenotipo triple negativo incluye también subtipos
	HER2 negativo	Como medular y adenoide quístico con bajo riesgo de recurrencias.

A.4 Estadificación.

La AJCC (American Joint Committee on Cancer) designó la clasificación TNM para la estadificación del cáncer de mama, empleada tanto para la estadificación clínica como patológica. Ésta se basa en el tamaño del tumor (T), el estado ganglionar (N), y la presencia o no de metástasis (M). Las definiciones para las categorías TNM de la 7ª edición de la AJCC son las siguientes (24):

Tabla 4. Estadificación del cáncer de mama en la 7ª edición de la AJCC(24). Tumor Primario (T)

TX	No se puede evaluar el tumor primario.
T0	No existe prueba de tumor primario.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
Tis	CDIS.
Tis	CLIS.
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón sin carcinoma asociado (Nota: la enfermedad de Paget con carcinoma asociado se clasifica de acuerdo con el tamaño del tumor)
T1	El tumor mide ≤ 20 mm en su mayor dimensión
T1mi	El tumor mide ≤ 1 mm en su mayor dimensión.
T1a	El tumor mide >1 mm pero ≤ 5 mm en su mayor dimensión.
T1b	El tumor mide >5 mm pero ≤ 10 mm en su mayor dimensión.
T1c	El tumor mide >10 mm pero ≤ 20 mm en su mayor dimensión.
T2	El tumor mide >20 mm pero ≤ 50 mm en su mayor dimensión.
T3	El tumor mide >50 mm en su mayor dimensión.
T4	El tumor mide cualquier tamaño con extensión directa a la pared pectoral o a la piel (ulceración o nódulos cutáneos).
T4a	Extensión a la pared torácica que no solo incluye adherencia o invasión a los músculos pectorales
T4b	Ulceración o nódulos satélites ipsilaterales o edema (incluyendo la piel de naranja) la cual no satisface el criterio de carcinoma inflamatorio.
T4c	Ambos, T4a y T4b.
T4d	Carcinoma inflamatorio.

Tabla 5. Estadificación del cáncer de mama en la 7ª edición de la AJCC(24). Ganglios linfáticos regionales (N)

NX	No se puede evaluar el ganglio linfático regional (p.ej., se extirpó previamente).
N0	No hay metástasis regional a los ganglios linfáticos.
N1	Metástasis en grado ipsilateral movable I, II ganglio linfático axilar o axilares.
N2	Metástasis en grado ipsilateral I, II ganglios linfáticos axilares que están clínicamente fijos o apelmazados. o Metástasis en ganglios mamarios ipsilaterales internos detectados clínicamente en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar clínicamente manifiesta.
N2a	Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales fijos entre sí o a otras estructuras.
N2b	Metástasis solamente en ganglios mamarios internos ipsilaterales detectados clínicamente en ausencia de metástasis clínicamente manifiesta en ganglios axilares
N3	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclaviculares ipsilaterales o Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamarios ipsilaterale(s) interno(s) clínicamente detectado(s) a con metástasis manifiesta en ganglios linfáticos axilares o Metástasis en ganglio(s) linfático(s) supraclaviculare(s) ipsilaterale(s) con implicación axilar o mamaria interna de ganglios linfáticos o sin esta.
N3a	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclaviculares ipsilaterales y axilares
N3b	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamarios internos ipsilaterales y ganglio(s) linfático(s) axilares.
N3c	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) ipsilaterales supraclaviculares.

Tabla 6. Estadificación del cáncer de mama en la 7ª edición de la AJCC(24). Ganglios linfáticos regionales (pN) patológico

pNX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales (p.ej., extirpación previa o no se extirpó para un estudio patológico).
pN0	No se identificó metástasis en ganglios linfáticos regionales por medios histológicos.
pN0(i-)	No afectación histológica, inmunohistoquímica negativa
pN0(i+)	No afectación histológica, inmunohistoquímica positiva, pero sin acúmulos celulares mayores a 0.2 mm
pN0(mol-)	Histológicamente no hay metástasis a ganglio linfático regional, hallazgos moleculares negativo (RT-PCR).
pN0(mol+)	Hallazgos moleculares positivos (RT-PCR), pero no se localizó metástasis a ganglio linfático regional alguno mediante histología o inmunohistoquímica
pN1mi	Micrometástasis (>0,2 mm o >200 células pero ninguna >2,0 mm).
pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares y/o metástasis microscópicas en ganglios de la cadena mamaria interna detectadas por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparentes
pN1a	Metástasis en 1–3 ganglios linfáticos axilares, al menos una metástasis >2,0 mm.
pN1b	Metástasis en ganglios mamaros internos con micrometástasis o macrometástasis detectada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica.
pN1c	Metástasis en 1–3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos mamaros internos con micrometástasis o macrometástasis localizado mediante biopsia de ganglio linfático pero sin detección clínica.
pN2	Metástasis en 4–9 ganglios linfáticos axilares o en ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral clínicamente aparentes en ausencia de metástasis ganglionares axilares.
pN2a	Metástasis en 4–9 ganglios linfáticos axilares (al menos un depósito tumoral >2 mm).
pN2b	Metástasis en ganglios linfáticos mamaros internos detectados clínicamente en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar.

pN3	Metástasis en ≥ 10 ganglios linfáticos axilares; o en ganglios infraclaviculares; o en ganglios de la cadena mamaria ipsilateral clínicamente aparentes en presencia de afectación de 1 o más ganglios axilares ipsilaterales; o en más de 3 ganglios axilares con afectación microscópica de ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral no clínicamente aparentes; o metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
pN3a	Metástasis en ≥ 10 ganglios linfáticos axilares (por lo menos un depósito tumoral $> 2,0$ mm) o metástasis a los ganglios infraclaviculares ipsilaterales
pN3b	Metástasis en > 3 ganglios linfáticos axilares y ganglios mamarios internos detectados clínicamente en presencia de metástasis a ganglio linfático axilar de ≥ 1 ganglio linfático axilar positivo; o metástasis en > 3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos internos mamarios con micrometástasis o macrometástasis localizada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica.
pN3c	Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales supraclaviculares.

Tabla 7. Estadificación del cáncer de mama en la 7ª edición de la AJCC(24). Metástasis a distancia (M)

M0	No hay prueba clínica o radiológica de metástasis a distancia.
cM0(i+)	No hay prueba clínica o radiológica de metástasis a distancia, pero sí detección de depósitos células tumorales moleculares o microscópicas en la sangre circulante, médula ósea u otros tejidos ganglionares no regionales que tienen ≤ 0.2 mm en pacientes sin signos o síntomas de metástasis.
M1	Hay metástasis a distancia según lo determinan medios clínicos o radiográficos clásicos o se comprueba por medios histológicos que tiene > 0.2 mm.

Tabla 8. Estadificación del cáncer de mama en la 7ª edición de la AJCC(24). Estadios

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1a	N1mi	M0
IIA	T0	N1b	M0
	T1a	N1b	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1a	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

A.5 Tratamiento quirúrgico del tumor primario.

La cirugía conservadora (CC) de la mama basada en la tumorectomía o cuadrantectomía es equivalente a la mastectomía y debe ser considerada como primera opción en la mayoría de los casos en los estadios I-II. No está indicada en los casos de enfermedad difusa de la mama, en casos con márgenes positivos en los que la re-excisión muestra enfermedad residual o no pueda llevarse a cabo con resultados cosméticos aceptables. Otras contraindicaciones para la CC son la irradiación previa de la mama, enfermedades del tejido conectivo con afectación de la piel o tumores con un diámetro superior a 5 cm en los que la neoadyuvancia no ha sido efectiva. La radioterapia durante el embarazo está contraindicada, por tanto la mastectomía debe considerarse si es necesario para completar el tratamiento locorregional antes del momento del parto.

A.6 Tratamiento quirúrgico de la enfermedad regional.

El estado de afectación ganglionar regional sigue siendo un pilar central en el cáncer de mama ya que es el factor pronóstico de mayor peso en la actualidad, siendo importante para la toma de decisiones terapéuticas en las pacientes. Los lugares de mayor frecuencia de diseminación regional linfática son los ganglios axilares, seguidos de los de la cadena mamaria interna y los supraclaviculares (25). En líneas generales, en aquellas pacientes con axila clínicamente negativa se recomienda la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) para determinar si los ganglios axilares están o no afectados. Este procedimiento por el contrario, no está indicado cuando existe afectación clínica axilar. La linfadenectomía axilar (LA) estaría indicada en pacientes con afectación ganglionar axilar confirmada en el preoperatorio y, hasta hace pocos años, en pacientes con BSGC positivo.

De todos los factores pronósticos conocidos, la afectación ganglionar metastásica en la axila es el principal predictor de supervivencia global y recurrencia. La LA era el procedimiento diagnóstico que se empleaba para la estadificación de la axila en los años 90 sin que esto redundara en un beneficio terapéutico para las pacientes que finalmente no tenían ganglios afectados por metástasis. En este sentido la BSGC emergió como una alternativa que pudiera evitar las temidas complicaciones de la LA (infecciones, problemas en la cicatrización de la herida, dolor, linfedema y limitación funcional y de calidad de vida). Hansen et al fueron los primeros en aplicar el concepto de BSGC en cáncer de mama en 1994 como un método menos invasivo (26). Desde entonces han sido varios los ensayos que han demostrado que esta técnica predice con gran fiabilidad el estado de afectación o no de la axila, siendo más costo-efectivo que la LA (27). Sin embargo, 20 años después, quedan sin resolver ciertas controversias en relación a diferentes aspectos técnicos y clínicos que giran alrededor de esta técnica. Los datos publicados sobre la tasa de falsos negativos (FN) oscila entre 5,5%-16,7%, lo cual sobrepasa la recomendación de guías internacionales según las cuales debe ser < 5% (28). Actualmente es estándar el uso del radiotrazador coloidal sólo o en combinación con tinta azul en casos de dificultad para detectar ganglio centinela (GC) con una tasa de identificación inicial del 82% y 92% respectivamente (29). Tampoco está claro el número de ganglios que deben ser extirpados durante la cirugía para asegurar la detección del verdadero GC y así minimizar el riesgo de quitar múltiples ganglios no centinela. La linfoescintigrafía demuestra que el 30% de los tumores mediales tienen en la cadena mamaria interna su primer sitio de drenaje y hasta en un 15% ocurre en los tumores laterales, siendo más probable su detección cuando la inyección del radiotrazador es peritumoral (30). Los tumores multifocales/multicéntricos tienen mayor riesgo de afectación de ganglionar. Hay datos heterogéneos respecto a la eficacia y seguridad de la BSCG en

este subgrupo (31). Además, la técnica de BSGC no está exenta de complicaciones (como reacciones alérgicas o infecciones).

A pesar de las controversias, el análisis de BSGC es un estándar en el cáncer de mama temprano y su estado condiciona la necesidad o no de realizar una LA a pesar de que hasta un 25% de las pacientes con afectación patológica del ganglio centinela tendrán una LA negativa.

Los datos expuestos han condicionado la puesta en marcha de estudios destinados a suprimir definitivamente la LA y/o predecir la afectación del GC de una forma precoz evitando cualquier procedimiento quirúrgico axilar.

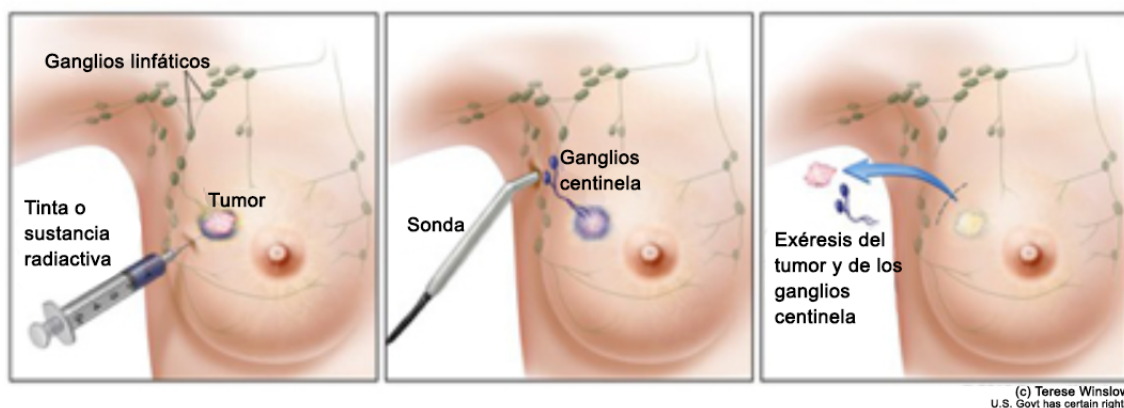


Figura 4. Biopsia selectiva de ganglio centinela en cáncer de mama
Adaptado de <http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging/sentinel-node-biopsy-fact-sheet>

Estudios para evitar el uso de LA.

En pacientes con enfermedad estadio I-II y menos de tres ganglios axilares afectados tras la BSGC y CC, la LA axilar puede evitarse sin que tenga un impacto negativo en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG), siempre que la paciente reciba un tratamiento adyuvante adecuado (con radioterapia adyuvante). Hoy día, conocemos los resultados de 4 estudios randomizados que plantearon evitar la LA en pacientes con N0 clínico y BSGC positivo (32).

El primero es el estudio del grupo ACOSOG, Z0011 (33). En este estudio, las pacientes con cáncer de mama cT1-2N0 con GC positivo (hasta 2 ganglios afectados, con afectación macro o microscópica) y tratadas con CC más radioterapia (RT) se aleatorizaron a la realización de LA versus observación. Se incluyeron 891 pacientes de las 1900 previstas y su objetivo primario era la SG. Fue cerrado antes de lo previsto por lento reclutamiento y menos eventos de los esperados. Tras un seguimiento de 6,8 años no se objetivaron diferencias en la SG (> 90% en los brazos del ensayo) y las tasas de recidiva axilar fueron menores al 1% en ambas ramas, a pesar de que en el grupo de LA un 27% tenían afectados otros ganglios axilares.

El estudio IBCSG 23-01 aleatorizó a pacientes con cáncer de mama cT1-2N0 con afectación del GC exclusivamente microscópica (< 2 mm, incluyendo la afectación celular aislada), tratadas con CC o mastectomía, a la realización de LA vs observación. La RT se administraba en la mama en los casos de cirugía conservadora y se permitía la RT de áreas ganglionares en los casos de la LA que tuviesen 4 o más ganglios positivos. El objetivo primario era la SLE. Se incluyeron 934 pacientes de las 1960 previstas. También se cerró antes de lo previsto por los mismos aspectos que el estudio ACOSOG. En este estudio un 13% de las pacientes con LA presentaron afectación axilar además del GC y en un 10% se realizó mastectomía. Con un seguimiento de 5 años tampoco se objetivaron diferencias y la tasa de recidiva regional fue solo del 1% (34).

El estudio AATRM 048/13/2000, realizado en pacientes con cáncer de mama T< 3,5 cm cN0 con afectación del GC solo microscópica, éstas eran aleatorizadas a LA vs observación, siendo el objetivo primario la SLE. Se incluyeron 247 pacientes y con un seguimiento de 5 años tampoco se objetivaron diferencias (35).

Para finalizar, en el ensayo AMAROS (36), pacientes con cT1b-2N0, tratadas con CC o mastectomía, con BSGC positivo fueron aleatorizadas a la realización de LA vs la

administración de RT (axila niveles I + II + III + supraclavicular medial, 25x2 Gy o equivalente). Se permitía RT en los pacientes con LA con 4 o más ganglios afectados. En este estudio el objetivo primario fue la recidiva axilar a los 5 años. Se incluyeron 1425 pacientes con GC positivo (de un total de 4806 cN0 registrados). En el grupo de LA un 33% presentó afectación ganglionar. Con una mediana de seguimiento de 6,1 años no se objetivaron diferencias siendo la tasa de recidiva axilar a los 5 años inferior al 2%. En todos estos estudios la mayoría de las pacientes recibieron tratamiento sistémico con hormonoterapia y/o quimioterapia sin diferencia, en este aspecto, en ambas ramas. En todos ellos no se objetivaron diferencias ni en la recidiva local, ni regional, ni en la supervivencia libre de progresión ni en SG con cifras en todos ellos superiores al 90% y con muy bajas tasas de recidiva axilar. La incidencia de linfedema fue, en todos los estudios, menor en la rama sin LA.

Factores predictivos de afectación del ganglio centinela:

Dado que la afectación del ganglio centinela es el factor que predice con más certeza la presencia de metástasis en los ganglios axilares, parece interesante investigar factores biológicos capaces de estimar el riesgo de afectación del ganglio centinela. Hasta ahora se han llevado a cabo múltiples estudios encaminados a predecir la afectación del ganglio centinela:

A. Estudios basados en los datos clínico-patológicos.

La mayoría de los estudios publicados sobre predictores de metástasis en los ganglios de la axila tanto en la era pre-ganglio centinela como en la actual, recogían los datos de forma retrospectiva sin mencionar cómo se hacía la recogida de los mismos. Tampoco había una revisión patológica central de las muestras. En estos estudios, el tamaño tumoral, la edad, invasión linfovascular y el subtipo histológico eran las

variables más frecuentes descritas al mismo tiempo que eran considerados factores independientes predictores de afectación ganglionar metastásica. Únicamente dos estudios, Ravdin et al (37) y Gann et al (38), validaron sus modelos estadísticos en otras bases de datos. En los estudios de ganglio centinela, las variables asociadas con las metástasis eran bastante similares. Esto se confirmó en un estudio realizado por un grupo del MSKCC el cual publicó un nomograma basado en datos clínico-patológicos como la edad, el tamaño tumoral, tipo histológico específico, localización, invasión linfovascular, multifocalidad, grado nuclear y receptores hormonales (RH). De todos estos datos, la localización tumoral (exceptuando la región del cuadrante supero-interno), el estado de los RE y RP actuaron como predictores independientes de metástasis en el GC (39). La menor tasa de metástasis en GC en tumores del cuadrante supero interno sugiere la posibilidad de que existan rutas alternativas de flujo linfático, sobre todo a la cadena ganglionar mamaria interna.

B. Factores serológicos que pueden predecir el estado ganglionar.

Wu SG et al. estudiaron en 1148 pacientes con cáncer de mama el posible valor predictivo de afectación axilar del antígeno carcinoembrionario (CEA) y del antígeno tumoral 15-3 (CA15-3). Una mediana de 15 ganglios fueron extraídos; el 67,8% de las pacientes no tenían afectación ganglionar y 32,2% sí tenían metástasis ganglionares axilares. El análisis univariado mostró que la localización tumoral ($p=0.024$), estadio ($p=0.001$), grado ($p<0.001$), invasión linfovascular (LVI) ($p<0.001$), nivel de CEA ($p<0.001$), Ca15-3 ($p<0.001$) y subtipos de cáncer de mama ($p<0.001$) se asociaban de forma significativa con la presencia de metástasis axilares(40).

La determinación de los niveles de VEGF-C en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama temprano candidatas a BSGC también ha sido estudiado como posible factor predictivo de la afectación axilar. Este estudio que recogió, de forma

prospectiva, 174 sueros de pacientes antes de ser sometidas al tratamiento quirúrgico radical, correlacionó variables clínicas, el estado del GC y los niveles de VEGF-C pero no pudo demostrar una asociación (41).

C. Factores moleculares predictores de afectación del ganglio centinela.

Dada la estrecha relación existente entre las micrometástasis y el tumor primario, Zhu et al, evaluaron la capacidad que tenían ciertos marcadores moleculares asociados al cáncer de mama para predecir el desarrollo de micrometástasis, y entre otros, de la afectación del GC. Se determinó el HER-2/neu, ciclooxigenasa-2 (COX-2), el factor de crecimiento vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas-B (PDGF-B) como posibles factores y se estudió su presencia en sangre periférica, médula ósea y GC de 53 pacientes. La expresión de estos marcadores en el tumor primario se determinó por IHC y por reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). Las muestras de sangre periférica y médula ósea se evaluaron mediante técnica de separación celular e IHC. En GC se examinaron por hematoxilina-eosina (H&E) e IHC. Los porcentajes de pacientes con micrometástasis fue 24.5% en sangre periférica, 56.6% en médula ósea y 26.4% en ganglio centinela por H&E así como un 41.5% si en el estudio del ganglio centinela se usaba IHC.

Mediante H&E, la amplificación de COX-2 se asoció de forma estadísticamente significativa con la presencia de micrometástasis en el GC ($p=0.03$) y en médula ósea ($p=0.005$). Por el contrario, la sobreexpresión de HER-2/neu se asoció solo con la presencia de micrometástasis en el GC ($p=0.005$). La sobreexpresión de PDGF-B se relacionó con la presencia de micrometástasis en sangre periférica ($p=0.002$), médula ósea ($p=0.003$) y GC ($p=0.017$). Mediante IHQ, sólo la sobreexpresión de VEGF y COX-2 se relacionaron con la presencia de micrometástasis ($p=0.001$) (42).

D. Estudio del perfil proteómico del tumor primario en cáncer de mama.

La predicción de metástasis en la axila a través de la expresión génica en el tumor primario es prometedora debido a que el tumor primario puede ser rápidamente evaluado tras una resección o una biopsia de aguja gruesa. La tecnología analítica conocida como SELI-TOF-MS puede generar perfiles proteicos que distinguen con seguridad tejido neoplásico del que no lo es. Hay estudios en cáncer de mama que muestran que la proteómica del tumor primario puede predecir la afectación ganglionar axilar (43).

A.7 Tratamiento adyuvante en el cáncer de mama.

El tratamiento sistémico adyuvante en el cáncer de mama temprano es utilizado con la intención de aumentar la supervivencia de las pacientes a través de la reducción de las tasas de recaídas loco-regionales o sistémicas, situaciones que conllevarían la muerte de la paciente debido a la enfermedad. Para la indicación y elección de la modalidad más adecuada de tratamiento adyuvante deben tenerse en cuenta los siguientes factores:

- Edad y comorbilidad de la paciente: puede limitar el empleo de los tratamientos adyuvantes.
- Estadiaje TNM que condicionará un tratamiento adyuvante determinado.
- Estado de los RH: solo aquellos tumores positivos para los RH podrán beneficiarse de hormonoterapia adyuvante.
- Sobreexpresión del gen Her2neu: solo aquellos tumores positivos para Her2 podrán beneficiarse de fármacos anti-Her2.



