

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



Facultad de Medicina.  
Departamento de Medicina.  
Programa de Doctorado en Biología Molecular, Biomedicina e Investigación  
Clínica.

**CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL INMUNITARIO EN SANGRE PERIFÉRICA  
Y EN TEJIDO DE CARCINOMA DE MAMA CON TRATAMIENTO  
NEOADYUVANTE. ESTUDIO DE SU POTENCIAL PAPEL PRONÓSTICO Y  
PREDICTIVO DE RESPUESTA.**

TESIS DOCTORAL

NATALIA PALAZÓN CARRIÓN

Sevilla, 12 de noviembre de 2020

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000049978

CSV

GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular



GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7



**Facultad de Medicina.  
Departamento de Medicina.  
Programa de Doctorado en Biología Molecular, Biomedicina e Investigación  
Clínica.**

**CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL INMUNITARIO EN SANGRE PERIFÉRICA  
Y EN TEJIDO DE CARCINOMA DE MAMA CON TRATAMIENTO  
NEOADYUVANTE. ESTUDIO DE SU POTENCIAL PAPEL PRONÓSTICO Y  
PREDICTIVO DE RESPUESTA.**

**TESIS DOCTORAL**  
Natalia Palazón Carrión

**Director**  
Luis de la Cruz Merino

**Tutor**  
Víctor Sánchez Margalet

Sevilla, 12 de noviembre de 2020

I

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7

*"Nada ocurre porque sí. Todo en la vida es una sucesión de hechos que, bajo la lupa del análisis, responden perfectamente a causa y efecto".  
Richard P. Feynman.*

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



## DEDICATORIA

*A mi familia (numerosa), por hacerlo todo más sencillo.  
A papá y a mamá. A ellos, se deben mis logros.  
Por sus ideales, humildes e insuperables.*

III

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7

## AGRADECIMIENTOS

A *Luis de la Cruz*, por ser referente, maestro y líder. Por su apuesta, lucha y ánimo por todo aquello en lo que cree. Incluido este trabajo y su equipo de profesionales.

A *Víctor Sánchez Margalet*, por su labor, tutoría y gran ayuda en el equipo y en este trabajo.

A *Carlos Jiménez Cortegana* por su persistente trabajo y máxima disponibilidad. Y al resto de profesionales del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular.

A *María Luisa Sánchez* por su labor y apoyo constante en la Unidad de Cáncer de Mama.

A *Ana Vallejo* y al Servicio de Anatomía Patológica por su excelente labor con las biopsias y los bloques tumorales.

A *María Adoración Nieto*, por su cercanía y predisposición.

Al resto del equipo del Servicio de Oncología Médica y de las Unidades del Hospital Universitario Virgen Macarena, por su trabajo multidisciplinar, tan necesario y reflejado en esta tesis.

A las pacientes, son la razón y la base de este estudio.

Sin cada uno de ellos, este trabajo no se habría realizado. Por todos los proyectos que están por venir.

Gracias.



## ABREVIATURAS

<b>ADCC</b>	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ( <i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> ).
<b>AP</b>	Atención Primaria.
<b>BAG</b>	Biopsia con aguja gruesa.
<b>BCR</b>	Receptor de célula B ( <i>B cell receptor</i> ).
<b>BI-RADS</b>	Sistema de Evaluación de Imágenes mamarias ( <i>Breast Imaging Reporting and Data System</i> ).
<b>BRCA 1/2</b>	Gen 1/2 de susceptibilidad de cáncer de mama ( <i>Breast cancer susceptibility gene 1/2</i> ).
<b>BSGC</b>	Biopsia selectiva de ganglio centinela.
<b>CAFs</b>	Fibroblastos asociados a cáncer (Cancer-associated fibroblasts).
<b>CMTN</b>	Cáncer de mama triple negativo.
<b>CDI</b>	Carcinoma Ductal Infiltrante.
<b>CDIS</b>	Carcinoma Ductal In Situ, Carcinoma intraductal.
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de ciclina ( <i>Cyclin-Dependent Kinase</i> ).
<b>CLI</b>	Carcinoma Lobulillar Infiltrante.
<b>CLIS</b>	Carcinoma Lobulillar In Situ.
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígenos.
<b>CTCs</b>	Células Tumorales Circulantes.
<b>CTDs</b>	Células Tumorales Diseminadas.
<b>CTLA-4</b>	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico ( <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> ).
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a daño ( <i>Damage associated molecular patterns</i> ).
<b>DSS</b>	Supervivencia específica de enfermedad ( <i>Disease-Specific Survival</i> ).
<b>E.E.U.U</b>	Estados Unidos.
<b>FISH</b>	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> ( <i>Fluorescence in situ hybridization</i> ).
<b>FOXP3</b>	Proteína FOXP3 ( <i>Forkhead box protein P3</i> ).
<b>G</b>	Grado tumoral.
<b>HER2</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 ( <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> ).
<b>HR</b>	Hazard ratio.
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica.
<b>ILV</b>	Invasión linfovascular.
<b>ISH</b>	Hibridación <i>in situ</i> ( <i>in situ hybridization</i> ).
<b>IV</b>	Intravenoso.
<b>LPBC</b>	Tumores con predominio linfocitario ( <i>Lymphocyte-predominant breast cancer</i> ).
<b>MDSCs</b>	Células supresoras derivadas mieloide ( <i>Myeloid Derived Suppressor Cells</i> ).