Tratamiento quimioterápico adyuvante.

La quimioterapia convencional permanece como el principal pilar del tratamiento sistémico adyuvante para estas pacientes. La quimioterapia adyuvante debería incluir antraciclinas (AC) y/o taxanos. Sin embargo, ninguna quimioterapia adyuvante está recomendada en tumores menores de 0.5 cm (pT1a) y para los tumores de 0.6-1cm se debe de discutir y balancear los riesgos y beneficios del tratamiento. Actualmente, no hay un consenso para determinar el riesgo de recurrencia. Se asume que las pacientes cuyos tumores exhiben características patológicas de alto riesgo y/o perfil genotípico establecido por una plataforma genómica se aconsejará el uso de quimioterapia adyuvante por un alto riesgo de recurrencia.

Tratamiento hormonal adyuvante.

El tratamiento hormonal mejora la supervivencia del cáncer de mama luminal (44). Entre las opciones de tratamiento endocrino, la elección debería ajustarse al estado menopáusico, comorbilidad y riesgo de recurrencia.

Mujer Premenopáusica: El estándar de tratamiento para una mujer premenopausica es 5 años de tamoxifeno. Prolongar tamoxifeno más de 5 años confiere una reducción significativa del riesgo de recurrencia pero con una cuestionable mortalidad específica a los 10 años (45). Los estudios EBCTCG y SOFT muestran que la combinación de tamoxifeno adyuvante con análogos GHRH (Growth Hormone-Releasing Hormone) no es mejor y sí más toxica que tamoxifeno sólo. La mayoría de las guías clínicas consideran indicado el tratamiento con análogos más tamoxifeno o inhibidor de aromatasa en mujeres menores de 40 años o en mujeres con alta carga ganglionar.

Mujer Postmenopáusica: El estándar de tratamiento en estos casos es un inhibidor de aromatasa (IA) como tratamiento complementario durante al menos 5 años. Tamoxifeno es la segunda elección. En las pacientes que comenzaron tratamiento con tamoxifeno, el cambio a un IA puede ofrecerse después de 2-3 años (46).

Tratamiento diana para los tumores HER2 positivo.

Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que es específico para el dominio extracelular del HER2. La evidencia científica es clara para recomendar trastuzumab adyuvante en tumores con un tamaño mayor a 1 cm independientemente del estado de afectación axilar. En la mayoría de los estudios trastuzumab se administró durante un año concomitante o secuencialmente con la quimioterapia. Debido a su cardiotoxicidad, trastuzumab no debería ser administrado concomitante con quimioterapia tipo AC (46).

Radioterapia adyuvante.

La RT se administra de forma estándar sobre el volumen mamario siempre tras CC. Datos del metaanálisis del EBCTCG que incluía estudios que aleatorizaban a las pacientes a recibir CC con o sin RT, demostraron que el grupo sin tratamiento presentaba una mayor mortalidad por cáncer de mama (47). También los resultados del estudio NSABP B-06 con 20 años de seguimiento, muestran un 39,2% de recidiva local sin radioterapia frente a un 14,3% en las pacientes que habían recibido tratamiento (48).

La realización de RT tras la mastectomía disminuye el riesgo de recidiva local y el riesgo de muerte por cáncer de mama, sin embargo su uso no está exento de complicaciones. Está indicada en las siguientes situaciones: cuatro o más ganglios afectados en el vaciamiento y en tumores estadio III. Su uso es controvertido en tratamiento neoadyuvante, si existen 1 a 3 ganglios afectados en el vaciamiento, en tumores T3N0M0, o en caso de ganglios afectados con extensión extracapsular.

La RT es un tratamiento generalmente bien tolerado, con mínima toxicidad a medio y largo plazo. A pesar de estas recomendaciones, es importante destacar que pacientes añosas con estadio I, estudios específicos no han demostrado mejora en supervivencia, por lo que debería evaluarse de forma individual en este subgrupo (46).



A.8 Factores pronósticos y predictivos.

Los podemos dividir en varios grupos:

A.8.1 FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS.

Entre los factores pronósticos clásicos destacamos:

- a. Estadio tumoral → A mayor estadio, menor probabilidad de supervivencia.

La supervivencia relativa a cinco años es del 95,85,70, 52, 48 y 18 % para pacientes con estadios I, IIA, IIB, IIIA, IIIB y IV, respectivamente (49).

- b. Estado ganglionar → Como ya se ha comentado, la afectación ganglionar es el factor pronóstico más importante. Entre las mujeres sin evidencia de enfermedad metastásica, la tasa de supervivencia a 5 años para aquellas que tienen enfermedad localizada (en la mama exclusivamente) vs enfermedad regional (ganglios positivos) es 99 y 85%, respectivamente. Incluso tumores pequeños (menores de 2 cm) tienen un peor pronóstico en la presencia de afectación axilar. En una serie de casi 25.000 casos, la supervivencia a 5 años fue 96, 86 y 66% si las pacientes eran ganglios negativos, de uno a 3 ganglios afectados o tenía 4 o más ganglios con metástasis, respectivamente (50). Está bien establecido el valor de las macrometástasis, sin embargo el significado de las metástasis de <2mm (micrometástasis, pN1mic) o células tumorales aisladas (ITC, pN0itc) en los ganglios axilares no está claro. A pesar de esto, la evidencia sugiere que los pacientes con pN1mic tienen peores resultados comparados con aquellas con ganglios negativos mientras que la presencia de ITC no influye en el pronóstico. Por ejemplo en un estudio de cohortes con 3369 pacientes con cáncer de mama, las pacientes pN1mic (n=123) tuvieron una supervivencia específica por cáncer de mama a 5 años que fue significativamente más baja comparada con las pacientes pN0 (80 vs 87%).

No hubo diferencias en supervivencia entre las pacientes con pN0itc y pN0. La presencia de pN1mic, y no pN0itc, se asoció con una tendencia a una peor supervivencia global comparada con las pacientes pN0 (51).

- c. Tamaño tumoral → definido como el diámetro mayor del tumor primario de la mama, es un factor pronóstico reconocido desde hace ya muchos años. En una cohorte del SEER con 24.740 pacientes, las tasas de supervivencia por cáncer de mama a 5 años variaban de un 91% para tumores con un tamaño inferior a 2cm, al 80% para tumores entre 2-5 cm y SG del 63% para aquellos que medían más de 5 cm. En tumores triple negativos, la correlación del tamaño con el estado ganglionar y con el pronóstico es mucho más débil (50).
- d. Enfermedad metastásica → La presencia de metástasis a distancia es un factor de mal pronóstico.
- e. Tipo histológico → El impacto pronóstico de la histología es muy variable. Un análisis de más de 9000 pacientes demostró que el subtipo lobulillar infiltrante tenía un 16% menos de riesgo de recurrencia comparado con el ductal infiltrante en los seis primeros años de seguimiento; sin embargo, pasado este tiempo el subtipo lobulillar aumentaba el riesgo de recurrencia en un 54% respecto al ductal infiltrante (52). Otros subtipos de cáncer de mama invasivos como tubular, papilar, mucinoso, medular y carcinoma adenoide quístico han sido asociados a mejor pronóstico. Por el contrario, los carcinomas micropapilares y metaplásicos parecen tener un peor pronóstico.
- f. Grado Histológico → Pese a que el valor pronóstico del grado histológico ha sido puesto de manifiesto en diferentes publicaciones, las críticas en

cuanto a su valor se relacionan con su pobre reproducibilidad y la variabilidad interobservador (49).

- g. Invasión linfovascular → La presencia de invasión linfovascular parece ser un factor de mal pronóstico, sobre todo en los tumores de alto grado aunque este hecho es controvertido ya que en un estudio con más de 16000 pacientes, la invasión linfovascular se asoció de forma significativa con otros factores pronósticos adversos (tamaño tumoral, grado, ganglios afectos, histología ductal, receptores estrogénicos negativos). En ausencia de estos factores, la invasión linfovascular no tenía ningún efecto en supervivencia(49).

A.8.2 BIOMARCADORES TISULARES COMO FACTORES PRONÓSTICOS.

Entre ellos destacamos:

- a. Receptores hormonales → Tanto la expresión de receptor de estrógeno (RE) como de progesterona (RP) se han asociado siempre con un mejor pronóstico de las pacientes. Curiosamente, mientras la tasa anual de recurrencia para las pacientes con tumores RE + es baja en los primeros cinco años después del tratamiento inicial comparado con los tumores RE negativos, los estudios sugieren que podría ser mayor con un seguimiento más largo. Sin embargo, después de los 5 años, las pacientes RE + tuvieron un mayor incremento del riesgo anual de recurrencia (53). El estado de RE se asocia también con la localización de la diseminación metastásica. Aunque no es conocida la causa, los tumores RE + desarrollarán metástasis en huesos, partes blandas y/o tracto ginecológico, mientras en los tumores RE- metastatizan con más frecuencia a cerebro e hígado lo cual se asocia con una supervivencia menor.

- b. Sobreexpresión de HER2 → se encuentra amplificado en el 15-30% de los casos. En ausencia de tratamiento sistémico específico, la sobreexpresión del HER2 es un marcador de mal pronóstico en pacientes tanto con ganglios negativos como positivos. Incluso podría mantenerse este valor de mal pronóstico en tumores iguales o inferiores a 1 cm (54).

A.8.3 FACTORES PRONÓSTICOS DEPENDIENTES DEL PACIENTE.

Entre ellos destacamos:

- a. Edad → Tanto las pacientes jóvenes como las más mayores parecen tener peor pronóstico cuando se diagnostica un cáncer de mama (55). La afectación axilar ganglionar varía con la edad de diagnóstico. La probabilidad de afectación ganglionar disminuye conforme aumenta la edad de las mujeres hasta aproximadamente los 70 años, pero aumenta posteriormente a partir de ésta. Este incremento es visto sobre todo en tumores pequeños lo que sugiere un comportamiento biológico especial para el cáncer de mama en mujeres añosas (56).
- b. Estado menopáusico → Las mujeres premenopáusicas que recibieron quimioterapia adyuvante y presentaron amenorrea secundaria permanente presentan mejor supervivencia, incluso después de realizar los ajustes a las variables pronósticas estándar, y específicamente en tumores RE + (57).
- c. Raza → Las mujeres afroamericanas e hispanas presentan peor supervivencia que las de raza blanca (58).
- d. Tabaco → Fumar cigarrillos, tanto antes como después del diagnóstico de cáncer de mama, se ha asociado a un incremento de la mortalidad por cáncer de mama (59).

A.8.4 FACTORES DEPENDIENTES DEL DIAGNÓSTICO

Los tumores asintomáticos detectados por métodos de cribado poblacional tienen mejor pronóstico que aquellos identificados en la exploración física. Aunque la densidad mamaria en la mamografía es bien reconocida como factor de riesgo para el cáncer de mama, no tiene valor pronóstico (60).

A.8.5 FACTORES MOLECULARES.

Los perfiles de expresión génica han permitido identificar diferentes subtipos de cáncer de mama que difieren entre sí en su pronóstico.

Los subtipos descritos son:

- **Subtipo luminal**→ Los grupos luminal A y B son los más frecuentes y se caracterizan por expresión de los RH y otros genes asociados con la activación del RE. Los tumores luminal B tienen peor pronóstico que los luminal A con mayor riesgo de recurrencia.
- **HER2-enriched**→ El subtipo se caracteriza por una elevada expresión de HER2 y cluster de proliferación, así como baja expresión de cluster luminal y basal. Por esta razón, estos tumores son con más frecuencia RH negativos y HER2 positivos lo cual les confiere peor pronóstico.
- **Subtipos con RE negativo**→ dentro de ellos diferenciamos los tumores Basal-like que comprenden el 15-20% de los cánceres de mama y se han asociado a un peor pronóstico en diferentes series, mayor riesgo de metástasis viscerales y afectación cerebral (61). Los tumores Claudin-low se caracterizan por mostrar características de células madre. Este subtipo representa el 7-14% de los tumores triple negativos y se asocian a un peor pronóstico comparado con el subtipo luminal A. Sin embargo, su pronóstico es semejante al de subgrupos como luminal B, HER-2 positivo/RE negativo y subtipo basal.

Técnicas emergentes de expresión génica han sido validadas y se emplean en la actualidad para conocer el riesgo de recidiva. Entre ellas destacamos:

- Oncotype Dx-21®: es la firma mejor validada y puede identificar pacientes que con más probabilidad podrían beneficiarse de recibir quimioterapia adyuvante. En este momento está indicado para mujeres con cáncer de mama ganglios negativos, RE +, HER2 negativo y su estudio puede hacerse en la muestra parafinada. Uno de los estudios donde se aplicó esta técnica contaba con la participación de 651 pacientes. Esta firma permitió dividir a las pacientes en grupos de riesgo. En los grupos con score bajo o intermedio no existían diferencias en riesgo de recidiva a los 10 años entre las pacientes con o sin quimioterapia; sin embargo en el grupo de alto riesgo el tratamiento con quimioterapia suponía una reducción del 28% en el riesgo de recidiva (62).

- MammaPrint®: se realizó a partir de tejido congelado de muestras de cáncer de mama donde se estudió la expresión génica de los tumores mediante microarrays de DNA, definiéndose una firma de 70 genes con valor pronóstico que también ha sido validada.

A.8.6 FACTORES RELACIONADOS CON ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN.

El índice de proliferación en cáncer de mama parece ser un factor pronóstico. Hay una variedad amplia de métodos usados para su evaluación como son el número de mitosis, el porcentaje de celularidad en fase S del ciclo celular medio por citometría de flujo y por IHQ.

- **Ki-67** → A pesar de la heterogeneidad de los ensayos clínicos y la metodología usada para medirlo, los resultados de los grandes meta-análisis son consistentes con el valor pronóstico independiente de ki67. Por tanto, existe una evidencia clara sobre el valor



pronóstico del ki67 aunque son necesarios más esfuerzos en la estandarización de su determinación y evaluación (63).

- **Activadores** (u-PA y t-PA) **e inhibidores del plasminógeno (PAI-1)**→ El papel pronóstico para uPA y PAI-1 ha sido estudiado en mujeres con cáncer de mama temprano ganglios negativos. En 269 mujeres, ganglios negativos y ninguna de las cuales había sido tratada con quimioterapia, se midió en el tumor primario el u-AP y PAI-1. Altos niveles de ambos predijo un riesgo de recaída 3,9 veces mayor así como un riesgo de muerte 2,8 veces mayor (64). A pesar de estos buenos resultados, el uso de estos indicadores está amortiguado por dificultades prácticas en la metodología.

- **P53**→hay datos que sugieren que los pacientes con mutaciones en TP53 tienen un peor pronóstico comparado con otros pacientes, independientemente del tamaño tumoral, estado ganglionar y estado hormonal (65).

A.8.7 OTROS MARCADORES DE INVASIÓN Y METÁSTASIS.

Muchos marcadores con potencial invasivo y metastásico han sido evaluados en estudios de forma retrospectiva. Cabe destacar nm23, E-cadherina, cateninas, inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), PSA, factor tisular, osteopontina, la pérdida alélica, inestabilidad de microsatélites o la ausencia de metilación de genes supresores de tumores. Pueden proporcionar información pronóstica pero es necesario una mayor evaluación y validación. En la actualidad no deber ser tenidos en cuenta en la práctica rutinaria del cáncer de mama. Por otro lado, la presencia de células tumorales circulantes (CTC) en sangre periférica ha sido asociado con un pobre pronóstico en pacientes con cáncer de mama si bien estas CTC no se correlacionaron ni con el estado ganglionar axilar ni con otros parámetros clínicos o patológicos (66).

A.8.8 INFILTRADO LINFOCITARIO TUMORAL.

El valor pronóstico de los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en cáncer de mama ha sido estudiado en varios ensayos de tratamiento neoadyuvante y adyuvante. Estas observaciones sugieren que niveles elevados de TILs se asocian a mejores respuestas a la quimioterapia, tumores altamente proliferativos, alto grado de diferenciación y RE negativos. En ciertos subtipos, como cáncer de mama triple negativo, los TILs tienen una especial importancia pronóstica (67). Así, en el análisis multivariante de los TILs de 1146 pacientes tratadas con quimioterapia +/- tamoxifeno mostró que los TIL intratumorales (It) y estromales (Str) se asociaban de forma significativa con la SG en los subgrupos HER2+ y triple negativas mientras que no tuvo efecto en las pacientes ER+ /HER2-. Por cada incremento de un 10% en TIL-Str, se observó una reducción en el riesgo de muerte del de 18 y 15% en el grupo de HER2 y triple negativo respectivamente (HR 0.82, 85% CI 0.69–0.96, P = 0.02 para grupo HER2+; HR 0.85, 95% CI 0.74–0.99, P = 0.04 para grupo triple negativo) (68).

En la actualidad no hay un punto de corte aceptado a partir del cual los TIL puedan considerarse como un marcador pronóstico. Dieci et al analizaron de forma retrospectiva los TILs-Str y TIL-It residuales en 278 casos de pacientes sometidas a tratamiento neoadyuvante. Ambos fueron factores pronósticos en el análisis mutivariante para supervivencia libre de metástasis (HR 0.86, 95% (CI) 0.77–0.96, P = 0.01 and HR 0.85, 95% CI 0.75–0.98, P = 0.02 para TIL-Str y TIL- It), y de SG (HR 0.86, 95% CI 0.77– 0.97, P = 0.01 y HR 0.86, 95% CI 0.75–0.99, P = 0.03 para Str-TIL y It-TIL, respectivamente) (69).



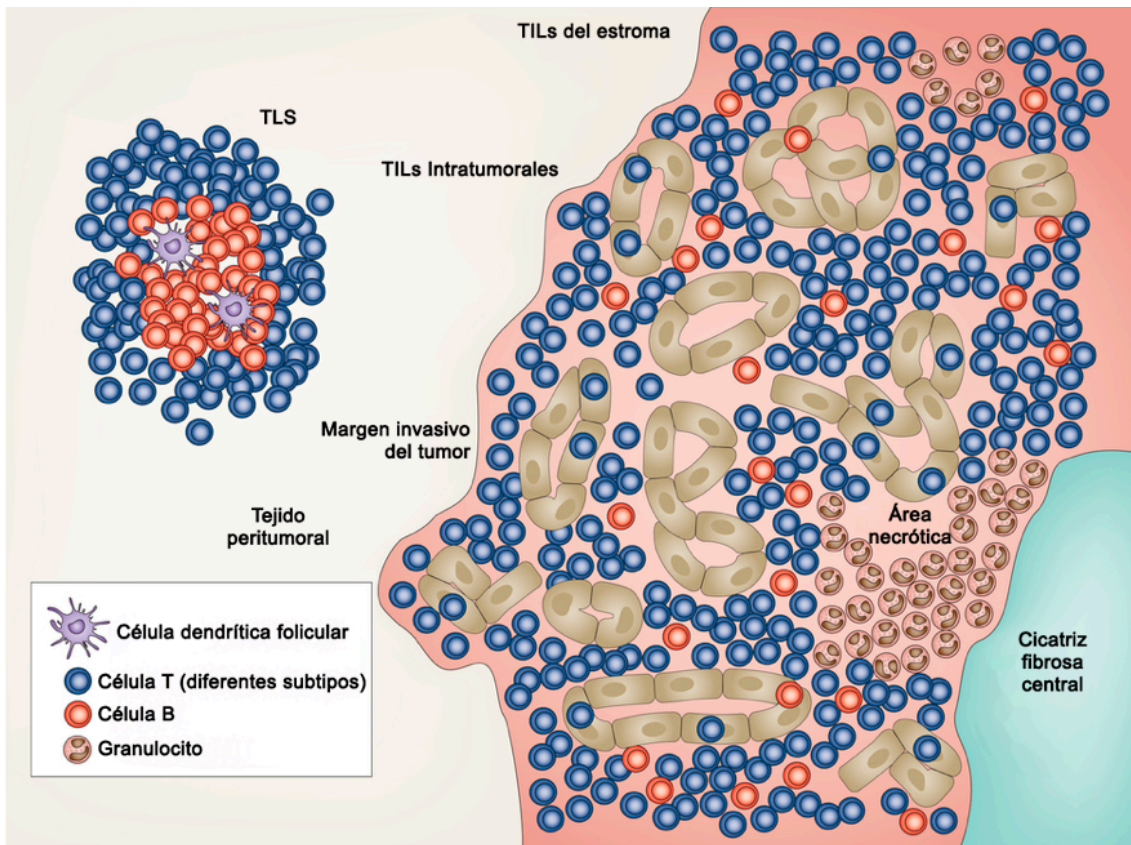


Figura 5. Microambiente tumoral
Adaptado de Savas et al. (70)

B. SISTEMA INMUNOLÓGICO Y CÁNCER DE MAMA.

B.1 Inmunidad relacionada con el cáncer.

Inmunología tumoral

El sistema inmunitario (SI) es el encargado de proteger el organismo de amenazas potencialmente dañinas, sobre todo microbiológicas. Pero el SI también desempeña un papel central en la patogénesis del cáncer, con efectos tanto inhibidores como promotores de la progresión tumoral. Por una parte, la respuesta inflamatoria en los tejidos en transformación mediada principalmente por leucocitos de estirpe mieloide es un proceso que proporciona un microambiente favorable para la progresión (crecimiento y vascularización) y también para la metástasis. Además, existe evidencia experimental (murina) y epidemiológica (humana) que indica que las disfunciones en la respuesta inmunitaria (RI) adaptativa y/o innata favorecen la aparición de determinados tumores (71). La actividad del SI frente al cáncer recibe el nombre de “inmunovigilancia” y la desarrollaremos a continuación.

Antigenicidad tumoral

Experimentos en sarcomas trasplantados inoculados en cepas murinas demuestran la existencia de antígenos (Ag) tumorales que permiten el rechazo del tumor en animales inmunizados con células irradiadas procedentes del mismo tumor. Esta capacidad de rechazo es transferible mediante linfocitos T que reconocen y destruyen específicamente el tumor trasplantado. La naturaleza molecular de los Ag de estos tumores experimentales ha sido aclarada en varios casos y resulta de la expresión en el tumor de péptidos cuya secuencia está mutada y que son presentados por moléculas de histocompatibilidad de clase I.

En neoplasias humanas también se dispone de evidencias sobre la existencia de Ag tumorales reconocibles por el SI. El suero de los pacientes contiene anticuerpos (Ac)

capaces de reaccionar frente a proteínas presentes con cierto grado de selectividad en el tumor pero que no son capaces de dañar al mismo de forma significativa ya que con frecuencia los Ag no son accesibles a los Ac al estar en el interior de las células malignas. Cuando el Ag se encuentra en la superficie, la actividad lítica de esos Ac mediada por complemento o células NK (Natural Killer) es insuficiente por la escasa concentración de estos Ac y otros factores.

Se han descrito múltiples Ag reconocibles por linfocitos T, principalmente CD8, pero también CD4. La RI celular se considera de gran interés por su capacidad de mediar en el rechazo de tejidos, como ocurre en el trasplante de injertos alogénicos. Existen dos tipos principales de Ag reconocibles por linfocitos T:

- **Ag exclusivos de tumor**→Son secuencias peptídicas mutadas exclusivas de las modificaciones genéticas de cada tumor y, por tanto, de cada paciente concreto. El problema de los Ag exclusivos de cada tumor es que presentan grandes dificultades para su identificación y aplicación en la elaboración de vacunas específicas.

- **Ag compartidos entre tumores**→En este caso se trata de proteínas que aparecen en diferentes neoplasias. Entre ellos cabe distinguir:

Ag virales: proteínas de secuencias virales críticas en la transformación neoplásica como los antígenos E6 y E7 de papilomavirus o el antígeno EBNA del virus de Epstein-Barr.

Ag embrionarios de expresión aberrante en el tumor, como la alfa-fetoproteína o CEA.

Ag de expresión selectiva en el testículo y placenta como los genes MAGE-1,2 y 3, BAGE, GAGE y NY-ESO-1.

Ag no mutados altamente sobreexpresados en tumores, frecuentemente Ag de diferenciación tisular (por ejemplo, proteínas implicadas en el funcionamiento de los melanosomas o proteínas presentes en el tejido prostático tales como PSA o la fosfatasa ácida prostática).

Inmunovigilancia antitumoral e inmunoedición.

En la observación microscópica del estroma de múltiples tipos de tumores sólidos (entre los que destacan los de colon y ovario) hay evidencia de la existencia de linfocitos T efectores activados y de su correlación como factor independiente de gran peso estadístico con el pronóstico de los pacientes. Se desconoce cuáles son los Ag reconocidos en la mayor parte de los casos y el mecanismo por el que este infiltrado linfocitario se opone a la progresión del tumor. Se ha postulado un modelo teórico en el que el tumor incipiente, bajo el control del SI, detiene su progresión y puede ser eliminado (fase de eliminación). Como consecuencia de la presión del SI el tumor selecciona mecanismos de escape para dar lugar a una fase en la que el tumor no progresa, pero permanece viable en equilibrio con los mecanismos inmunitarios que lo deberían destruir (fase de equilibrio). Finalmente, el tumor conseguiría en algunos casos desarrollar mecanismos que le permiten escapar al control del SI (fase de escape) y continuar su progresión. Una observación experimental interesante es que los tumores que se han desarrollado en ratones inmunodeficientes tienden a ser más inmunogénicos cuando se trasplantan a ratones singénicos inmunocompetentes. Este fenómeno se conoce como "inmunoeedición", en el sentido de que la presión del SI edita la inmunogenicidad de las células tumorales (72).

El escape tumoral al SI puede ocurrir por mutación, delección o silenciamiento epigenético de los Ag o de las moléculas de presentación antigénica del complejo MHC. También colaboran en la progresión neoplásica la síntesis de biomoléculas que deprimen de forma local o sistémica las funciones linfocitarias efectoras para que no resulten dañinas para el tumor. Las observaciones en series de pacientes con inmunodeficiencias primarias y secundarias indican que existe mayor predisposición a sufrir algunas enfermedades neoplásicas principalmente causadas por virus, aunque no es así en el caso de los carcinomas más prevalentes (72).

Inmunosupresión en el microambiente tumoral.

La evidencia experimental de la teoría de la inmunovigilancia coexiste con otras que demuestran que la presencia de macrófagos, mastocitos y linfocitos B en tumores experimentales es necesaria para la transformación y progresión tumoral. Se postula la existencia de un tipo de inflamación protumoral dependiente de los factores de transcripción NF-kB y STAT-3, en la que tendría un papel preponderante las citoquinas y factores de crecimiento favorecedores de la vascularización y la metástasis. Esta *inflamación protumoral* se parecería a la que se encuentra en tejidos dañados pero ya en fase de cicatrización.

Ciertamente, el tejido tumoral es muy rico en factores y mecanismos capaces de inhibir la RI. Por su importancia destacan los siguientes mecanismos inmunodepresores que operan en el microambiente tumoral:

Factor Transformador del crecimiento- β (TGF- β): Se trata de una citoquina liberada tanto por células tumorales como por las células infiltrantes del SI y que reprime las funciones de linfocitos T efectores, células NK y células presentadoras de Ag. Existen otras citoquinas como IL-10 para las que se postula una función inmunosupresora similar.

Indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO): Es la enzima limitante del catabolismo del triptófano. Su expresión por parte del tumor o por células del SI provoca la reducción de la concentración de este aminoácido, esencial para la proliferación de los linfocitos efectores y produce potentes sustancias inmunomoduladoras denominadas *quinureninas*. El principal factor inducido de IDO es el interferón gamma, de forma que este mecanismo enzimático se activa ante la presencia de un infiltrado linfocitario potencialmente tumorocida.

Antígeno de linfocitos T citotóxicos-4 (CTLA-4). Esta molécula se expresa a partir de los linfocitos T activados y reguladores. CTLA-4 modula la activación

linfocitaria en competencia ventajosa con la glucoproteína co-estimuladora CD28 por la unión a los mismos ligandos (CD80 y CD86) presentes en células presentadoras de Ag.

Eje “muerte programada-1 y su ligando (PD-1/PDL-1). PD-1 es una molécula de superficie que se expresa en linfocitos T activados, células B y macrófagos. Tras la unión a su ligando, transmite señales supresoras. Su ligando (PDL-1) es expresado por las células presentadoras de Ag y, también, por las células tumorales, y es inducido principalmente por la presencia de IFN-gamma, de manera que se comporta como un mecanismo inducible de defensa del tumor al percibir la llegada de una RI celular a su entorno.

Células T reguladoras (Treg). Son un grupo de linfocitos CD4+ que expresan constitutivamente el factor de transcripción Foxp3 y el marcador de activación CD25. Estas células inhiben la actividad de linfocitos efectores mediante la generación de citoquinas inmunodepresoras como IL-10 y la expresión de moléculas como CTLA-4 y PD-1. TGF-B y otros factores del microambiente tumoral determinan la conversión de linfocitos TCD4 efectores en Treg.

Células inmunosupresoras de origen mieloide. Los tumores inducen la formación y la acumulación de células dendríticas tolerogénicas, macrófagos tipo M2 y células supresoras de origen mieloide (una población heterogénea formada por precursores de monocitos y neutrófilos, que contribuye a la inhibición de las respuestas linfocitarias efectoras mediante inducción de linfocitos Treg, producción de citoquinas inmunodepresoras como el TGF- β , y por secuestro de los aminoácidos esenciales para la actividad de los linfocitos como arginina, triptófano o cisteína) (73).

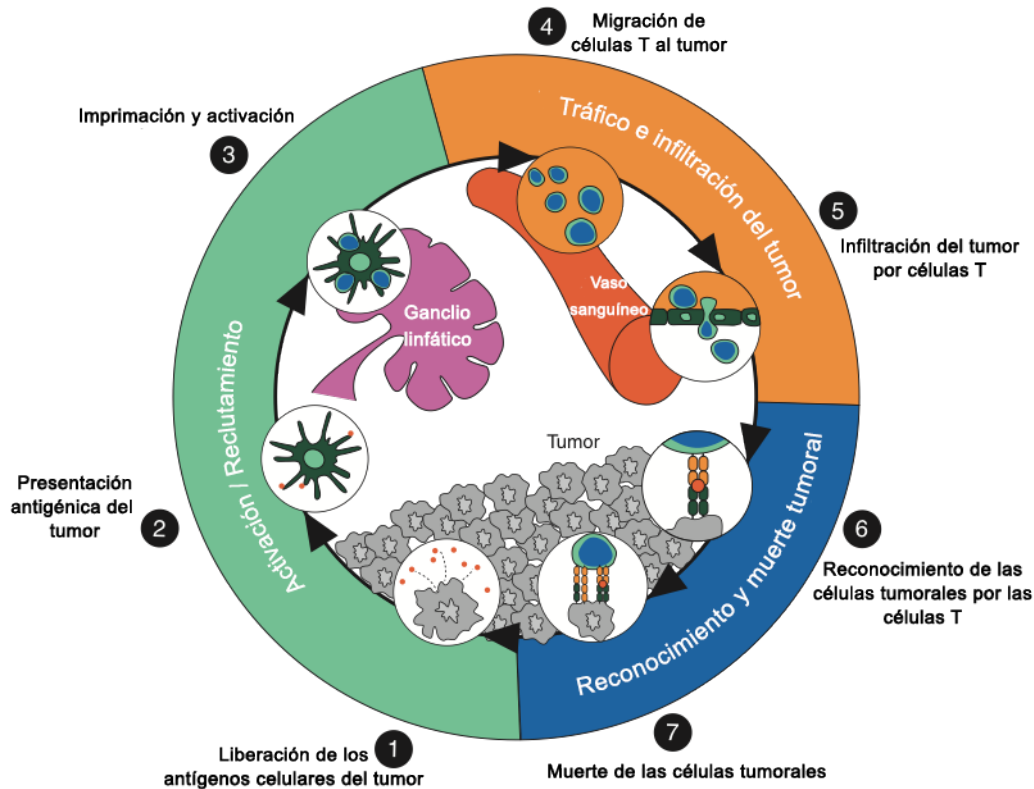


Figura 6. El ciclo de la inmunidad tumoral
Adaptado de Kim et al (74)

B.2 Inmunología del Cáncer de mama.

El SI tiene un papel central en el mantenimiento del equilibrio biológico del cáncer de mama. Según la hipótesis de la inmunovigilancia, los tumores capaces de evadir al sistema inmune son seleccionados gracias a la evolución génica que han ido experimentando mientras que los que no desarrollan mecanismos inmunosupresores son finalmente eliminados. En la fase de eliminación, una respuesta inflamatoria aguda remodela el estroma e inicia la angiogénesis con la llegada de células inmunes innatas como macrófagos, células dendríticas, NK y otras (75). Como consecuencia del reconocimiento de las células tumorales transformadas por estas células inmunes tiene lugar la producción de citoquinas inflamatorias como interleukina-12 (IL-12) e

interferón-gamma (IFN- γ). Estas citoquinas promueven la activación de las células inmunes innatas haciendo que migren a los ganglios linfáticos que drenan al tumor para presentar los antígenos a las células T (CD4+, CD8+) nativas. Una vez ya están las células T activadas se expanden y regresan al microambiente tumoral donde puede inducir la muerte de la célula tumoral. En esta última situación puede suceder que se consiga la erradicación completa del tumor o que evolucionen variantes tumorales que escapan a la vigilancia inmunológica siendo finalmente capaces de desarrollar un tumor con un volumen determinado. La presión selectiva del sistema inmune sobre las células tumorales puede resultar en que adquieran ciertas capacidades que las predisponen a escapar de la vigilancia inmunológica. Como resultado se suceden una serie de mecanismos mayores que promueven activamente el crecimiento tumoral como es el paso de una respuesta inmune antitumoral T helper tipo 1 (TH1) a una respuesta inmune protumoral con linfocitos T helper tipo 2 (TH2), al tiempo que se producen factores solubles por las células tumorales para inhibir las células dendríticas y la función del linfocito T. En este contexto en el microambiente tumoral predominan las vías inhibitorias de control inmune que acaban inactivando a los linfocitos T específicos contra los antígenos tumorales. Así el tumor adquiere una completa autonomía independiente del sistema inmunológico, creciendo y metastatizando sin control(76).



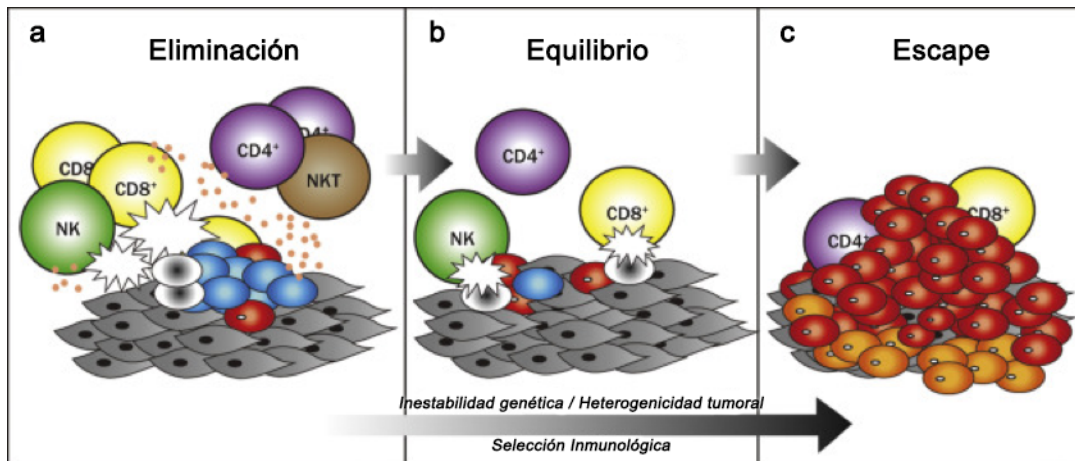


Figura 7. Teoría de la inmunoección del cáncer
Adaptado de Dunn GP et al (72)

Biomarcadores inmunológicos

El impacto del ambiente inmunológico en la progresión del cáncer de mama depende tanto del fenotipo del carcinoma como de los tipos de células inflamatorias que forman el microambiente tumoral (71). Como hemos visto anteriormente el cáncer de mama puede ser dividido en distintos subtipos basados en los perfiles de expresión génica. Los carcinomas de mama triple negativos y HER2+ parecen tumores más inmunogénicos que los carcinomas luminal A, como se evidencia tanto en la composición de los TILs del microambiente tumoral como en los modelos de firmas genéticas (77). Se ha descrito un mayor número de TILs en carcinomas RE-comparado con los carcinomas RE+. Los modelos de expresión génica de respuesta inmune se asocian a mejor supervivencia en tumores RE-HER2- y en tumores HER2+ pero no para carcinomas RE+HER2-. Al contrario que en el carcinoma luminal, el tumor basal-like tiene una elevada expresión de genes relacionados con la inmunidad humoral favoreciendo los infiltrados linfocitarios TH2 (78).

Linfocitos infiltrantes de tumor y agregados linfoides en cáncer de mama.

Tanto los TILs como los agregados linfoides han sido relacionados con el pronóstico de cáncer de mama como analizamos en apartados anteriores. La presencia de TILs dentro del microambiente tumoral puede ser evaluado por H&E y junto a IHC se puede evaluar los diferentes linfocitos que caracterizarían los TIL. La presencia de TILs en carcinoma de mama triple negativo es un factor pronóstico independiente de mejora en supervivencia global, menor recurrencia a distancia e incremento de supervivencia libre de metástasis (70). La presencia de TILs residual tras QT neoadyuvante en los carcinoma de mama triple negativo es también un factor de buen pronóstico para supervivencia global y libre de metástasis(69). La presencia de un elevado número de TILs en carcinomas HER2+ se correlaciona con una supervivencia prolongada y con la respuesta a trastuzumab (79).

Entre los subtipos específicos de TILs, una presencia mayor de linfocitos T citotóxicos CD8+, linfocitos T helper foliculares CD4+, linfocitos B CD20+, son predictores de supervivencia en todos los subtipos de cáncer de mama (80-81). Por el contrario, un número elevado de linfocitos T FoxP3+ se asocia con un mayor grado tumoral, RE negativos y supervivencia libre de recaída y global más corta (80). Hay trabajos publicados en cáncer de mama triple negativo en el cual en su primera recaída tienen menos TILs que su tumor primario(81). El significado clínico de los macrófagos que infiltran los tumores es menos claro (82).

Los agregados linfoides son otros biomarcadores emergentes del microambiente tumoral. También son llamadas estructuras linfoides ectópicas o estructuras linfoides terciarias. Estos agregados pueden ser agregados sueltos de linfocitos T y B o nódulos bien organizados de linfocitos con un centro germinal. Estas estructuras representan focos de inmunorregulación que reflejan la respuesta inmune adaptativa



en marcha (83). Estructuras similares se han observado en carcinomas de mama sin tratamiento asociándose a menor riesgo de recaída y mejor supervivencia global (84).

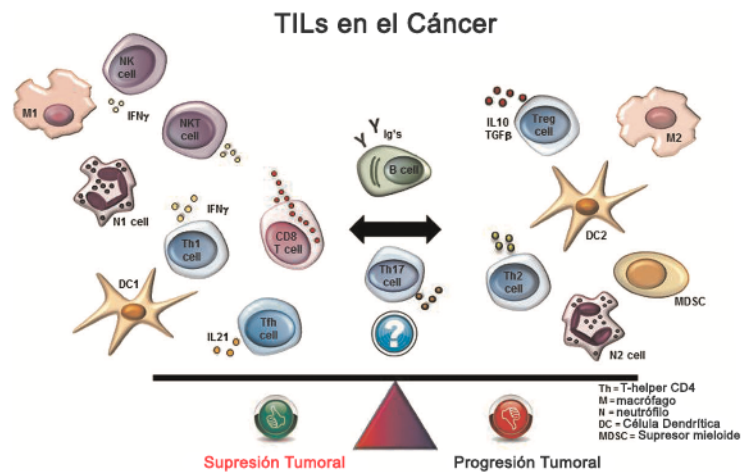


Figura 8. TILs en el cáncer
Adaptado de Salgado et al (85)

TILs y respuesta a tratamiento.

La presencia de TILs y/o agregados linfoides en el microambiente tumoral de la mama puede también predecir respuesta a tratamiento neo y adyuvante. Un número elevado de TILs se correlaciona con mayor probabilidad de alcanzar respuesta completa patológica (pCR) tras tratamiento neoadyuvante (86). La presencia de un 60% de TILs o una elevada expresión de RNA mensajero de genes inmunes, se correlaciona con pCR a quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas y taxanos en pacientes triple negativas y para carcinomas HER2 + tratadas con esquemas que incluyan platino (70, 86). Altos niveles de TILs en carcinomas RE- predice pCR con quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas y en adyuvancia también se asocia a una mayor SLE comparado con el esquema CMF (ciclofosfamida, metotrexate y fluoracilo) (87).

En el contexto de la adyuvancia, el predominio de TILs se asocia a una menor recurrencia tras tratamiento adyuvante con trastuzumab en cáncer de mama HER2+.

Se ha objetivado una reducción significativa de linfocitos T reguladores (Treg FoxP3) en pacientes tratadas con un inhibidor de la aromatasa tipo letrozol (88).

La presencia de TILs en el lecho residual del microambiente tumoral tras un tratamiento neoadyuvante es un factor pronóstico favorable. La presencia de altos niveles de CD8+ y bajo FoxP3 en los linfocitos residuales tras una quimioterapia neoadyuvante se asocia con una mejora en supervivencia libre de recurrencia y global (87,88).

Biomarcadores de la vía PD-1 en cáncer de mama.

La vía PD-1 es uno de los puntos de control más importantes para regular la respuesta inmune dentro del microambiente tumoral (90). PD-1 es una molécula co-reguladora expresada en los linfocitos activados. Su ligando, PD-L1 puede estar constitutivamente sobreexpresado en las células tumorales por mutaciones, alteraciones cromosómicas o amplificaciones (91). En cáncer de mama, la pérdida de PTEN ocasiona un incremento en la expresión de PD-L1 tumoral y descenso de la proliferación de células T. En carcinomas con mutaciones TP53 la expresión de PD-L1 es más frecuente que con otras mutaciones, incluidas las de PIK3CA (92).

En cáncer de mama, los porcentajes de expresión de PD-1 y/o PD-L1 en TILs o en las células tumorales varían entre estudios. Es posible que las diferencias sean debidas al tamaño de la pieza, a la forma de evaluación (microarray o sección completa) y por el método usado para detectar la expresión de PD-1/PD-L1(93). Globalmente, la presencia de PD1+ TILs se asocia con un fenotipo agresivo, grado histológico alto y pérdida de expresión de RE. PD-1+TILs se asocia con peor supervivencia en subtipo luminal B y carcinomas basal-like (93).

El porcentaje de expresión de PD-L1 se ha detectado en el 34% de las células tumorales de cáncer de mama y del 41% en los TILs (94). La expresión de PD-L1 en



el tumor se correlaciona también con grado tumoral y la pérdida de expresión de RE. Los porcentajes de expresión de PD-L1 en las células de cáncer de mama triple negativo varía entre un 19% y un 59% según los estudios publicados (92). También parece ser más frecuente en el cáncer de mama triple negativo los TILs PD-1+ y las células tumorales PD-L1+ que en otros subtipos de cáncer de mama (92). Por otro lado hay datos de que la expresión de PD-L1 se correlaciona con infiltrados TILs CD8+(95) así como su posible papel predictivo de respuesta completa patológica tras quimioterapia en pacientes con elevada expresión de TILs y de PD-L1(96).

En el momento actual la relación entre la expresión de PD-L1 en el microambiente tumoral y los resultados clínicos de las pacientes con cáncer de mama no está claro. De los estudios publicados destacan dos que muestran resultados divergentes. Muenst et al. concluye tras el análisis de 650 muestras de cáncer de mama que la expresión de PD-L1 por las células tumorales se asocia a peor SG en subgrupo luminal B (HER2-), luminal B HER2 +, subtipo HER2+ y basal like (97). Sin embargo, Schalper identifica en su estudio PD-L1 mRNA en casi el 60% de los tumores de mama y se asocia con un aumento de TILs y una mejor supervivencia libre de recurrencia (77).

Dos meta-análisis recientes, con 7802 y 2061 pacientes, encontraron que la alta expresión de PD-L1 parece ser un factor pronóstico adverso mientras que por el contrario, niveles elevados de mRNA de PD-L1 se puede considerar un factor pronóstico positivo con mejores datos de supervivencia global y supervivencia libre de recurrencia en pacientes con cáncer de mama (98)(99).



2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El impacto que ocasiona el diagnóstico de cáncer de mama en nuestra sociedad es, cada vez, de mayor importancia. Esto es así no sólo por su frecuencia sino también por la comorbilidad que puede ir asociada a los diferentes tratamientos que se aplican para conseguir su curación. De todos los factores pronósticos conocidos, la afectación ganglionar en la axila es el principal predictor de supervivencia global y recurrencia. La linfadenectomía era el procedimiento diagnóstico que se empleaba para la estadificación de la axila en los años 90 sin que esto redundara en un beneficio terapéutico para las pacientes. En este sentido la biopsia selectiva del ganglio centinela emergió como una alternativa pudiendo así evitarse las temidas complicaciones de la linfadenectomía axilar. Desde entonces han sido varios los ensayos que han demostrado que la biopsia selectiva de ganglio centinela predice con gran fiabilidad el estado patológico de la axila, siendo más costo-efectivo que la disección ganglionar. Sin embargo, 20 años después, quedan sin resolver ciertas controversias en relación a diferentes aspectos técnicos y clínicos que giran alrededor de esta técnica como ya se ha comentado anteriormente, además de no ser una técnica inocua en muchos casos.

En el proceso de tumorigénesis, el sistema inmunitario desempeña un papel fundamental con efectos tanto promotores como inhibidores para los tumores. Se ha visto que la presencia de TILs es un factor pronóstico para el cáncer de mama incluso puede ser predictivo de respuesta a los tratamientos con quimioterapia neoadyuvante. Además, se ha visto como una mayor expresión de TILs-CD8 se correlaciona con una mayor supervivencia. Por otro lado, los TILs residuales tras quimioterapia neoadyuvante en el carcinoma de mama triple negativo son también un factor de buen pronóstico para el intervalo libre de metástasis lo que sugiere un papel central de los TILs/SI en la progresión tumoral.



Sin embargo, no hay ningún estudio que relacione la presencia de TILs, su fenotipo y PD-L1 con la progresión tumoral regional valorada como la presencia o no de afectación del ganglio centinela en pacientes con cáncer de mama temprano. Nuestro estudio es el primero que determina el papel predictivo de los TILs y PD-L1 para la afectación ganglionar en el cáncer de mama temprano.



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

A. HIPÓTESIS

Estudios recientes parecen indicar que la presencia de TILs en los tumores es un factor pronóstico favorable e incluso predictivo de respuesta a los tratamientos empleados en cáncer de mama. Estos hechos sugieren que el SI es capaz de frenar la progresión tumoral, por lo que estudiar la expresión de los TILs en el cáncer de mama temprano junto con el análisis del fenotipo de estos TILs y PD-L1 en el microambiente tumoral podría constituir una herramienta predictora de afectación del ganglio centinela, primer eslabón en la progresión de esta enfermedad.

B. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

B.1 Primarios.

- Correlacionar los infiltrados linfocitarios (TILs, CD3, CD8) y PDL-1 en el tumor primario medido mediante tinción con H&E e inmunohistoquímica con la presencia de afectación tumoral de/los ganglios axilares obtenidos mediante BSGC en pacientes con cáncer de mama temprano.
- Establecer un corte en la expresión de TILs, CD3, CD8 y PDL-1 que pudiera obviar la estadificación ganglionar quirúrgica.

B.2 Secundarios

- Establecer si existe relación entre los TILs, CD3, CD8 y PD-L1 en el tumor primario y las diferentes variables clínico-patológicas conocidas.
- Describir la expresión de TILs, CD3, CD8 y PD-L1 con el fenotipo del cáncer de mama.

- Relación entre los TILs, CD3, CD8 y PD-L1 por fenotipos y la probabilidad de afectación de ganglio centinela.
- Establecer si existe relación entre los TILs, CD3, CD8 y PDL-1 en el tumor primario y la supervivencia libre de enfermedad.
- Establecer la relación entre la afectación del ganglio centinela con la supervivencia libre de enfermedad.



4. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Diseño del estudio, población, criterios de inclusión y exclusión y tratamiento.

A.1 Diseño

Se trata de un estudio de cohorte retrospectiva llevado a cabo en los servicios de anatomía patológica, ginecología, cirugía y oncología médica de la Agencia Sanitaria Costa del Sol. En él, se han incluido un total de 138 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama temprano a las que se les ha realizado BSGC. Estas pacientes fueron valoradas en la unidad de mama de nuestro centro en el período comprendido entre septiembre-2009 y noviembre-2012.

A.2 Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios para la elección de nuestra cohorte fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

- Sexo femenino.
- Edad \geq 18 años.
- Diagnóstico de carcinoma de mama infiltrante en estadio temprano según la 7ª edición de la AJCC(24) candidata a estadificación ganglionar axilar mediante BSGC.
- El tamaño del tumor fue valorado por ecografía y mamografía y debía ser \leq 5 cm. Si existía discordancia radiológica, se aceptaba el diámetro mayor de ellos.
- Ausencia de afectación ganglionar axilar clínica o ecográfica.
- Estudio de extensión con radiografía de tórax negativo.

Criterios de exclusión

- Tumores multicéntricos.

- Histología diferente a adenocarcinoma.
- Ausencia de tejido para estudio.
- Tratamiento con quimioterapia neoadyuvante.
- Antecedentes de otra neoplasia de mama contralateral o metacrónica.
- Denegación del consentimiento informado.

A.3 Procedimiento quirúrgico

Todas las pacientes del estudio fueron sometidas a cirugía del tumor primario (conservadora o mastectomía) y BSGC con o sin LA. La localización del ganglio centinela se llevó a cabo en todos los casos mediante técnica doble con rastreo isotópico y colorante vital. Hasta septiembre de 2011 a todas las pacientes con afectación de alguno de los ganglios centinelas, se les sometió a LA reglada. A raíz de la publicación de los resultados del estudio Z0011(33) las pacientes con afectación microscópica en la BSGC no fueron sometidas a LA.

A.4 Variables

Las variables que se han recogido para el estudio aparecen en la siguiente tabla:

Tabla 9. Variables a estudio

Variable	Tipo		Valores		Instrumento de recogida
Mononucleares en estroma	Cuantitativo continuo		Porcentaje		Tinción inmuno-histoquímica en laminilla
Linfocitos T CD3 en estroma					
Linfocitos T CD8 en estroma					
PD-L1 ic	Cuantitativo continuo	Categorico dicotomizado	Porcentaje	<1%(-) ≥1%(+)	
PD-L1 tumor	Cuantitativo continuo	Categorico dicotomizado	Porcentaje	<1%(-) ≥1%(+)	

Tabla 10. Variables demográficas

Variable	Tipo	Valores	Instrumento de recogida
Sexo	Cualitativa nominal	Hombre mujer	Historia clínica
Edad	Cuantitativa discreta	Años	
Fecha diagnóstico	Fecha	Día, mes, año	

Tabla 11. Variables del tumor

Variable		Tipo	Valores	Instrumento de recogida
Tipo histológico	ductal	Cualitativo nominal	1=ductal	Historia clínica
	otros		2= resto	
Tamaño patológico		Cualitativo nominal	1: "<1mm T1m"	
			2: ">1≤5mm T1a"	
			3: ">5≤10mm T1b"	
			4: ">10≤20mm T1c"	
			5: ">20≤50mm T2"	
	6: ">50 mm T3"			
Invasión Vascular		Categórico dicotómico	1: sí	
			2: no	
			3: no determinada	
Ki67		Cuantitativa continua	porcentaje	
		Categórica dicotómica	1: <20%	
			2: ≥ 20%	
		9: no determinado		
Receptor estrogénico		Categórica dicotómica	1: positivo	
			2: negativo	
			9: no determinado	
Receptor progesterona		Categórica dicotómica	1: positivo	
			2: negativo	
			9: no determinado	
HER2		Categórica dicotómica	1: positivo	
			2: negativo	
			9: no determinado	
Ganglio Centinela		Categórica dicotómica	0: no afectado	
			1: afectado	
Linfadenectomía axilar		Categórica dicotómica	0: no	
			1: sí	
			9: no conocida o no procede	

Tabla 12. Variables de seguimiento

Variables	Tipo	Valores	Instrumento recogida
Recaída	Categórica dicotómica	1: sí 2: no 3: perdida	Historia clínica
Fecha 1ª recaída	Fecha	Día, mes, año	
Fecha último seguimiento	Fecha	Día, mes, año	
Estado último seguimiento	Cualitativo nominal	1: VSE 2: VCE 3: MSE 4: MCE 5: perdida	
Supervivencia libre enfermedad	Cuantitativo continuo	meses	

- Supervivencia global: tiempo que transcurre desde el diagnóstico de cáncer de mama hasta la muerte por cualquier causa. Su cálculo es el resultado de la diferencia entre la fecha del éxitus o último seguimiento y la fecha del diagnóstico.
- Supervivencia libre de enfermedad: tiempo que transcurre desde la fecha del tratamiento quirúrgico hasta la primera evidencia de recaída local o a distancia. Su cálculo es el resultado de la diferencia entre la fecha de la recaída o último seguimiento y la fecha de la cirugía.

B. Procedimientos del estudio

B.1 Selección de muestras

Las muestras se recogieron del laboratorio de anatomía patológica de la Agencia Sanitaria Costa del Sol. Se utilizaron muestras archivadas en parafina. Se emplearon nuevas láminas teñidas en H-E para el análisis de TILs así como para el estudio inmunohistoquímico de los anticuerpos CD3, CD8 y PD-L1. Antes de la tinción, especímenes sin células tumorales o con células cuestionables se excluyeron del análisis. La interpretación de los resultados de todas las muestras de H-E e inmunohistoquímica fue realizada por dos patólogos. Los casos con resultados conflictivos fueron reevaluados hasta la obtención de un consenso.

B.2 Procesado de las muestras biológicas.

Se usaron bloques de parafina procedentes de pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama. Se le realizó un corte de H-E a 3 micras y cortes en portaobjetos tratados para estudio inmunohistoquímico de los siguientes anticuerpos: CD3(clona 2GV6), CD8(SP57) y PDL-1(SP142). El estudio inmunohistoquímico es automatizado en BerchmarK ultra IHQ/ISH Staining Modulo, siendo el procedimiento U OptiView DAB IHC.

El modelo de tinción celular de CD3 y CD8 es tinción de membrana.

El estudio de PDL1 se realiza con control positivo incluido en la muestra a estudiar y un control negativo de forma independiente. El modelo de tinción celular de VENTANA PDL1 es una tinción membranosa perimetral parcial o completa de las células tumorales (con o sin componente citoplasmático) y una tinción discontinua o lineal de las células inmunitarias.

Procesado e interpretación de RH, HER2, Ki67

La determinación de los receptores hormonales se analizó mediante IHQ en tejido fijado en formol al 10% e incluido en parafina. Se usaron anticuerpos primarios de conejo y ratón de laboratorio Dako Denmark A/S, Dinamarca).

Nos basamos en las recomendaciones de la ASCO y del CAP para la valoración de los receptores de estrógenos y progesterona (100)(101).

Se informó el porcentaje de células tumorales positivas de cualquier intensidad. Tumores con el 1% o más de células tumorales invasivas, se consideran como positivos, pues algunos trabajos demuestran que se pueden beneficiar del tratamiento.

Receptores estrógenos: para la inmunodetección de los RE se utilizó un anticuerpo primario anti-RE de conejo (clona SP1; Master Diagnóstica S.L)

Receptores progesterona: para la inmunodetección de los RP se utilizó un anticuerpo primario anti-RP de ratón (clona Y85; Master Diagnóstica S.L)

HER2, mediante técnicas de IHQ, se detecta la sobreexpresión de la proteína: para la inmunodetección se utilizó el Herceptest TM DakoCytomation Autostainer (Kits) que incluye anticuerpo policlonal de conejo anti Her2 (Dako Denmark A/S, Dinamarca) en una solución comercial prediluida, con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Interpretación de los resultados por IHQ:

- Negativo (0): Ausencia de tinción de membrana o tinción en menos del 10% de las células.
- Negativo (1+): Tinción de membrana débil e incompleta en más del 10% de las células.
- Equívoco (2+): Tinción completa de membrana, débil o moderada, en más del 10% o tinción completa e intensa en 10-30% de las células.



- Positivo (3+): Tinción de membrana completa e intensa en más del 30% de las células.

Un resultado equívoco (2+) se sometía posteriormente a un estudio mediante hibridación (FISH o CISH). También se realiza en casos de duda sobre la idoneidad de la técnica de IHQ. Interpretación de resultados del análisis por FISH:

- Negativo (No amplificado): Ratio de señales del gen HER2 frente a señales del cromosoma 17 menor de 1,8 ó < 4 copias del gen HER2 por núcleo.
- Positivo (Amplificado): Ratio de señales del gen HER2 frente a señales del cromosoma 17 mayor de 2,2 ó > 6 copias del gen HER2 por núcleo.
- Equívoco: Ratio de señales del gen HER2 frente a señales del cromosoma 17 entre 1,8 y 2,2.

No interpretable: Si ocurre alguna de las siguientes circunstancias:

- No hay presencia de señales de una u otra sonda en al menos 20 células.
- Si las señales son débiles o inexistentes en más del 25% de las células.
- Los controles no se consideran óptimos.
- No es posible valorar como mínimo dos áreas diferentes de carcinoma infiltrante.

Ki-67: Para la inmunodetección del marcador Ki 67 se utilizó un anticuerpo primario anti Ki-67 de conejo (Clona SP6; Master Diagnóstica S.L.).

Interpretación de los infiltrados linfocitarios, CD3 y CD8.

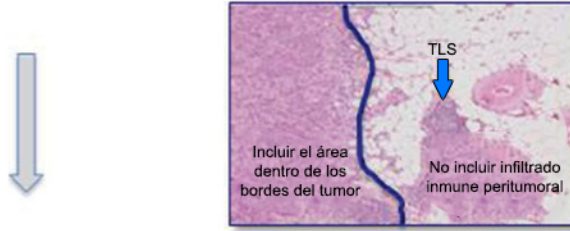
La cuantificación de TILs en el tejido tumoral se realizó siguiendo el Consenso sobre la metodología de lectura y evaluación de TILs en tumor primario de cáncer de mama(85).

- La determinación de los TILs en cáncer de mama está basada en los TILs presentes en el compartimento estromal. El porcentaje de TILs estromal es el área de tejido estromal infiltrado por TILs sobre el total del área estromal intratumoral.
- Se evalúan los TILs que estén dentro de los bordes del cáncer de mama infiltrante.
- Se excluyen los TILs que están fuera de los bordes tumorales y alrededor de focos de cáncer de mama ductal in situ y/o lóbulos normales.
- Se excluyen los TILs que están en zonas tumorales con artefactos, necrosis, hialinización regresiva así como también en el sitio donde se hizo la biopsia previa.
- Todas las células mononucleares (así como los linfocitos y células plasmáticas) deben ser evaluadas. Los leucocitos polimorfonucleares deben ser excluidos.
- Una sección de tejido por paciente (4-5 micras, aumento x200-400) se considera en la actualidad que es suficiente.
- La sección completa del tumor es preferible a una biopsia siempre que sea posible. En nuestro estudio se evaluó la sección completa del tumor.
- Se realiza una evaluación del promedio de TILs en todo el área tumoral. No debe centrarse en ningún punto concreto.
- Se aconseja que los TILs se midan en forma de variable continua. De esta forma, la información biológica resultante de este parámetro permitirá un análisis estadístico más riguroso.



- Debido a la importancia creciente de la caracterización molecular de los infiltrados linfocitarios en el microambiente tumoral, en nuestro estudio se determina CD3 y CD8 como marcadores de linfocitos T y T citotóxicos, respectivamente, siguiendo las mismas recomendaciones previamente descritas para los TILs pero con una tinción de inmunohistoquímica específica para CD3 y CD8. Se ha realizado una ratio para determinar el porcentaje de infiltración de CD3 y CD8 en relación al estroma tumoral.

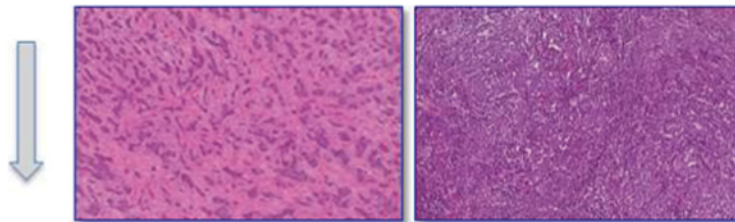
Paso 1: Seleccionar área tumoral



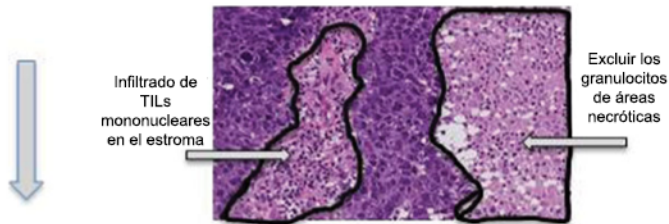
Paso 2: Definir el área del estroma



Paso 3: Visualizar a bajo aumento



Paso 4: Determinar el tipo de infiltrado inflamatorio



Paso 5: Evaluar el porcentaje de TILs en el estroma (ejemplos de porcentaje en la figura inferior)



Figura 9. Metodología de lectura de los TILs
Adaptada de Salgado et al(85)

Interpretación de las muestras teñidas con PD-L1.

La expresión de PD-L1 se evaluó en la membrana y el citoplasma de la célula tumoral y en el infiltrado inflamatorio. El porcentaje de células teñidas se evaluó en todo el corte histológico.

Se consideró un resultado positivo para la tinción la presencia de más de 1% de células tumorales o células inflamatorias con expresión positiva para PD-L1 y negativo cuando la presencia era inferior al 1%. El resultado se expresó también como variable continua en forma de porcentaje en relación al epitelio tumoral y al infiltrado inflamatorio.

C. Plan estadístico.

Se realizó análisis descriptivo utilizando distribución de frecuencias para variables cualitativas; y medidas de tendencia central (media), dispersión (desviación estándar) y posición (mediana y rango intercuartílico [Percentil 75 – Percentil25]) para las variables cuantitativas, utilizando exclusivamente las de posición cuando la distribución no es normal (caso de test de rachas significativo) o para comparación de grupos con muestra inferior a 30.

En función de la naturaleza de las variables para el análisis bivariado se seleccionaron los siguientes test estadísticos. Así, para evaluar la correlación entre dos variables cuantitativas, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson o Rho de Spearman en caso de distribución no normal (representando gráficamente mediante el gráfico de dispersión). Para evaluar diferencias en la distribución entre una variable cuantitativa y una variable cualitativa dicotómica, se utilizó el test de U-Mann-Whitney; el test H de Kruskal-Wallis para variable cualitativa con tres o más categorías; y se representaron mediante el diagrama de cajas (o boxplot). Para determinar diferencias entre dos

variables cualitativas se utilizó el test de Ji-Cuadrado (o test de Fisher en caso de frecuencia esperadas inferior a 5).

Se construyó modelo de regresión logística multivariante tomando como variable resultado la presencia de afectación ganglionar, incluyendo por método por pasos hacia delante los TILs junto con el fenotipo, valorando el RR con respectivo IC95%.

Finalmente, se realizó análisis de regresión de Cox para evaluar supervivencia libre de recaída y supervivencia, de forma independiente para cada uno de los marcadores de infiltración; describiendo Hazard Ratio (HR) con correspondiente intervalo de confianza al 95%, y representando las curvas de supervivencia.

En los diferentes análisis se estableció el nivel de significación estadística en $p < 0,05$.

D. Aspectos éticos del estudio.

A todas las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama temprano que cumplían los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, se le solicitó consentimiento informado. Se ha dispone de la aprobación del estudio por el comité de Ética de la Investigación del Hospital Costa del Sol.

El presente estudio se llevó a cabo siguiendo los principios de la declaración de Helsinki. Todos los datos recogidos en este proyecto se registraron de forma anónima, siguiendo estrictamente las leyes y normas de protección de datos en vigor (Ley 41/2002 de 14 de noviembre; Ley 15/1999 de 15 de diciembre).

Con el fin de proteger la confidencialidad de la información personal de los participantes se precisó que:

- Todos los datos que puedan identificar al participante se mantuvieron separados del resto de la información recogida en la ficha de recogida de variables.
- Cada caso del estudio contó con un número de identificación que fue el que figuraba en las bases de datos.

- El análisis de la información se hizo siempre de forma agregada y nunca individual.
- Todos los investigadores implicados en el proyecto se comprometieron a cumplir las normas necesarias para preservar la confidencialidad de la información facilitada por los participantes.
- Todas las bases de datos del proyecto estuvieron protegidas electrónicamente con códigos que limitaron el acceso únicamente a los investigadores del proyecto.



5. RESULTADOS

A. Análisis descriptivo de la cohorte de estudio.

La muestra de nuestro estudio está constituida por 138 pacientes con cáncer de mama temprano a las que se les realizó BSGC.

Las características de la muestra se presentan en la tabla 13.

La mediana de edad fue de 58 años y el 68,8% eran pacientes postmenopáusicas. El tipo histológico predominante fue el ductal (78,3%). El tamaño patológico del tumor ≤ 2 cm se presentó en el 81,9% de las pacientes. Predominaban las pacientes con RE positivos (81,2%). Tenían sobreexpresión de HER2 el 13,8% de la muestra. El 37,0% fueron tumores de alto grado (G3). La presencia de invasión vascular estaba presente en el 23,2% de la muestra. La mediana de Ki67 en nuestra cohorte fue del 20%. El 51,8% de las pacientes tenían un $ki67 \geq 20\%$.

De las pacientes que se sometieron a BSGC, ésta resultó positiva en el 37,7 % de los casos (n=52). Se realizó linfadenectomía axilar al 24,6% (34 pacientes) de las cuales tenían afectación ganglionar macroscópica el 21,7% (30 pacientes).

Atendiendo a inmunofenotipos, el luminal fue el más frecuente 81,2%, seguido del triple negativo (12,3%) y HER2 puro (6,5%).

Tabla 13. Descripción de la cohorte

Características de la muestra		Mediana	Intervalo
Edad		58	32-79
		N:138	% válido
Estado premenstrual	Premenopáusica	43	31,2 %
	Postmenopáusica	95	68,8 %
Tipo histológico	Ductal	108	78,3 %
	Lobulillar	10	7,2 %
	Otros	20	14,5 %
Grado	I	34	24,6 %
	II	53	38,4 %
	III	51	37%

Invasión vascular	Presente	32	23,2 %
	Ausente	106	76,8 %
Ki67	≥ 20%	71	51,8 %
	< 20%	67	48,2 %
Receptor Estrogénico	Positivo	112	81,2 %
	Negativo	26	18,8 %
Receptor Progesterona	Positivo	97	70,2%
	Negativo	41	29,8%
HER2	Positivo	19	13,8 %
	Negativo	119	86,2 %
Tamaño	pT1a	6	4,3 %
	pT1b	27	19,6 %
	pT1c	80	58 %
	pT2	25	18,1 %
Afectación GC	Presente	52	37,7 %
	Ausente	86	62,3 %
Tipo de Afectación ganglionar	Macroscópica	30	21,7%
	Microscópica	15	10,8 %
	Células aisladas	7	5,0 %
Linfadenectomía axilar	Sí	34	24,6 %
	No	104	75,4 %
Inmunofenotipo	Luminal	112	81,2 %
	HER2 puro	9	6,5 %
	Triple Negativo	17	12,3 %
Recaídas		12	8,7 %
Exitus		4	2,9 %

Tras una mediana de seguimiento de 52 meses (45-62), el 8,7% de las pacientes han presentado recaída tumoral y 2,9% han sido éxitos.

A.1 Análisis descriptivo de los TILs, CD3, CD8 y PD-L1 evaluados en cáncer de mama temprano.

Se dispone de los resultados de la infiltración por TILs y linfocitos CD3 y CD8 estudiados en la totalidad de la cohorte (n:138). La determinación de PD-L1 se realizó sobre 87 pacientes (63%).

En las 138 muestras analizadas la mediana del porcentaje de infiltración de TILs en el estroma tumoral fue de 2% (RI 4%, 1%-5%). La mediana de CD3 en el estroma fue 1,6% (RI 3,95%; 0,8%-4,75%) y para CD8 1,4% (RI 3,57%; 0,70%-4,27%). *Tabla 14*

La mediana de expresión de PD-L1 como una variable continua fue <1%. *Tabla 14*
Categorizando PD-L1 en positivo si $\geq 1\%$ y negativo si $< 1\%$, se objetivó PD-L1+ en ic y epitelio tumoral en el 40,2% (n:35) y 9,2% (n:8) de las pacientes respectivamente. *Tabla*

15

Tabla 14. Descripción del porcentaje de infiltración de TILs, CD3, CD8 y PD-L1 en la cohorte de estudio

	TILs	CD3	CD8	PD-L1 ic	PD-L1 tumor
% mediana expresión en estroma	2	1,6	1,4	0,5	0
Mín-Máx	0,5-80	0,25-64,0	0,21-60,8	0-30	0-5
Rango Intercuartílico	4(1-5)	3,95(0,8-4,75)	3,57 (0,7-4,27)	2,5(0,5-3,0)	0,5(0-0,5)

Tabla 15. Descripción del PD-L1 categorizado en positivo y negativo en la cohorte de estudio

N:87	PD-L1 ic	PD-L1 tumor
Estado Categorizado	n (%)	n (%)
Positivo ($\geq 1\%$)	35 (40,2)	8 (9,2)
Negativo	52 (59,8)	79 (90,8)

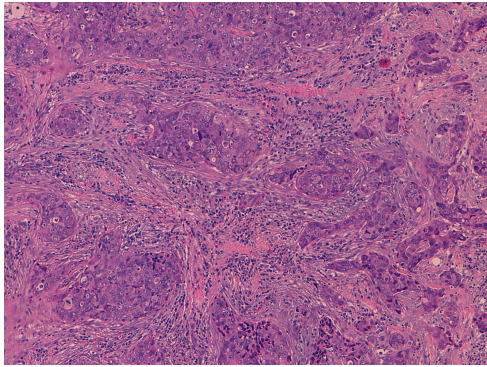


Figura 10. 80% TILs en estroma (x10)

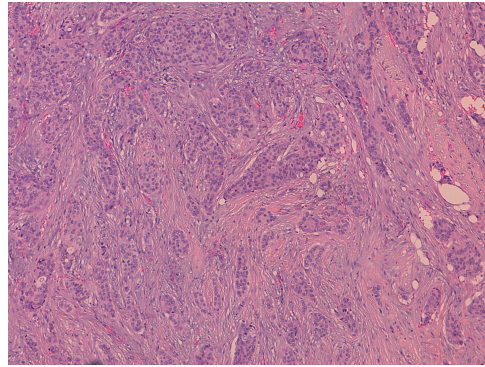


Figura 11. <1% TILs en estroma (x10)

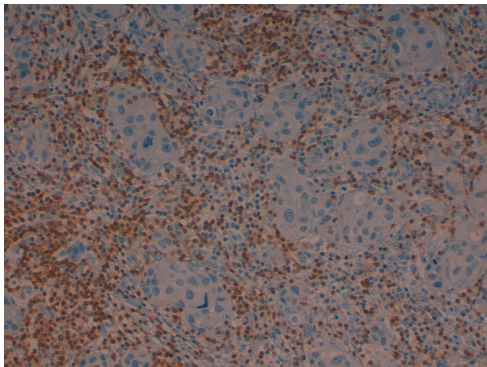


Figura 12. 65% linfocitos CD3 en estroma (20x)

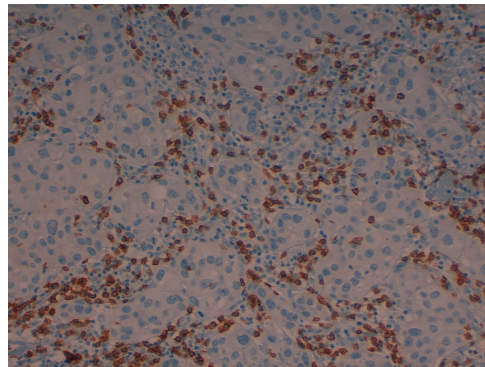


Figura 13. 50% linfocitos CD8 en estroma (20x)

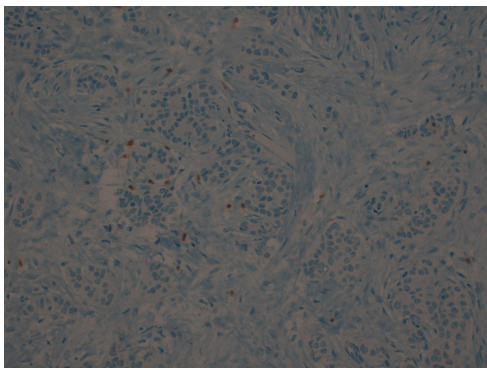


Figura 14. <1% linfocitos CD3 en estroma (20x)

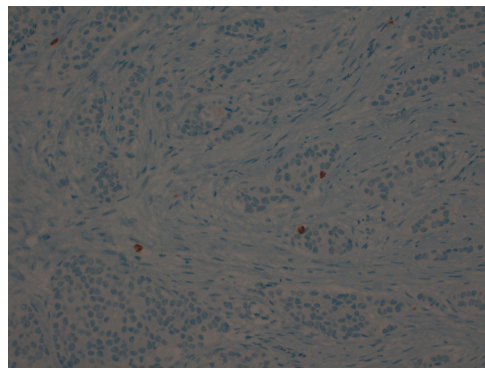


Figura 15. <1% linfocitos CD8 en estroma (20x)

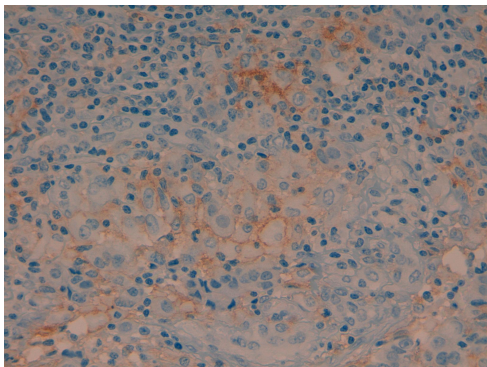


Figura 16. PD-L1 5% en epitelio tumoral (40x)

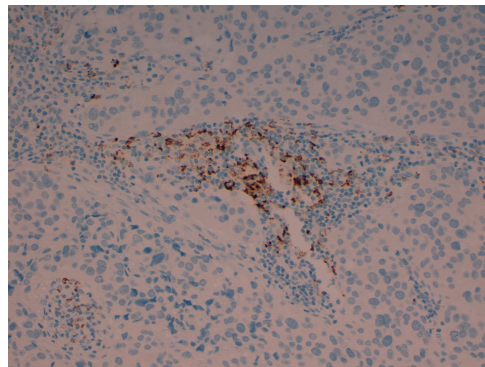


Figura 17. PD-L1 30% en celularidad inmune (20x)

Las imágenes corresponden a evaluaciones parciales del cristal de la laminilla

A.2 Relación entre la expresión de TILs, CD3 y CD8 con la afectación del ganglio centinela.

En nuestra cohorte la mediana de infiltración de TILs en el estroma tumoral en las pacientes con GC positivo fue superior respecto a las del grupo de GC negativo pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa (4% vs 2% con $p=0,195$). La presencia de linfocitos CD3 y CD8 en el estroma también fue mayor en las pacientes con GC positivo pero no mostró diferencias significativas respecto a la pacientes con GC negativo. *Tabla 16*

A.3 Relación entre la expresión de PD-L1 con la afectación del ganglio centinela.

La mediana de expresión de PD-L1 en los infiltrados linfocitarios y en epitelio tumoral (PD-L1_{ic} y PD-L1_t) en los 87 casos evaluados fue 0.5 % y 0% respectivamente tanto en pacientes con GC positivo como negativo, lo cual no mostró diferencias estadísticamente significativas. No se encontró relación entre la expresión de PD-L1 positivo o negativo y el estado del GC. *Tabla 16*

Por tanto, para el objetivo principal, en nuestra serie de pacientes, no se ha encontrado correlación estadística entre los infiltrados linfocitarios y fenotipo de estos infiltrados (CD3 y CD8) en el tumor primario con la afectación del GC. Tampoco la expresión de PD-L1_{ic} y PD-L1_t predice el estado del GC.

No se ha podido establecer un punto de corte que permita discriminar la probabilidad de afectación del ganglio centinela con ninguno de los cinco parámetros estudiados.

Tabla 16. Porcentaje de infiltración de las variables de estudio según el grado del GC

	Variable Ganglio Centinela				p
	POSITIVO (n:52)		NEGATIVO (n:86)		
	% mediana	RI (Q1-Q3)	% mediana	RI (Q1-Q3)	
TILs	4	4 (1%-5%)	2	4 (1%-5%)	0,195
CD3	3,35	3,78 (0,9%-4,68%)	1,2	4,2 (0,5%-4,75%)	0,130
CD8	2,56	3,42 (0,85%-4,27%)	0,95	3,87 (0,47%-4,33%)	0,156
PD-L1 ic	0,5	20 (0%-20%)	0,5	30 (0%-30%)	0,396
PD-L1 tumor	0	5 (0%-5%)	0	3 (0%-3%)	0,173

A.4 Relación entre TILs, CD3, CD8 con variables clínico-patológicas conocidas.

En nuestro estudio las pacientes cuyo tumor era grado II-III, histología ductal, receptor estrogénico negativo y Ki67 $\geq 20\%$ presentaron mayor porcentaje de TILs, CD3 y CD8 con significación estadística ($p < 0,05$). Las pacientes con receptor de progesterona negativo tenían mayor porcentaje de TILs y CD3 comparados con las pacientes con receptor de progesterona positivo con diferencias significativas ($p:0,007$). Sin embargo el infiltrado de CD8 en el estroma no fue diferente entre las pacientes con receptor de progesterona positivo o negativo.

No se encontraron diferencias en TILs, CD3 ni CD8 en relación con la edad, el tamaño tumoral o la presencia de invasión vascular. Las pacientes con sobreexpresión de HER2 + tenían mayor presencia de TILs, CD3 y CD8 pero no se alcanzó la significación estadística. *Tabla 17*

Tabla 17. Porcentaje de infiltración de las variables de estudio según factores clínico-patológicos

		% TILs variable continua					% CD3 variable continua				% CD8 variable continua			
		N (%)	Mediana (rango)	Cuartiles (Q1-Q3)	RI	P	Mediana (rango)	Cuartiles (Q1-Q3)	RI	P	Mediana (rango)	Cuartiles (Q1-Q3)	RI	P
TODOS		138 (100)	2 (0,5-80)	(1-5)	4		1,6 (0,25-64,0)	(0,8-4,75)	3,95		1,4 (0,21-60,8)	(0,7-4,27)	3,57	
EDAD	<50	39	3 (0,5-60)	(1-5)	4		3,05 (0,3-54)	(0,9-4,75)	3,85		1,90 (0,27-48,45)	(0,85-4,45)	3,6	
	≥50	99	2 (0,5-80)	(1-5)	4	0,235	1,4 (0,25-64)	(0,80-4,62)	3,82	0,265	1,12 (0,21-60,8)	(0,57-4,16)	3,59	0,242
HISTOLOGÍA	ductal	108	2,5 (0,5-80)	(1-10)	9		2,25 (0,25-64)	(0,87-8)	7,13		1,80 (0,23-60,8)	(0,75-4,57)	3,82	
	otros	30	1 (0,5-60)	(0,625-2)	1,37	0,007	0,9 (0,30-24)	(0,5-1,9)	1,4	0,015	0,85 (0,21-15,20)	(0,47-1,80)	1,33	0,027
GRADO	I	34	1 (0,5-20)	(0,87-2,00)	1,12		0,92 (0,25-14)	(0,49-1,67)	1,18		0,85 (0,21-12,6)	(0,45-1,53)	1,08	
	II-III	104	3 (0,5-80)	(1-10)	9	0,02	2,7 (0,25-64)	(0,90-8,00)	7,1	0,01	2,28 (0,24-60,8)	(0,82-4,78)	3,96	0,02
GC	Positivo	52	4 (0,5-80)	(1-5)	4		3,35 (0,3-60)	(0,9-4,68)	3,78		2,56 (0,21-45,60)	(0,8-4,27)	3,42	
	Negativo	86	4 (0,5-80)	(1-5)	4	0,195	1,2 (0,25-64)	(0,5-4,75)	4,2	0,13	0,95 (0,23-60,80)	(0,47-4,33)	3,87	0,156
T	≤2cm	111	2 (0,5-80)	(1-5)	4		1,4 (0,25-64)	(0,8-4,5)	3,7		1,26 (0,21-60)	(0,64-4,27)	3,63	
	>2 cm	27	5 (0,5-80)	(1-10)	9	0,124	4 (0,45-56)	(0,9-9)	8,1	0,070	2,8 (0,43-45,60)	(0,85-4,80)	3,95	0,276
RE	Positivo	112	1,5 (0,5-80)	(1-5)	4		0,97 (0,25-64)	(0,72-4,5)	3,78		0,92 (0,21-9,71)	(0,51-3,80)	3,29	
	Negativo	26	20 (0,5-80)	(2-45)	44	<0,001	11 (0,45-60)	(1,82-21)	19,18	0,001	5,2 (0,36-48,45)	(1,3-13,25)	11,95	0,001
RP	Positivo	97	2 (0,5-80)	(1-5)	4		1,4 (0,25-64)	(0,8-4,5)	3,7		1,12 (0,21-60,8)	(0,64-3,80)	3,16	
	Negativo	41	5 (0,5-80)	(1-30)	29	0,007	4 (0,45-60)	(0,85-16)	15,15	0,007	2,56 (0,36-48,45)	(0,76-10,50)	9,74	0,076
HER2	Positivo	19	3 (0,5-80)	(1-20)	19		2,7 (0,48-60)	(0,8-16)	15,2		2,56 (0,45-40,38)	(0,76-8,80)	8,04	
	Negativo	118*	2 (0,5-80)	(1-5)	4	0,115	1,5 (0,25-64)	(0,8-4,5)	3,7	0,093	1,26 (0,21-60,8)	(4,05-10,24)	6,19	0,076
Ki67	<20	67	1 (0,5-20)	(1-5)	4		0,95 (0,25-14)	(0,5-3,87)	3,37		0,90 (0,21-12,60)	(0,45-3,28)	2,83	
	≥20	71	5 (0,5-80)	(1-20)	19	<0,001	4,25 (0,4-64)	(0,9-15,5)	14,6	<0,001	3,70 (0,36-60,8)	(0,85-8,73)	7,88	<0,001
INVASIÓN VASCULAR	Sí	32	4 (0,5-60)	(1-5)	4		4 (0,3-54)	(0,9-4,79)	3,85		2,8 (0,27-43,20)	(0,85-4,41)	3,56	
	No	106	2 (0,5-80)	(1-5)	4	0,271	1,4 (0,25-64)	(0,77-4,75)	3,98	0,212	1,19 (0,21-60,8)	(0,60-4,27)	3,67	0,193
FENOTIPO	Luminal	112	1,5 (0,5-80)	(1-5)	4		0,97 (0,25-64)	(0,72-4,50)	3,78		0,92 (0,21-60,8)	(0,51-3,80)	3,29	
	HER2	9	20 (1-80)	(6,5-50)	43,5		14 (0,95-60)	(5,35-29)	23,65		8,4 (0,9-37,8)	(3,6-18,3)	14,7	
	TN	17	10 (0,5-80)	(1,5-50)	48,5	0,001	5 (0,45-56)	(1,27-22)	20,73	<0,001	2 (0,36-48,45)	(0,83-13,6)	12,7	0,001

* 1 valor perdido



A.5 Relación de PD-L1 con variables clínico-patológicas conocidas.

Las pacientes con tumores grado II-III, Ki67 ≥ 20 , receptor estrogénico y progesterona negativo demostraron expresar mayor porcentaje de PD-L1_{ic} y PD-L1_t con diferencias estadísticamente significativas.

Los tumores > 2 cm expresaban más PD-L1_{ic} que los tumores ≤ 2 cm (2,5% vs 0,5%, p:0,009). No hubo diferencias según el tamaño tumoral en la expresión de PD-L1_t.

Tabla 18

Tabla 18. Porcentaje de expresión de PD-L1 según factores clínico-patológicos

		% PD-L1 Células Inmunes (PD-L1 _{ic})					% PD-L1 tumor (PD-L1 _t)			
		N (%)	Mediana (rango)	Cuartiles (Q1-Q3)	RI	P	Mediana (rango)	Cuartiles (Q1-Q3)	RI	P
	Todos	87 (63)	0,5 (0-30)	(0,5-3)	2,5		0 (0-5)	(0-5)	4	
EDAD	<50	27	0,5 (0-10)	(0,5-3)	2,5		0 (0-1)	(0-0,5)	0,5	
	≥ 50	60	0,5 (0-30)	(0,5-2,75)	2,25	0,491	0 (0-5)	(0-0,5)	0,5	0,387
HISTOLOGÍA	Ductal	74	0,5 (0-30)	(0,5-3)	2,5		0 (0-5)	(0-0,5)	0,5	
	otros	13	0,5 (0-5)	(0,5-1,75)	1,25	0,217	0 (0-0,5)	(0-0)	0	0,136
GRADO	I	14	0,5 (0-5)	(0,37-0,5)	0,13		9 (0-0)	(0-0)	0	
	II-III	73	0,5 (0-30)	(0,5-3)	2,5	0,023	0 (0-0,79)	(0-0,5)	0,5	0,006
GC	Positivo	34*	0,5 (0-20)	(0,5-5)	4,5		0 (0-5)	(0-0,5)	0,5	
	Negativo	49**	0,5 (0-30)	(0,5-2)	1,5	0,396	0 (0-3)	(0-0,5)	0,5	0,173
T	≤ 2 cm	65	0,5 (0-30)	(0,5-1)	0,5		0 (0-5)	(0-0,37)	0,37	
	>2 cm	22	2,5 (0-20)	(0,5-6,25)	5,75	0,009	0,5 (0-1)	(0-0,5)	0,5	0,27
RE	Positivo	60	0,5 (0-20)	(0,5-0,87)	0,37		0 (0-3)	(0-0)	0	
	Negativo	27	3 (0-30)	(0,5-10)	9,5	<0,001	0,5 (0-5)	(0-1)	1	<0,001
RP	Positivo	55	0,5 (0-20)	(0,5-1)	0,5		0 (0-3)	(0-0)	0	
	Negativo	32	2 (0-30)	(0,5-8,75)	8,25	<0,001	0,5 (0-5)	(0-0,5)	0,5	<0,001
HER2	Positivo	14	1 (0-30)	(0,5-4)	3,5		0,5 (0-5)	(0-0,5)	0,5	
	Negativo	73	0,5 (0-30)	(0,5-2,5)	2	0,292	0 (0-3)	(0-0,5)	0,5	0,13
Ki67	<20	32	0,5 (0-5)	(0,5-0,5)	0		0 (0-0,5)	(0-0)	0	
	≥ 20	56	1 (0-30)	(0,5-5)	4,5	0,001	0,25 (0-5)	(0-0,5)	0,5	<0,001
INVASIÓN VASCULAR	Sí	22	0,5 (0-30)	(0,5-1,5)	1		0 (0-5)	(0-0,5)	0,5	
	No	65	0,5 (0-30)	(0,5-3)	2,5	0,543	0 (0-2)	(0-0,5)	0,5	0,798
FENOTIPO	Luminal	61	0,5 (0-20)	(0,5-0,87)	0,37		0 (0-0)	(0-0)	0	
	HER2	9	2 (0-20)	(0,5-12,5)	12		0,5 (0-5)	(0-1,75)	1,75	
	TN	17	3,5 (0,5-30)	(0,87-10)	9,13	<0,001	0,5 (0-2)	(0-1)	1	<0,001

*2 valores perdidos.

** 2 valores perdidos

A.6 Relación entre TILs, CD3, CD8 con diferentes fenotipos de cáncer de mama.

El fenotipo HER2 fue el subgrupo que presentó mayor porcentaje de TILs (20%, RI 6,5-50), CD3 (14%, RI 5,35-29) y CD8 (8,4%, RI 3,6-18,3) seguido del fenotipo TN (TILs 10% RI 1,5-50; CD3 5% RI 1,2-22; CD8 2%, RI 0,8-13,6) y Luminal (TILs 1,5% RI 1-5; CD3 0,97% RI 0,7-4,5; CD8 0,92%, RI 0,5-3,8) con diferencias significativas.

Tabla 17

A.7 Relación entre PD-L1 con los diferentes fenotipos de cáncer de mama.

La expresión de PD-L1_{ic} fue mayor en fenotipo TN (PD-L1 ic 3,5%, RI 0,5-30) seguido de fenotipo HER2 (PD-L1 ic 2%, RI 0-20) y mínima expresión en luminal. La expresión de PD-L1_t fue mayor para el fenotipo HER2 (PD-L1 t 0,5%, RI 0-1,75) seguido de TN (0,5%, RI 0-1). El fenotipo luminal no presentó expresión de PD-L1_t. Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas.

Tabla 18

A.8 Relación entre TILs, CD3, CD8 en fenotipos y la afectación de ganglio centinela.

La mediana de TILs, CD3 y CD8 no permitió predecir la afectación del GC analizando cada fenotipo tumoral por separado. Se objetivó una mayor infiltración inmune entre las pacientes HER2 y TN con ganglio centinela positivo pero sin alcanzar la significación estadística. *Tabla 19*

A.9 Relación entre la expresión de PD-L1 en fenotipos y la afectación de ganglio centinela.

La expresión de PD-L1_{ic} y PD-L1_t fue mayor en las pacientes TN y HER2 con ganglio centinela positivo pero tampoco alcanzó la significación estadística. *Tabla 20*

Tabla 19. Porcentaje de infiltración de las variables de estudio según su fenotipo y el estado del GC

		Ganglio Centinela	% TILs variable continua				% CD3 estroma				% CD8 estroma				
			N	Mediana (rango)	Cuartil (Q1-Q3)	RI	P	Mediana (rango)	Cuartil (Q1-Q3)	RI	p	Mediana (rango)	Cuartil (Q1-Q3)	RI	p
FENOTIPO	LUMINAL	Afecto	43	2 (0,5-60)	(1-5)	4		1,9 (0,3-48)	(0,9-4,5)	3,6		1,8 (9,21-45,6)	(0,76-4,05)	3,29	
		No afecto	69	1 (0,5-80)	(1-5)	4	0,161	0,95 (0,25-64)	(0,48-4)	3,52	0,107	0,90 (0,23-60,8)	(0,45-3,8)	3,35	0,168
	HER2	Afecto	6	20 (1-80)	(2,5-50)	47,5		15 (0,95-60)	(2,26-27)	24,74		6,8 (0,9-24)	(2,14-15,45)	13,31	
		No Afecto	3	20 (10-60)	(10-60)	50	0,793	14 (8-42)	(8-42)	34	0,896	8,4 (5,6-37,8)	(5,6-37,8)	32,2	0,439
	TRIPLE NEGATIVO	Afecto	3	20 (3-20)	(3-20)	17		8 (2,10-16)	(2,1-16)	13,9		2 (1,79-15,20)	(1,78-15,2)	13,42	
		No Afecto	14	6,5 (0,5-80)	(1-60)	59	0,751	3,85 (0,45-56)	(0,91-26)	25,09	0,850	2,1 (0,36-48,45)	(0,69-12,8)	12,11	0,571

Tabla 20. Porcentaje de expresión de PD-L1 por fenotipos según el estado del GC

		Ganglio Centinela	% PD-L1 _{ic}				% PD-L1 _t				
			N	Mediana (rango)	Cuartil (Q1-Q3)	RI	P	Mediana (rango)	Cuartil (Q1-Q3)	RI	p
FENOTIPO	LUMINAL	Afecto	25	0,5 (0,5-5)	(0,5-2)	1,5		0 (0-0,5)	(0-0)	0	
		No afecto	32	0,5 (0,5-20)	(0,5-0,5)	0	0,273	0 (0-3)	(0-0,25)	0,25	0,242
	HER2	Afecto	6	2,5 (0-20)	(0,75-8,75)	8		0,5 (0-0,5)	(0,37-1,62)	1,25	
		No Afecto	3	0,5 (0,5-30)	(0,5-30)	29,5	0,795	0 (0-3)	(0-3)	3	0,410
	TRIPLE NEGATIVO	Afecto	3	10 (10-10)	(10)	0		1 (0,5-1)	(0,5-1)	0,5	
		No Afecto	14	2,5 (0,5-30)	(0,5-6,25)	5,75	0,054	0,5 (0-2)	(0-0,62)	0,62	0,127

A.10 Relación de la infiltración por TILs, linfocitos CD3 y linfocitos CD8 en el tumor primario y la supervivencia libre de enfermedad.

Se analizó el porcentaje de infiltración de TILs, CD3 y CD8 como variable continua y su relación con la SLE de las pacientes incluidas en el estudio. No se apreció relación significativa entre ambas variables. *Tabla 21*

Tabla 21. Hazard ratio de las variables de estudio con la SLE

	HR	IC 95%	p
TILs	0,97	0,92-1,02	0,352
CD3	0,96	0,89-1,04	0,363
CD8	0,96	0,87-1,05	0,392

A.11 Relación entre la expresión de PD-L1 en el tumor primario y la supervivencia libre de enfermedad.

Tampoco se observó ninguna relación entre la expresión de PD-L1_ic y PD-L1_t con la SLE entre las mujeres analizadas. *Tabla 22*

Tabla 22. Hazard ratio de PD-L1 con la SLE

	HR	IC 95%	p
PD-L1_ic	0,92	0,73-1,15	0,484
PD-L1_t	0,09	0,002-4,408	0,218

A.12 Supervivencia libre de enfermedad según estado del GC

En nuestro estudio se demuestra que la afectación metastásica ganglionar axilar es factor pronóstico principal en la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con cáncer de mama (78,9 meses vs 71,7 meses, $p:0,036$). *Figura 18*

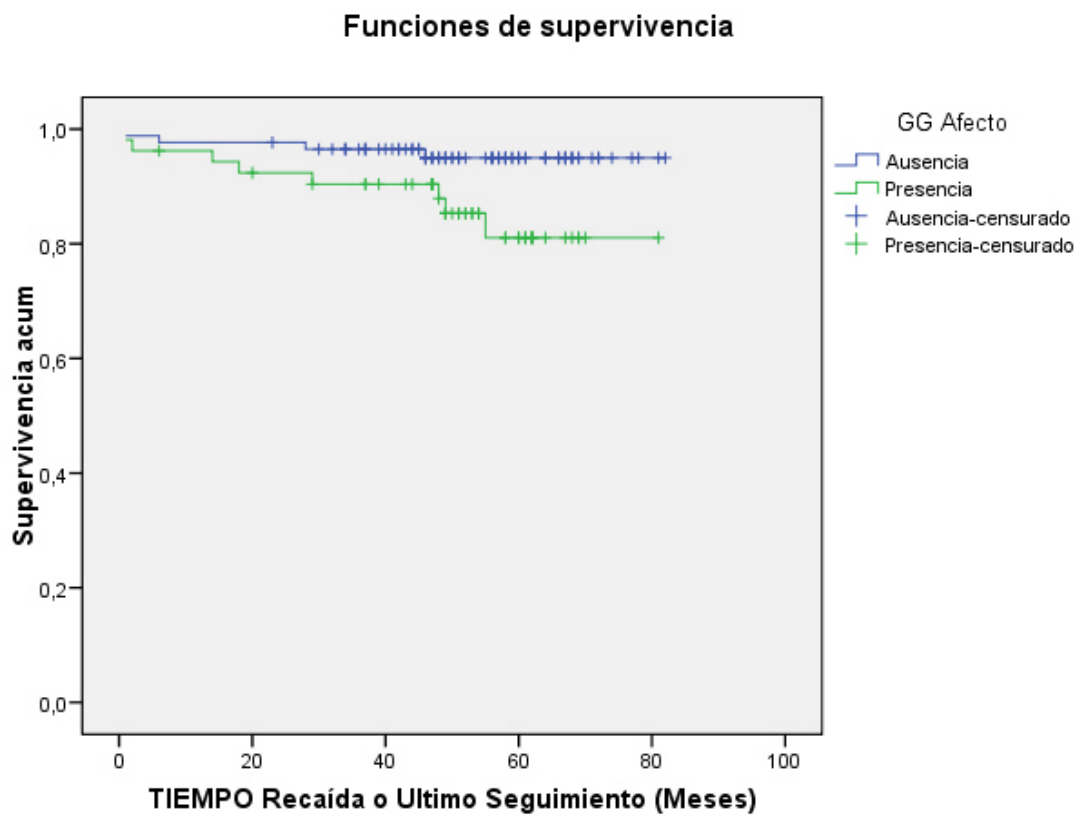


Figura 18. Supervivencia libre de enfermedad según el estado del GC



6. DISCUSIÓN

Es un objetivo fundamental en la lucha contra el cáncer la identificación de biomarcadores pronósticos y predictivos que ayuden a diferenciar las neoplasias que tienen un alto riesgo de recaída frente a otras con menor probabilidad de hacerlo. En cáncer de mama temprano, este objetivo tiene una especial importancia. La afectación ganglionar es el principal factor pronóstico conocido hasta ahora que además condiciona el tratamiento complementario que va a recibir la paciente. La elevada morbilidad del vaciamiento axilar y el conocimiento biológico del cáncer de mama demostraron que un abordaje quirúrgico muy agresivo no era el procedimiento más adecuado por lo que esta técnica acabó siendo relegada. Los estudios clínicos aleatorizados han permitido que la cirugía sea cada vez menos agresiva y tratamientos complementarios como quimioterapia, hormonoterapia, fármacos biológicos y radioterapia consigan mayor tasa de curación con menor morbilidad. La estadificación de la afectación ganglionar axilar mediante la técnica de biopsia selectiva del ganglio centinela se ha convertido en estándar en pacientes con axila clínicamente negativa. Además, los resultados de los estudios Z0011, IBCSG 23-01, AATRM y AMAROS ayudaron a cambiar la práctica clínica ahorrando la necesidad de hacer vaciamiento axilar en las pacientes cuyo GC era pN1mi y en caso de estar afecto con pN macroscópico añadir radioterapia a estas pacientes(33)(35)(36). Los resultados fueron comparables a los alcanzados con LA pero con menor morbilidad.

Por ello predecir de forma precoz el estado del GC evitando cualquier procedimiento quirúrgico axilar puede resultar en una mejora muy significativa en el manejo de las pacientes.

El desarrollo y progresión del cáncer de mama está condicionado por diferentes factores, entre ellos, aquellos que son dependientes del microambiente tumoral tales como el estroma y la celularidad inmune (102). Se ha demostrado en diferentes tumores que el sistema inmune influye en los mecanismos de progresión tumoral. En

el cáncer de mama los infiltrados linfocitarios presentes en el tumor primario se han relacionado con factores de buen pronóstico (103). Por ello en nuestro estudio pretendíamos demostrar que los infiltrados linfocitarios en el tumor pueden mediar en la progresión tumoral reduciendo la probabilidad de afectación del ganglio centinela. También se identificó el fenotipo de estos infiltrados mediante el uso de anticuerpos para linfocitos T CD3 y CD8. Se añadió el estudio de la expresión de PD-L1 dado su papel controvertido en cuanto a su función pronóstica en cáncer de mama (104). Si se confirmara que estos factores son predictivos de afectación ganglionar se podría obviar la realización del GC.

El estudio se realizó en 138 mujeres sometidas de BSGC. El objetivo principal pretendía encontrar un perfil inmunológico que fuera predictivo de afectación del GC basado en determinar en el tumor primario los TILs, linfocitos T CD3, linfocitos T CD8 y expresión de PD-L1.

La mediana de TILs objetivado en toda la cohorte de estudio fue del 2% (RI, 1%-5%). La densidad de linfocitos T CD3 y CD8 presentes en el estroma tumoral resultó en una mediana del 1,6% (RI 0,8%-4,75%) y 1,4% (RI 0,7%-4,27%) respectivamente. La mediana de expresión de PD-L1 en las muestras de cáncer de mama fue negativa (<1%).

Objetivo principal

Al correlacionar los resultados con la afectación del ganglio centinela observamos que las pacientes con GC afecto tenían más TILs (4% vs 2%, p:0,195), linfocitos T CD3 (3,3% vs 1,2%, p:0,130) y CD8 (2,5% vs 0,9%, p:0,156) que las pacientes con GC negativo pero estas diferencias no fueron significativas. La mediana de expresión de PD-L1 fue negativa (<1%) independientemente del estado del GC.

Nuestro estudio aporta información novedosa tanto por el objetivo principal como por las variables que estudiamos. Sólo encontramos en la literatura un grupo de

investigadores con un objetivo similar al nuestro pero con el uso de otros biomarcadores. Bordea et al estudiaron prospectivamente en 93 pacientes con cáncer de mama temprano candidatas a BSGC diferentes parámetros relacionados con la respuesta inmune celular tanto en tejido como en sangre: transformación blástica de células mononucleares (BLT), inmunoglobulinas (Ig2) e interleukina 2 (IL-2). Esto fue correlacionado con el estado del ganglio centinela y factores clínico-patológicos de proliferación y crecimiento tumoral. Concluyeron que tanto los infiltrados linfocitarios peritumorales como el estado disfuncionante de los linfocitos T helper (determinado por el descenso de IL-2 medido en sangre periférica) se correlacionaba con la positividad en GC (105).

El resultado de nuestro objetivo principal ha sido negativo. Esto puede estar condicionado por diferentes factores que a su vez son limitaciones relacionadas con nuestro trabajo.

1º Menor porcentaje de infiltrados linfocitarios de lo referido en la literatura:

La mediana de TILs objetivado en nuestro trabajo resulta inferior al descrito en la literatura. Obtuvimos una mediana de TILs 2% (RI, 1%-5%). Sólo un 25% de nuestras pacientes presentaban TILs superior al 5%. En la literatura destacan dos trabajos que evalúan el papel de los TILs en el cáncer de mama en el contexto de tratamiento adyuvante. Loi et al obtuvieron una mediana de TILs del 10% (RI 7,5%-20%) tras evaluar 2009 muestras de entre las 2887 pacientes que participaron en el big02-98 y en el trabajo de Dieci et al, la mediana de TILs fue 10% (RI 5%-20%) sobre una muestra de 781 pacientes. A pesar de las diferencias en el tamaño muestral en ninguno de estos estudios se objetivó relación entre los TILs y el estado ganglionar axilar. En el trabajo de Loi, todas las pacientes del big02-98 tenían ganglios positivos y a pesar de ello, no hubo relación entre el número de ganglios afectados ($n^{\circ}1-3$ vs ≥ 4) y los TILs (106). En el trabajo de Dieci et al, las pacientes con ganglios negativos eran el

57% de la muestra y tampoco pudieron demostrar relación entre TILs y la afectación axilar (68).

2ª Metodología de lectura e interpretación de los infiltrados linfocitarios:

En nuestro estudio se identificaron sólo los TIL del estroma tumoral. En los dos trabajos, mencionados anteriormente, se hicieron lecturas de TILs de los compartimentos estromal e intratumoral. Sin embargo los datos que se han mostrado son los referidos al compartimento estromal para poderlos comparar con los nuestros. En realidad ambos tipos de TILs, tanto los del estroma como los intratumorales, son considerados como verdaderos infiltrados linfocitarios capaces de moverse dentro del microambiente tumoral. La diferencia entre uno u otro no deja de ser algo artificial relacionado con el momento en el que se está estudiando este parámetro en una laminilla de cristal. La hipótesis en la que los linfocitos que interactúan directamente con las células tumorales (TILs intratumorales), pudiera ser más relevante que el resto, no se ha podido demostrar. Es por ello que la mayoría de los estudios consideran que el infiltrado linfocitario en el estroma tumoral es un parámetro superior y más reproducible que el intratumoral debido a que éste se presenta en menos casos y es más difícil identificarlo en una laminilla de H&E. En nuestro trabajo la cuantificación de los TILs se ha realizado como una variable continua, en forma de porcentaje, para permitir realizar análisis estadísticos fiables siguiendo las recomendaciones del “International TILs Working Group 2014” (85).

3º Fenotipado de los infiltrados linfocitarios y su interpretación:

Son pocos los estudios que diferencian las subpoblaciones que componen el infiltrado linfocitario en el estroma de pacientes con cáncer de mama temprano. La información disponible sobre qué subgrupo de células T es más determinante en los resultados clínicos de cáncer de mama es desconocido. Los linfocitos CD3 y CD8 en el tumor son

un reflejo de la respuesta inmune antitumoral. La presencia de subgrupos específicos de células inmunitarias está relacionada con los resultados clínicos de pacientes con diferentes tumores sólidos (107). Por ello planteamos usar una inmunohistoquímica para estudiar los linfocitos T CD3 y CD8 en el estroma tumoral de nuestra serie. La densidad de linfocitos T CD3 y CD8 presentes en el estroma tumoral de las pacientes resultó en una mediana del 1,6% (RI 0,8%-4,75%) y 1,4% (RI 0,7%-4,27%) respectivamente. No se objetivó relación alguna con el estado del ganglio centinela aunque las pacientes con ganglio centinela positivo tenían más CD3 y CD8 (linfocitos T CD3: 3,35% GC positivo vs 1,2% GC negativo p:0,130 y linfocitos T CD8: 2,56% GC positivo vs 0,95% GC negativo, p:0,156). Nuestro trabajo es el segundo descrito en la literatura que aporta estos datos.

Rathore et al publicaron dos trabajos, uno en donde evaluaron en 127 pacientes el papel pronóstico de los linfocitos T CD3+ y en otro estudiaron de forma conjunta CD3, CD4 y CD8 en 150 pacientes con cáncer de mama. En ambos estudios, los tumores con predominio de CD3 intratumorales y en el estroma (> 25 células x 40 cga) tenían más riesgo de afectación ganglionar (p:0,006 y p:0,026 respectivamente) (108)(109).

Otros dos estudios importantes con datos referentes al subtipo de infiltrado linfocitario en cáncer de mama son los siguientes. West et al. estudiaron la presencia de CD3, mediante inmunohistoquímica usando tissue microarray, en 255 pacientes de cáncer de mama. Usaron la mediana del número total de linfocitos CD3 intratumoral (igual a 6) como cut-off para definir alto o bajo nivel de CD3. En sus resultados no encontraron relación entre los linfocitos CD3 y la afectación ganglionar (87). Mahmoud et al, realizaron su estudio sobre 1334 pacientes. Determinaron CD8 mediante inmunohistoquímica en tissue microarray. Al igual que en estudio anterior, los resultados se expresaron como el número absoluto de linfocitos T CD8 visualizados en el compartimento intratumoral, estromal adyacente y a distancia. Establecieron un cut-

off en + si había al menos dos células CD8. La mediana del número total de CD8 fue 11 (RI 2-34). En sus resultados destacaron que la infiltración de linfocitos T CD8 era un factor independiente de buen pronóstico relacionándose con una mejor supervivencia específica por cáncer de mama (HR 0,58, $p < 0,002$) (110). A pesar de que las pacientes estaban estratificadas por el estado ganglionar no se hace mención al valor predictivo de la infiltración de CD8 con el estado ganglionar. Los estudios de Liu et al. y Ali et al, sobre 3992 y 12.439 pacientes, muestran un resultado similar; los infiltrados linfocitarios con predominio de linfocitos T CD8 tienen un efecto pronóstico positivo en la supervivencia específica por cáncer de mama RE negativo (HR 0,48, $p < 0,001$ y HR 0,54, $p < 0,001$ respectivamente) y confirmando así que la respuesta inmune adaptativa tiene un papel crucial en reducir la recurrencia del tumor (111)(112). Aunque generalmente la respuesta inmune antitumoral se centra en los ganglios linfáticos de drenaje es posible que los resultados anteriormente expuestos sugieran que también podría iniciarse en el tumor primario (110).

Nuestro trabajo, a diferencia de los estudios antes mencionados, resulta novedoso porque la identificación de los linfocitos CD3 y CD8 se ha realizado siguiendo las recientes recomendaciones del “International TILs Working Group” (85). Por tanto la comparación e interpretación de nuestros resultados con la del resto de los estudios es difícil debido a las diferencias en la metodología de lectura, la variabilidad en el corte usado para definir altos o bajos niveles de CD3 y CD8 así como la forma de cuantificarlos. Otro punto de controversia que marca la diferencia entre los distintos estudios es dónde localizar a los linfocitos (intratumoral, estroma, peritumoral...) Según el estudio de Liu et al. los linfocitos CD8 intratumorales son un reflejo del compartimento estromal lo cual facilitaría la reproducibilidad de los resultados en la práctica clínica (111).

4º Establecimiento de cutoff en las variables de estudio.

La valoración de los TILs como una variable no continua también puede ser un factor de confusión a la hora de interpretar los diferentes estudios. En los estudios de Loi, Adams, Dieci et al. establecen el término de “cáncer de mama de predominio linfocítico” haciendo referencia a un tipo de cáncer de mama que tiene más linfocitos que células tumorales. Éste es definido como la presencia de TILs estromales $\geq 50\%$. Hasta ahora este subtipo tiene una representación entre 5-10% en los estudios de TILs. Este subgrupo parece mostrar mejores tasas de supervivencia global pero su baja frecuencia dificulta extraer conclusiones. Por tanto es difícil saber si en futuros estudios el cutoff de TILs $\geq 50\%$ será útil debido a la pequeña proporción de pacientes que identifica (106) (113) (68). En nuestra serie, 9,4% (n:13) de las pacientes eran “cáncer de mama de predominio linfocítico”.

En el apartado anterior ya hemos comentado que los trabajos sobre CD3 y CD8 también establecieron diferentes cutoff en relación al número absoluto de linfocitos. Esto les permitía definir subgrupos “positivos/negativos” o “alto/bajos”(111)(87). En nuestro estudio, siguiendo con las recomendaciones del Salgado et al se determinó CD3 y CD8 como variable continua en forma de porcentaje (85). A pesar de ello no se obtuvo relación significativa con el objetivo principal.

Objetivos secundarios.

En el análisis de nuestra serie incluimos también la relación de los TILs, linfocitos T CD3 y linfocitos T CD8, con las características clínico patológicas.

Las pacientes con tumores grado II-III, histología ductal, receptor estrogénico negativo y Ki67 $\geq 20\%$ presentaron mayor porcentaje de TILs, CD3 y CD8 con significación estadística. No se encontraron diferencias de TILs, CD3 o CD8 en relación con la edad, el tamaño tumoral o la presencia de invasión vascular. Las pacientes con

fenotipo HER2 y TN fueron los subgrupos que presentaron significativamente mayor porcentaje de TILs, CD3 y CD8. La mediana de TILs, CD3 y CD8 por fenotipos no permitió predecir la afectación del GC. Se objetivó una mayor infiltración inmune entre las pacientes HER2 y TN con ganglio centinela positivo pero sin alcanzar la significación estadística.

Estos resultados son muy similares a los encontrados en trabajos anteriormente referidos. Loi et al. encontraron en su muestra de 2009 pacientes una relación directa entre los TILs intratumorales y estromales con la histología ductal ($p < 0,001$), G3 ($p < 0,001$), RH negativo ($p < 0,001$) y Ki67 elevado ($p < 0,001$) (106). Destacan el predominio de TILs en los fenotipos TN (mediana 20%, RI 12,5-30%) y HER2 (mediana 15%, RI 10%-30%) sobre el fenotipo luminal (mediana 10%, RI 7,5%-15%) $p < 0,001$ (106). Estos valores son muy similares a los de nuestro trabajo excepto en el fenotipo luminal donde la mediana de infiltración era 1,5% (RI 0,5%-80%). Esto puede ser debido al predominio de pacientes con fenotipo luminal presente en nuestra serie (81,2%) ya que no se incluyeron pacientes tratadas con quimioterapia preoperatoria. En otro trabajo de Loi et al. con pacientes del estudio FinHER obtuvieron resultados parecidos. Se diferencia del anterior en que categorizaron la muestra en "high TILs" si objetivaban $\geq 50\%$ de TILs o "low TILs" si objetivaban $< 50\%$ de TILs. Evidenciaron que "high TILs" se asociaba con RE- ($p < 0,001$), HER2+ ($p < 0,001$), G3 ($p < 0,001$), mayor afectación ganglionar ($p < 0,001$), histología ductal ($p < 0,001$), tumores grandes ($p < 0,001$) y Ki67 elevado ($p < 0,001$) (79). También los fenotipos HER2 y TN presentaron más infiltrados linfocitarios ($p < 0,001$) (79).

Respecto al estudio de linfocitos CD3 y CD8 con las variables clínicas antes descritas, nuestros resultados también son concordantes con los de otros trabajos. En el estudio de West et al. obtuvieron que altos niveles de CD3+ (definido por ≥ 6 linfocitos CD3+) se asociaba con RP negativo ($p: 0,01$), con G3 ($p: 0,001$) y HER2 negativo ($p: 0,018$)

(114). Mahmoud et al encontraron que la presencia de linfocitos T CD8 era más frecuente en pacientes con edades jóvenes, G3, RH-, HER2+ y fenotipo basal ($p < 0,001$) (110). Liu et al. también obtuvieron una asociación significativa entre la presencia de linfocitos T CD8 con las pacientes jóvenes (<40 años), G3, histología medular, RE-, HER2+, fenotipo HER2 y TN ($p < 0,001$) (111).

Los estudios de TILs realizados en pacientes con cáncer de mama localizado en el ámbito del tratamiento adyuvante no han demostrado tener efectos en la SLE o SG en el global de las pacientes pero sí en algunos fenotipos. En el trabajo de Loi et al, con las pacientes del Big02-98, obtuvieron que una mayor presencia de TILs (definido por incrementos del 10%) se traduce una mejor SLE y SG en las pacientes con fenotipo TN (HR 0,85, $p:0,02$ y HR 0:83, $p:0,02$ respectivamente) (106). En el estudio de Adams et al, con pacientes TN de los estudios E2197 y E1199, también evidencian que los TILs (incrementos del 10%) se asocian a una mejor SLE y SG (HR 0,84, $p:0,005$ y HR: 0,79, $p: 0,003$)(113). Entre las pacientes del estudio FinHER, Loi et al, también encontraron una mejor SLE para aquéllas con fenotipo TN (HR 0,77, $p: 0,02$) y HER2+ tratadas con trastuzumab (HR 0,82, $p:0,025$) (79). Entre las pacientes con “cáncer de mama de predominio linfocítico”, el único estudio que objetiva una mejor SLE y SG es entre las pacientes del Big02-98 (HR 0,30 $p:0,018$ y HR 0,29 $p:0,36$ respectivamente)(106). En el resto de los estudios se objetivó que se trata de una población con mejores tasas de supervivencia pero sin alcanzar la significación estadística(68)(113). En nuestro trabajo, no hemos detectado relación con la SLE para ninguna de las variables de estudio; esto puede ser debido a que en nuestra cohorte los subtipos que más infiltrados muestran representan sólo el 19% ($n:26$) de la muestra (mediana TILs para HER2: 20% y TN:10%). La baja proporción de estas pacientes y el escaso número de recaídas observadas dificulta encontrar diferencias



en SLE. Debido al bajo número de eventos no se ha realizado análisis de supervivencia global.

Para poder explicar la relación entre los TILs con la ausencia de receptores hormonales y los mejores resultados de supervivencia para las pacientes triple negativo, la hipótesis de la inmunovigilancia sugiere que este cáncer de mama pobremente diferenciado podría tener variantes más antigénicas que pudieran estimular con fuerza la respuesta inmune antitumoral. Sin embargo, aunque esta respuesta pudiera no ser capaz de inducir la regresión del tumor, se piensa que la memoria adaptativa generada puede jugar un papel importante en prevenir la recurrencia después de la cirugía. Este hecho está apoyado en estudios de pacientes inmunodeprimidos después de un trasplante de órgano sólido, los cuales no experimentan un aumento de la incidencia de cáncer de mama primario (115). Esto es consistente con la evidencia sobre el papel del sistema inmune en controlar el proceso metastásico en cáncer de mama.

Pero el aumento de los TILs no siempre se asocia con mejor pronóstico. Hay evidencia de que los linfocitos CD4+ pueden cambiar su fenotipo de efector a supresor durante la progresión del cáncer. La conversión de células efectoras a supresoras puede inducir una reducción sustancial del nivel de expresión antigénica, resultando en la persistencia tumoral que finalmente lleva a la tolerancia tumoral. Este papel regulatorio negativo de los infiltrados linfocitarios con predominio de CD4 tiene que distinguirse del papel convencional de los infiltrados con linfocitos CD4 activados (116).

Huang et al estudiaron la población linfocitos T CD4 y CD8 en 81 pacientes con cáncer de mama mediante inmunohistoquímica y lo relacionaron con factores pronósticos y resultados clínicos. Una mayor infiltración por linfocitos T CD4 se asoció con estadio avanzado, tamaño tumoral, afectación ganglionar y sobreexpresión de HER2 y



negativamente para la supervivencia libre de recurrencia (SLR). La infiltración por linfocitos T CD8+ también se asoció con estadio avanzado pero con una relación positiva en SLR y supervivencia global (SG) (117). Sugieren que un biomarcador pronóstico en cáncer de mama podría ser la ratio CD4/CD8, siendo los linfocitos T CD8 la población celular efectora y más determinante de los resultados clínicos de las pacientes lo cual es acorde con la mayoría de los estudios publicados en la literatura.

Otro grupo de trabajo de la Universidad de Karolinska estudió distintas poblaciones de linfocitos T (CD3, CD8, FOXP3 y cadena zeta-CD3) presentes en el tumor primario de pacientes con cáncer de mama según sus fenotipos. Realizaron un score basado en las densidades de CD8 y CD3. El resultado de este score permitió separar los distintos fenotipos ($p < 0,001$). Ellos concluyeron que ningún marcador específico de linfocitos T tiene una capacidad superior para encontrar diferencias entre los fenotipos moleculares siendo la infiltración linfocitaria global, más que la de un subtipo específico, lo que diferencia los distintos fenotipos moleculares de cáncer de mama (118). Para poder explicar por qué difiere el porcentaje de TILs según el fenotipo de cáncer de mama y cómo se asocia con el pronóstico se podría asumir que la infiltración inmune refleja la biología de cada tumor. La expresión génica diferencial en la cual se basan los subtipos moleculares puede causar diferencias en la vascularización, densidad de vasos linfáticos, antigenicidad o liberación de citoquinas. Se sabe que una mayor densidad de vénulas endoteliales se asocia con infiltración linfocitaria y esto a su vez se corresponde con un pronóstico más favorable en cáncer de mama (119). La respuesta de la célula T citotóxica es mayor cuando es dirigida frente a epítomos mutados lo cual a su vez se asocia a mejor supervivencia (120). Estas diferencias pueden explicar por qué los fenotipos moleculares en el cáncer de mama exhiben densidades de células T distintas.



No se ha podido demostrar en nuestro trabajo relación entre supervivencia (SLE) con la infiltración linfocitaria en el estroma tumoral, ni sus distintas poblaciones de células T CD3 o CD8. Sin embargo, los estudios de TILs ponen de manifiesto que el cáncer de mama es una enfermedad donde el sistema inmune está implicado en los mecanismos de control y progresión tumoral. El subtipo triple negativo, y tal vez el HER2, son los grupos que más beneficio obtienen de esta respuesta inmune endógena. Poder identificar la celularidad que compone el ambiente inmunológico tumoral podría mejorar la estratificación pronóstica del cáncer de mama e incluso modificar este ambiente inmune para mejorar el pronóstico de aquellos tumores que no contienen TIL. En cáncer de mama triple negativo, la combinación de quimioterapia convencional con inhibidores de los puntos de control inmune podría mejorar los resultados del tratamiento. Para las pacientes con escasos infiltrados linfocitarios, el uso de vacunas y/o el uso inhibidores de los puntos de control inmune podría resultar en un beneficio clínico.

Expresión de PD-L1

Debido al papel crítico que tienen los linfocitos T en el sistema inmune humano orquestando la respuesta inmunológica, el receptor PD-1 contribuye a la tolerancia inmune de los antígenos propios a través de los linfocitos T periféricos manteniéndolos en un estado de inhibición (121). Su ligando, PD-L1, está expresado en las células inmunes, tejido no linfoide y también en diferentes tumores. En cáncer de mama definir el papel de la vía de señalización PD1-PDL1 es de vital importancia.

En relación a otros estudios, nuestro trabajo aporta como novedad el estudio de la expresión de PD-L1 en cáncer de mama diferenciando su expresión entre la celularidad inmune del estroma y del epitelio tumoral.

El análisis de expresión de PD-L1 se realizó como una variable continua y categorizada. La mediana de PD-L1 fue <1%. Considerando que la expresión de PD-

L1 es positiva si $\geq 1\%$ en celularidad inmune o tumor, en nuestro estudio encontramos que PD-L1 fue positivo en el 40,2% (35 pacientes) en el estroma inmunitario y en el 9,2% (8 pacientes) en el tumor.

No pudo demostrarse relación entre la expresión de PD-L1 y el estado del ganglio centinela. Sin embargo la expresión de PD-L1_{ic} y PD-L1_t se asoció con factores clínico-patológicos de agresividad como grado II-III, Ki67 ≥ 20 y receptor hormonal negativo. Los tumores > 2 cm presentaron mayor expresión de PD-L1_{ic} pero esta diferencia no se objetivó cuando se midió la expresión de PD-L1_t. Las pacientes con fenotipo TN y HER2 tuvieron mayor expresión de PD-L1_{ic}. Sólo el fenotipo HER2 tuvo mayor expresión de PD-L1_t.

Las pacientes TN y HER2 con GC positivo tuvieron más expresión de PD-L1_{ic} y PD-L1_t pero sin alcanzar la significación estadística.

No se observó ninguna relación entre la expresión de PD-L1_{ic} o PD-L1_t con la SLE entre las mujeres analizadas.

Al igual que nuestro estudio, en la literatura destacan trabajos que analizan tanto el valor pronóstico de PD-L1 como su relación con variables clínico-patológicas de pacientes con cáncer de mama.

En el estudio de Muenst et al, la expresión de PDL1 en las células tumorales estuvo presente en 152 (23,4%) de un total de 650 pacientes. La expresión de PDL1 se asoció con la edad, tamaño, grado, estado ganglionar, K67 elevado, RE negativo y expresión de HER2 (p:0,01). Sin embargo no se evidenció asociación significativa entre los diferentes subtipos intrínsecos de cáncer de mama (93).

Otro estudio similar, Ghebeh et al. analizaron en tejido de 44 pacientes la expresión de PD-L1. Publicaron que la expresión de PDL1 fue positiva en el 34% de las pacientes con cáncer de mama y que ésta se asociaba con el grado tumoral, expresión HER2 y ausencia de RE. Sin embargo, no obtuvieron ninguna correlación con el estado

ganglionar o la edad de las pacientes (94). Un estudio posterior del mismo grupo con un total de 68 casos, confirmó estas asociaciones y también demostraron una asociación entre la expresión de PDL1 y Ki67 (122). Estos datos se corroboran en nuestro trabajo. El hecho de que la expresión de PDL1 se asocie con tumores grandes y más agresivos podría indicar que la activación del eje PD1/PDL1 puede ayudar a que estos tumores evadan la respuesta inmune antitumoral y por consiguiente que aumente su capacidad de proliferación y extensión.

La asociación de PD-L1 con la supervivencia de las pacientes de cáncer de mama varía según los estudios. En el trabajo de Muenst et al, en el análisis univariado, los casos de cáncer de mama expresores de PD-L1 tuvieron una significativa peor SG (HR:4,430, $p < 0,001$). En su análisis de subgrupos, la expresión de PD-L1 se asoció con una menor SG en luminal B HER2- (HR:3,888 $p < 0,0001$), luminal B HER2+ (HR 5,127, $p < 0,0001$), HER2+ (HR 2,834, $p 0,0131$) y basal-like (HR 4,973, $p < 0,0001$). En el análisis multivariante, tras ajustar por edad, grado, tamaño tumoral, estado ganglionar o subtipo intrínseco, la expresión de PD-L1 demostró ser un factor pronóstico independiente de SG (HR 3,063, $p < 0,0001$)(93).

Por el contrario, Schalper et al. determinaron la expresión de RNAm-PDL1 en cáncer de mama encontrando que éste estaba presente en el 60% de las pacientes. Se asociaba de forma significativa con una mejor SLE en una cohorte de 358 pacientes (HR 0,268 $p:0,009$) pero sin embargo no se obtuvo asociación con el grado tumoral ni con el receptor estrogénico negativo como en los estudios previos (77). Estas diferencias pueden ser debidas, al menos en parte, a que la información procedente de la proteína PD-L1 y la molécula mRNA son diferentes entre sí. En el estudio de Schalper, el mRNA-PDL1 tuvo un efecto positivo e independiente de otras variables en la supervivencia de las pacientes mientras que la expresión de PD-L1 con IHQ en el estudio de Muenst se asoció negativamente con la supervivencia (93).

En la actualidad no está estandarizado cuál es la forma más óptima de estudiar el valor pronóstico y predictivo de PD-L1 en cáncer de mama. Las herramientas de IHC con diferentes anticuerpos, diferentes umbrales de sensibilidad, resultados discordantes con anticuerpos así como la subjetividad en la interpretación de la muestras hace que el papel pronóstico de PD-L1 en la literatura no esté claro. A pesar de esto hay datos consistentes de que PD-L1 se asocia a una mayor presencia de TILs y por tanto a mejores resultados en una variedad de tumores como ocurre en melanoma metastásico (123), carcinoma células Merkel (124) y cáncer colorrectal (125). Esto pudiera explicarse porque los TILs son un reflejo de la presión inmune antitumoral antigénica donde las citocinas liberadas como interferón gamma pudieran inducir un efecto antitumoral parcial con el consiguiente beneficio en supervivencia. Más estudios serán necesarios para aclarar esto en cáncer de mama y otros tumores sólidos(126). Sin embargo un meta-análisis reciente en cáncer de mama confirma la asociación de PD-L1 con factores de mal pronóstico así como su efecto en una menor supervivencia global en las pacientes que lo sobreexpresan (HR 1,76 p:0,02) (127). Nuestros datos también muestran una correlación positiva entre la expresión de PD-L1 y los TILs junto con el predominio de éstos en pacientes con fenotipos no luminales (TN y HER2). Esta asociación ya ha sido explicada anteriormente haciendo especial énfasis en el papel crítico de la inmunidad local en limitar la progresión tumoral particularmente en cáncer de mama TN (106) (128).

Hay pocos datos sobre la caracterización del fenotipo de TILs según la expresión de PD-L1 en cáncer de mama. Schalper et al describieron la presencia de cuatro microambientes posibles entre sus pacientes. A) Pacientes expresoras de PD-L1 con mayor infiltración de linfocitos T CD3 y linfocitos B CD20. En este caso los linfocitos T CD8 apenas se modificaban por la expresión de PD-L1. Esto podría sugerir, según los autores del estudio, un predominio de linfocitos T CD4 inhibiendo a los linfocitos T



CD8 como consecuencia de la expresión de PD-L1. B) Pacientes con TILs pero sin expresión de PD-L1: esto pudiera explicarse por la activación de una vía alternativa de otras moléculas co-inhedoras tales como PD-L1, B7-h3, B7-h4 o LAG-3/MHCII. C) Pacientes con PD-L1 pero sin expresión prominente de TILs. En este grupo las vías intracelulares alteradas como la hiperactivación de PI3K y/o reducción de PTEN podrían ser responsables de la expresión de PD-L1. La activación de la vía PI3K induce la expresión de PD-L1 en líneas celulares de cáncer de mama y también representa la vía más frecuentemente alterada. D) Pacientes sin expresión de PD-L1 ni TILs, tal vez con un posible peor pronóstico basado en la ausencia de una reacción inmunológica. Por ello el uso de estrategias para inducir una infiltración inflamatoria con IL-2, interferón gamma, vacunas o quimiorradioterapia dentro del escenario terapéutico de los fármacos inhibidores del eje de PD-1/PD-L1 va a ser de gran interés en los próximos años (77)(129).

Por tanto, una mejor comprensión del microambiente tumoral y del por qué ciertos subtipos de cáncer de mama son más o menos inmunogénicos conllevará el uso de tratamientos que modelen del SI en beneficio de todas las pacientes con cáncer de mama (130).



7. CONCLUSIONES

- Los infiltrados linfocitarios, las subpoblaciones de linfocitos CD3 y CD8 y PD-L1 en el tumor primario no se relacionan con la afectación tumoral del ganglio centinela en cáncer de mama temprano tratado primariamente con cirugía.
- No se ha podido establecer un punto de corte respecto al nivel infiltración de TILs, CD3, CD8 o PD-L1 que pudiera obviar la estadificación ganglionar quirúrgica en probable relación con el predominio del fenotipo luminal de nuestra serie.
- Los TILs, los linfocitos CD3 y CD8 y la expresión de PD-L1 se correlacionaron con factores clínico-patológicos clásicos. Una mayor presencia de TILs se correlacionó con mayor grado y proliferación tumoral, así como la ausencia de expresión de receptores hormonales.
- Las pacientes HER 2 positivo y Triple negativo presentan más infiltrados linfocitarios y mayor expresión de PD-L1 en el estroma tumoral.
- Las pacientes triple negativo con ganglio centinela positivo tienen más TILs y mayor expresión de PD-L1.
- En nuestra serie la presencia de infiltrados linfocitarios tumorales, los linfocitos T CD3, linfocitos T CD8 y la expresión de PD-L1 no tienen impacto en la supervivencia libre de enfermedad.



8. ANEXOS

A. Glosario.

Por orden alfabético.

AC→ antraciclinas

Ac→ anticuerpos

Ag→ antígenos

AJCC→ American Joint Committee on Cancer

ATM→ ataxia teleangiectasia mutado

BAGE→ B-melanoma antigen

BRCA→ Breast cancer type 1 susceptibility protein

BSGC→ biopsia selectiva del ganglio centinela

CA 15.3→ antígeno carbohidrato 15-3

CC→ cirugía conservadora

CD→ cluster de diferenciación

CEA→ carcinoembrionario

COX-2→ ciclooxigenasa-2

CTC→ células tumorales circulantes

CTLA4→ cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

FN→ tasa falsos negativos

FSH→ hormona folículo estimulante

GC→ ganglio centinela

GHRH→ growth hormone-releasing hormones

H&E→ hematoxilina-eosina

HER2→ human epidermal receptor 2

HR→ hazard ratio

IA→ inhibidor de aromatasa

116

IARC→ International Agency for Research on Cancer

IC→ intervalo de confianza

IDO→ indolamina dioxigenasa

IFN→ interferón

IHQ→ inmunohistoquímica

IL→ interleukina

IMC→ índice de masa corporal

It→ intratumoral

ITC → isolated tumor cell

LA→ linfadenectomía axilar

LVI→ invasión linfovascular

MAGE→ melanoma associated antigen

NK→ célula T Natural Killer

OMS→ Organización Mundial para la salud

PAAF→ punción aspiración con aguja fina

PAI→ inhibidor del plasminógeno-1

u-PA→ activador del plasminógeno tipo U

t-PA→ activador del plasminógeno tipo T

PA→ posteroanterior

PD1→ programmed dead 1

PD-L1→ programmed dead ligand 1

PD-L1_ic→ programmed dead ligand 1 en celularidad immune

PD-L1_t→ programmed dead ligand 1 en tumor

pCR→ respuesta completa patológica

PDGF-B→ factor de crecimiento derivado de plaquetas-B

PIK2CA→ fosfatodilinositol-3 quinasa

PTEN→ fosfatidilinositol trifosfato 3-fosfatasa

PSA→ antígeno prostático específico

QT→ quimioterapia

RE→ receptor de estrógeno

RH→ receptores hormonales

RI→ respuesta inmunitaria

RMN→ resonancia magnética de la mama

RNA_m→ ácido ribonucleico mensajero

RP→ receptor de progesterona

RR→ riesgo relativo

RT→ radioterapia

RT-PCR→ reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SEER→ Surveillance, Epidemiology, and End Results

S→ síntesis

SI→ sistema inmunitario

SLE→ supervivencia libre de enfermedad

SLR→ supervivencia libre de recaída

SG→ supervivencia global

Str→ estroma

TAC→ tomografía axial computarizada

TH1→ linfocito T helper 1

TH2→ linfocito T helper 2

TIL→ linfocitos infiltrantes de tumor

TIL-it→ linfocitos infiltrantes de tumor intratumoral

TIL-St→ linfocitos infiltrantes de tumor en estroma

TIMPs→ inhibidores tisulares de la metaloproteinasa



TGF- β → factor transformador del crecimiento beta

Treg → linfocito T regulador

VEGF → factor de crecimiento vascular

B. Comité de Ética del Hospital Costa del Sol. Informe

FRANCISCO RIVAS RUIZ COMO SECRETARIO DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN COSTA DEL SOL

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado y ponderado de forma **FAVORABLE** en Sesión Ordinaria celebrada el 25 de mayo de 2017 el proyecto de investigación titulado:

TÍTULO: **Perfil inmunológico del tumor primario como biomarcador predictivo de afectación del ganglio centinela en cáncer de mama temprano**, cuya investigadora principal es Rosa María Villatoro Roldán (Servicio de Oncología - Hospital Costa del Sol) con código interno: 001_may17_PI – Inmuno_mama.

Los miembros del CEI CS presentes: Julia Alcaide García, Marta Aranda Gallardo, Luis Baró Rodríguez, Secundino Castillo Sánchez, Eugenio Contreras Fernández, Yolanda de Mesa Berenguer, Francisco Jesús González Sánchez, Ángeles Morales Fernández, José Luis Moreno Haro, Alejandro Pérez Cabeza, Raúl Quirós López, Francisco Rivas Ruiz, María del Carmen Saucedo Figueredo, Silvia Soler Méndez.

consideran que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.
- Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.
- Que dicho Comité, está constituido y actúa de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.

Lo que firmo en Marbella, a veinticinco de mayo de dos mil diecisiete

Fdo. Francisco Rivas Ruiz

Secretario del CEI Costa del Sol



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Sant M, Dolores M, Lopez C. Survival of women with cancers of breast and genital organs in Europe 1999 – 2007 : Results of the EURO CARE-5 study. *Eur J Cancer* [Internet]. 2015;51:2191–205.
Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26421822>
2. Siegel RL, Miller KD JA. Cancer statistics, 2016. *Cancer J Clin*. 2016;66(1):7.
3. SEOM. Las cifras del Cáncer en España 2016. 2016.
4. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [Internet]. Available from: [//globocan.iarc.fr/Default.aspx](http://globocan.iarc.fr/Default.aspx)
5. Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC HS. Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *JAMA*. 2006;296(2):193.
6. Emaus MJ, van Gils CH BM. Weight change in middle adulthood and breast cancer risk in the EPIC-PANACEA study. *Int J Cancer*. 2014;135(12):2887–99.
7. Van den Brandt PA, Spiegelman D YS. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol*. 2000;152(6):514.
8. Nagrani R, Mhatre S RP. Central obesity increases risk of breast cancer irrespective of menopausal and hormonal receptor status in women of South Asian Ethnicity. *Eur J Cancer*. 2016;66:153–61.
9. Farhat GN, Cummings SR, Chlebowski RT, Parimi N, Cauley JA, Rohan TE, et al. Sex hormone levels and risks of estrogen receptor-negative and estrogen receptor-positive breast cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(7):562–70.
10. Eliassen AH, Missmer SA TS. Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(19):1406.
11. McCormack VA, Dos Santos S. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers*



- Prev. 2006;15(6):1159.
12. Kerlikowske K, Ichikawa L MD. Longitudinal measurement of clinical mammographic breast density to improve estimation of breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(5):386.
 13. Ritte R, Lukanova A TA. Height, age at menarche and risk of hormone receptor-positive and -negative breast cancer: a cohort study. *Int J Cancer.* 2013;132(11):2619.
 14. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet.* 1997;350(9084):1047.
 15. Rosner B, Colditz GA WW. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 1994;139(8):819.
 16. Prentice RL, Caan B CR. Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA* 2006. 295AD;6(629).
 17. Colditz GA RB. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 2000;152(10):950.
 18. Nichols HB, Berrington de González A, Lacey JV Jr et al. Declining incidence of contralateral breast cancer in the United States from 1975 to 2006. *J Clin Oncol.* 2011;29:1564.
 19. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet.* 2001;358:1389.



20. Hansen J SR. Case-control study of shift-work and breast cancer risk in Danish nurses: impact of shift systems. *Eur J Cancer*. 2012;47(722).
21. Pizot C, Boniol M, Mullie P et al. Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer*. 2016;52:138.
22. Thiébaud AC, Kipnis V, Chang SC et al. Dietary fat and postmenopausal invasive breast cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study cohort. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(6):451–62.
23. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart MJ, et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1533–46.
24. Edge S, Byrd D.R, Compton CC, Fritz AG, Greene FL TA. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th edition, 2010.
25. Rivadeneira DE, Simmons RM, Christos PJ et al. Predictive factors associated with axillary lymph node metastases in T1a and T1b breast carcinomas: analysis in more than 900 patients. *J Am Coll Surg*. 1991;1:1–6.
26. Hansen NM. The Benefits and Limitations of Sentinel. *Curr Treat Options Oncol*. 2006;7:141–51.
27. Veronesi U, Viale G, Zurrida S, Intra M, Zucca F, Mazzarol G, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer. *Ann Surg*. 2010;251(4):595–600.
28. Hindie E, Groheux D, Brenot-rossi I, Rubello D, Moretti J, Espie M. The Sentinel Node Procedure in Breast Cancer: Nuclear Medicine as the Starting Point. *J Nucl Med*. 2011;52(3):405–15.
29. Goyal A, Newcombe RG, Chhabra A, Mansel RE. Factors affecting failed localisation and false-negative rates of sentinel node biopsy in breast cancer –



- results of the ALMANAC validation phase. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;99:203–8.
30. Spillane AJ, Noushi F, Cooper RA, Gebiski V, Uren RF. High-resolution lymphoscintigraphy is essential for recognition of the significance of internal mammary nodes in breast cancer. *Ann Oncol.* 2009;20(January):977–84.
 31. Giard S, Chauvet M, Penel N, Mignotte H, Martel P, Lara CT De, et al. Feasibility of sentinel lymph node biopsy in multiple unilateral synchronous breast cancer: results of a French prospective multi-institutional study (IGASSU). *Ann Oncol.* 2010;21(January):1630–5.
 32. Alvarez Lopez I. ¿Se puede evitar la linfadenectomía axilar en pacientes con cáncer de mama precoz con ganglio centinela positivo?. *Rev Senol Patol Mamar.* 2013;26(3):75–6.
 33. Giuliano, Armando E.Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha S, McCall LM MM. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis. *Jama* [Internet]. 2011;305(6):569–575. Available from: <http://mauriciolema.webhost4life.com/rolmm/files/Z0011.pdf>
 34. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, Viale G, Luini A, Veronesi P, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): A phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2013;14(4):297–305. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70035-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70035-4)
 35. Solá M, Alberro J a., Fraile M, Santesteban P, Ramos M, Fabregas R, et al. Complete Axillary Lymph Node Dissection Versus Clinical Follow-up in Breast Cancer Patients with Sentinel Node Micrometastasis: Final Results from the Multicenter Clinical Trial AATRM 048/13/2000. *Ann Surg Oncol.* 2012;120–7.



36. Donker M, van Tienhoven G, Straver ME, Meijnen P, van de Velde CJH, Mansel RE, et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): A randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014;15(12):1303–10. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70460-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70460-7)
37. Ravdin PM, De Laurentiis M, Vendely T et al. Prediction of axillary lymph node status in breast cancer patients by use of prognostic indicators. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:1771–5.
38. Gann PH, Colilla SA, Gapstur SM et al. Factors associated with axillary lymph node metastasis from breast carcinoma: Descriptive and predictive analyses. *Cancer.* 1999;86:1511–9.
39. Bevilacqua JLB, Kattan MW, Fey J V., Cody HS, Borgen PI, Van Zee KJ. Doctor, what are my chances of having a positive sentinel node? A validated nomogram for risk estimation. *J Clin Oncol.* 2007;25(24):3670–9.
40. Wu S-G, He Z-Y, Ren H-Y, Yang L-C, Sun J-Y, Li F-Y, et al. Use of CEA and CA15-3 to Predict Axillary Lymph Node Metastasis in Patients with Breast Cancer. *J Cancer* [Internet]. 2016;7(1):37–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26722358>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4679379>
41. Perez Martin, Rohde A et al. Correlation between serum levels of vascular endothelial growth factor-C and sentinel lymph node status in early breast cancer. *Tumor Biol.* 2015;36(12):9285–93.
42. Zhu L, Loo WTY, Cheng CWN, Chow LWC. Possible predictive markers related to micro-metastasis in breast cancer patients. *Oncol Rep.* 2006;15(5):1217–23.
43. Nakagawa T, Huang SK, Martinez SR, Tran AN, Elashoff D, Ye X, et al.



- Proteomic profiling of primary breast cancer predicts axillary lymph node metastasis. *Cancer Res.* 2006;66(24):11825–30.
44. Breast Early Trialists Cancer Group C. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* [Internet]. 2011;378(9793):771–84. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60993-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60993-8)
 45. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet.* 2013;381(9869):805–16.
 46. Garcia-Saenz JA, Bermejo B, Estevez LG, Palomo AG, Gonzalez-Farre X, Margeli M, et al. SEOM clinical guidelines in early-stage breast cancer 2015. *Clin Transl Oncol.* 2015;17(12):939–45.
 47. McGale P, Taylor C, Correa C, Cutter D, Duane F, Ewertz M, et al. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: Meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet* [Internet]. 2014;383(9935):2127–35. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60488-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60488-8)
 48. Hughes KS, Schnaper LA, Bellon JR, Cirrincione CT, Berry DA, McCormick B, et al. Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women age 70 years or older with early breast cancer: long-term follow-up of CALGB 9343. *J Clin Oncol.* 2013;31(19):2382–7.
 49. Foukakis T BJ. Prognostic and predictive factors in early, non-metastatic breast cancer [Internet]. *UTODATE.* 2016. Available from: <http://www.uptodate.com/>
 50. Carter CL, Allen C H DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989;63(1):181.



51. Andersson Y, Frisell J, Sylvan M, de Boniface J BL. Breast cancer survival in relation to the metastatic tumor burden in axillary lymph nodes. *J Clin Oncol.* 2010;28(17):2868–73.
52. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, Gusterson BA, Price KN, Gelber RD, Holmberg SB, Lindtner J, Snyder R, Thürlimann B, Murray E, Viale G, Castiglione-Gertsch M, Coates AS, Goldhirsch A IBCSG. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *J Clin Oncol.* 2008;26(18):3006.
53. Colleoni M, Sun Z, Price KN, Karlsson P, Forbes JF, Thürlimann B, Gianni L, Castiglione M, Gelber RD, Coates AS GA. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *J Clin Oncol.* 2016;34(9):927.
54. Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM, Huntsman D, Olivetto IA, Nielsen TO GK. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol.* 2008;26(35):5697.
55. Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I LH. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One.* 2009;4(11):e7695.
56. Wildiers H, Van Calster B, Van De Poll-Franse L V., Hendrickx W, Røislien J, Smeets A, et al. Relationship between age and axillary lymph node involvement in women with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(18):2931–7.
57. Swain SM, Jeong JH GCJ. Longer therapy, iatrogenic amenorrhea, and survival in early breast cancer. *N Engl J Med.* 2010;362(22):2053.
58. Silber JH, Rosenbaum PR, Clark AS GB. Characteristics associated with



- differences in survival among black and white women with breast cancer. *JAMA*. 2013;310(4):389–97.
59. Michael N. Passarelli, Polly A. Newcomb, John M. Hampton, Amy Trentham-Dietz, Linda J. Titus, Kathleen M. Egan, John A. Baron WCW. Cigarette Smoking Before and After Breast Cancer Diagnosis: Mortality From Breast Cancer and Smoking-Related Diseases. *J Clin Oncol*. 2016;34(12):1315–22.
60. Gierach GL, Ichikawa L KK. Relationship between mammographic density and breast cancer death in the Breast Cancer Surveillance Consortium. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(16):1218.
61. Iwase H, Yamamoto Y, Kurebayashi J, Tsuda H, Ota T, Kurosumi M, Miyamoto K IT. Clinicopathologic and prognostic features of triple-negative breast cancer analyzed in registration data of the Japanese Breast Cancer Society, 11705 cases. *J Clin Oncol*. 2009;27(15):e22122.
62. Goldstein LJ, Ravdin P, Gray R et al. Prognostic utility of the 21-gene assay compared with Adjuvant!, in hormone receptor (HR) positive operable breast cancer with 0-3 positive axillary nodes treated with adjuvant chemohormonal therapy (CHT): an analysis of intergroup trial E2197. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;106(suppl 1):S17.
63. Polley MY, Leung SC ML et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(24):1897.
64. Harbeck N, Kates RE SM. Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol*. 2002;20(4):1000.
65. Olivier M, Langerød A CP et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*.



2006;12(4):1157.

66. Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, Bhattacharyya A et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol.* 2012;13(7):688–95.
67. Dushyanthen S, Beavis PA, Savas P, Teo ZL, Zhou C, Mansour M, et al. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Med* [Internet].2015;13:202.
Available:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4547422&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
68. Dieci M V., Mathieu MC, Guarneri V, Conte P, Delalogue S, Andre F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1698–704.
69. Dieci M V., Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: A retrospective multicenter study. *Ann Oncol.* 2014;25(3):611–8.
70. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol*[Internet].2015;13(4):228–41.
Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26667975>
71. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012;12(4):298–306.Available:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22419253>
<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3245>
<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc3245>



72. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3:991–8.
73. Berraondo P, Melero I. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A TUMORES. In: C R, editor. *Medicina Interna.* 17^a. Barcelona: Elseviers; 2012. p. 2527-25–20.
74. Kim JM, Chen DS. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: Seven steps to success (or failure). *Ann Oncol.* 2016;27(8):1492–504.
75. Denardo DG. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: cross-talk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2007;9:212.
76. De Visser KE. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Contrib Microbiol.* 2006;13:118–37.
77. Schalper K. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20(10):2773–82.
78. Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res.* 2008;15:5158–65.
79. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: Results from the FinHER trial. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1544–50.
80. Ghebeh H, Barhoush E, Tulbah A et al. FoxP3+ Tregs and B7-H1/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high risk breast cancer patients: implication for immunotherapy. *BMC Cancer.* 2008;8:57.
81. Cimino-Mathews A, Ye X, Meeker A, Argani P, Emens LA. Metastatic triple-negative breast cancers at first relapse have fewer tumor-infiltrating lymphocytes



- than their matched primary breast tumors: A pilot study. *Hum Pathol.* 2013;44(10):2055–63.
82. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC et al. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2012;44:2494–500.
83. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M JS. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer, and autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:447–62.
84. Martinet L, Garrido I, Filleron T et al. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 2011;71:5678–87.
85. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILS) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26(2):259–71.
86. Denkert C, Von Minckwitz G, Brase JC, Sinn B V., Gade S, Kronenwett R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol.* 2015;33(9):983–91.
87. West NR, Milne K, Truong PT et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011;13:R126.
88. Generali D, Bates G, Berruti A et al. Immunomodulation of FoxP3+ regulatory T cells by the aromatase inhibitor letrozole in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2009;15:1046–51.
89. Ladoire S, Arnould L, Mignot G et al. T-bet expression in intratumoral lymphoid structures after neoadjuvant trastuzumab plus docetaxel for HER2-overexpressing breast carcinoma predicts survival. *Br J Cancer.* 2011;105(366–



- 71).
90. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:252–64.
 91. Dong H, Zhu G, Tamada K CL. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. 1999;5:365–9.
 92. Gatalica Z, Snyder C, Maney T et al. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;29:65–70.
 93. Muenst S, Schærli AR, Gao F, Trella E, Drosner RA, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;146(1):15–24.
 94. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omar A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia* [Internet]. 2006;8(3):190–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1578520/pdf/neo0803_0190.pdf
 95. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*. 2014;2:361–70.
 96. Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, Nixon C, et al. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2015;3(4):326–32. Available: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4390454&tool=pmcncitrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4390454&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract)

97. Muenst S, Trella E, Droeser RA, Schaerli AR, Gao F, Muraro MG, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;146(1):15–24.
98. Li X, Li M, Lian Z ZH. Prognostic Role of Programmed Death Ligand-1 Expression in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Target Oncol.* 2016;11(6): 753-761.
99. Guo Y, Yu P, Liu Z, Maimaiti Y, Wang S, Yin X, et al. Prognostic and Clinicopathological Value of Programmed Death Ligand-1 in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(5). Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0156323>
100. Hammond ME, Hayes DF DM et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2784–95.
101. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;(25):118–45.
102. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell.* 2011. p. 646–74.
103. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(1):105–13.
104. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Ali HR, Viens P, et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget* [Internet].



2015;6(7):5449–64.

Available:

[http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=3216&pubmed-linkout=1](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=3216&pubmed-linkout=1)

105. Bordea C, Bordea M, Totan A, Condrea I, Voinea S, Sandru A, et al. Immunological aspects predicting metastatic sentinel lymph node in early breast cancer patients. *J Med Life*. 2012;5(4):455–61.
106. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol*. 2013;31(7):860–7.
107. Donnem T, Kilvaer TK, Andersen S, Richardsen E, Paulsen E, Hald SM, et al. Strategies for clinical implementation of TNM-immunoscore in resected non-small cell lung cancer. *Ann Oncol [Internet]*. 2015;27(November 2015):225–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26578726>
108. Rathore AS, Kumar S, Konwar R, Srivastava AN, Makker A, Goel MM. Presence of CD3+ tumor infiltrating lymphocytes is significantly associated with good prognosis in infiltrating ductal carcinoma of breast. *Indian J Cancer [Internet]*. 2013;50(3):239–44. Available: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84885400515&partnerID=tZOtx3y1%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24061465>
109. Rathore AS, Kumar S, Konwar R, Makker A, Negi MPS, Goel MM. CD3+, CD4+ & CD8+ tumour infiltrating lymphocytes (TILs) are predictors of favourable



- survival outcome in infiltrating ductal carcinoma of breast. *Indian J Med Res.* 2014;140(September):361–9.
110. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG et al. Tumor infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29:1949–55.
111. Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res [Internet].* 2012;14(2):R48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3446382/pdf/bcr3148.pdf>
112. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1536–43.
113. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol.* 2014;32(27):2959–66.
114. 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.
115. Penn I. Tumors of the immunocompromised patient. *Annu Rev Med.* 1988;39:63–73.
116. Yu P FY. Tumour-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Labs Invest.* 2006;85(231–45).
117. Huang Y, Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, et al. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget [Internet].* 2015;6(19):17462–78.



Available:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4627321&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

118. Miyan M, Mende JS, Kiessling R, Poschke I, Boniface J De. Differential tumor infiltration by T - cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer. *J Transl Med.* 2016;14(227):1–11.
119. Martinet L, Garrido I, Girard J-P. Tumor high endothelial venules (HEVs) predict lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Oncoimmunology* [Internet]. 2012;1(5):789–90. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3429596&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
120. Brown SD, Warren RL, Gibb EA, Martin SD, Spinelli JJ, Nelson BH, et al. Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res.* 2014;24(5):743–50.
121. Bour-Jordan H, Esensten JH, Martinez-Llordella M, Penaranda C, Stumpf M, Bluestone JA. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol Rev* [Internet]. 2011;241(1):180–205.

Available:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3077803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

122. Ghebeh et al. Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67- expressing tumor cells. *Int J Cancer.* 2007;121(4):751–758.
123. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human



- Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci Transl Med* [Internet]. 2012;4(127):127ra37-127ra37. Available from: <http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.3003689>
124. Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M. PD-L1 Expression in the Merkel Cell Carcinoma Microenvironment : Association with Inflammation , Merkel Cell Polyomavirus , and Overall Survival PD-L1 Expression in the Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2013;
 125. Droeser RA, Hirt C, Viehl CT, Frey DM, Nebiker C, Huber X, et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. 2013;49(9):2233–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23478000>
 126. Wu P, Wu D, Li L, Chai Y, Huang J. PD-L1 and survival in solid tumors: A meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(6):1–15.
 127. Zhang M, Sun H, Zhao S, Wang Y, Pu H, Wang Y. Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer : a meta- analysis. 2017;8(19):1–8.
 128. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC et al. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132:545–53.
 129. Schalper KA. PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes: Revisiting the antitumor immune response potential in breast cancer. *Oncoimmunology* [Internet].2014;3:e29288. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4106164/pdf/onci-3-e29288.pdf>
 130. Disis ML, Stanton SE. Triple-negative breast cancer: immune modulation as the new treatment paradigm. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* [Internet]. 2015;e25-30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25993181>