<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad ( <i>Major histocompatibility complex</i> ).
<b>M&amp;P</b>	Miller & Payne.
<b>N/A</b>	No Aplica.
<b>NETs</b>	Trampas extracelulares de neutrófilos ( <i>Neutrophil extracellular traps</i> ).
<b>NRc</b>	No respuesta clínica.
<b>NRp</b>	No respuesta patológica.
<b>PAAF</b>	Punción aspiración con aguja fina.
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos ( <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> ).
<b>PD-L1</b>	Ligando 1 de muerte programada ( <i>Programmed Death-Ligand 1</i> ).
<b>PET-TAC</b>	Tomografía por Emisión de Positrones- Tomografía Axial computarizada.
<b>QTNA</b>	Quimioterapia neoadyuvante.
<b>RCB</b>	Carga tumoral residual ( <i>Residual Cancer Burden</i> ).
<b>RCc</b>	Respuesta completa clínica.
<b>RCp</b>	Respuesta completa patológica.
<b>RPc</b>	Respuesta parcial clínica.
<b>RPp</b>	Respuesta parcial patológica.
<b>RE</b>	Receptor de Estrógenos.
<b>RH</b>	Receptor Hormonal.
<b>RP</b>	Receptor de Progesterona.
<b>SC</b>	Subcutáneo.
<b>SG</b>	Supervivencia Global.
<b>SLE</b>	Supervivencia Libre de Enfermedad.
<b>SLP</b>	Supervivencia Libre de Progresión.
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso central.
<b>TAA</b>	Antígenos asociados a tumor ( <i>Tumor associated antigens</i> ).
<b>TAC</b>	Tomografía Axial Computarizada.
<b>TAMs</b>	Macrófagos asociados a tumor ( <i>Tumor-associated macrophages</i> ).
<b>TAP</b>	Subunidad de procesamiento de antígeno asociado al transportador ( <i>Transporter-associated antigen processing</i> ).
<b>TANs</b>	Neutrófilos asociados a tumor ( <i>Tumor-associated neutrophils</i> ).
<b>TCR</b>	Receptor de célula T ( <i>T cell receptor</i> ).
<b>T-DM1</b>	Trastuzumab emtansina.
<b>Th</b>	Linfocitos T <i>helper</i> .
<b>TILs</b>	Linfocitos infiltrantes de tumor ( <i>Tumor-infiltrating lymphocytes</i> ).
<b>TME</b>	Microambiente tumoral ( <i>Tumor microenvironment</i> ).
<b>TNM</b>	Sistema de Clasificación para Tumor, Ganglios y Metástasis ( <i>Classification system for Tumor, Nodes, and Metastases</i> ).
<b>TLR</b>	Receptor de tipo toll ( <i>Toll-like receptor</i> ).
<b>Tregs</b>	Linfocitos T reguladores.
<b>VDR</b>	Receptor de la vitamina D ( <i>Vitamin D receptor</i> ).
<b>25(OH)D</b>	Calcidiol o 25-hidroxivitamina D.

VI

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000049978

CSV

GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular



**1,25(OH)<sub>2</sub>D** Calcitriol o 1α,25-dihidroxitamina D.

3

VII

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7



# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 CÁNCER DE MAMA.....</b>	<b>7</b>
1.1.1 Epidemiología.....	7
1.1.2 Factores pronósticos y predictivos.....	8
1.1.3 Estadio. 8º edición TNM AJCC/IUCC.....	13
1.1.4 Supervivencia.....	15
1.1.5 Consejo Genético.....	16
1.1.6 Neoadyuvancia en cáncer de mama .....	18
Tratamiento sistémico neoadyuvante.....	19
Cirugía post-neoadyuvancia.....	22
Radioterapia.....	24
1.1.7 La respuesta completa patológica (RCp).....	24
Valor pronóstico.....	24
Sistemas de evaluación de la RCp.....	27
1.1.8 Seguimiento en carcinoma de mama estadio temprano.....	31
<b>1.2 VITAMINA D.....</b>	<b>33</b>
1.2.1 Generalidades.....	33
1.2.2 Potencial papel inmunomodulador en cáncer de mama.....	35
<b>1.3 INMUNIDAD Y CÁNCER DE MAMA.....</b>	<b>37</b>
1.3.1 Sistema inmunitario. Generalidades.....	37
1.3.2 Inmunoedición. Carcinogénesis.....	42
1.3.3 Mecanismos de “escape inmunitario” en cáncer de mama.....	43
1.3.4 Microambiente tumoral en carcinoma de mama.....	45
Fibroblastos asociados a cáncer (CAFs).....	46
Macrófagos asociados a tumor (TAMs).....	46
Neutrófilos asociados a tumor (TANs).....	46
Células supresoras derivadas mieloides (MDSCs).....	47
Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4 ó CD152).....	47
Proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) y su ligando (PD-L1/2) .....	47
Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs).....	47
Linfocitos B.....	48
Linfocitos T reguladores (Treg) CD4+CD25+FOXP3.....	48
Linfocitos T CD8+ citotóxicos.....	48
1.3.5 Papel predictivo y pronóstico de las poblaciones celulares del sistema inmunitario en tejido en neoadyuvancia.....	49
TILs, T CD4+, TCD8+ y Treg FOXP3+.....	49
1.3.6 Papel predictivo y pronóstico de las poblaciones celulares del sistema inmunitario en sangre periférica en neoadyuvancia .....	54
Leucocitos.....	54
Neutrófilos.....	54

## VIII

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000049978

CSV

GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular



Monocitos.....	55
Ratio linfocitos/monocitos (RLM).....	56
Ratio neutrófilos/linfocitos (RNL).....	57
Linfocitos.....	58
Linfocitos B.....	58
Linfocitos NK.....	59
Linfocitos T: T CD8+, T CD4+, Treg, CD4/CD8 y CD8/Treg.....	60
<b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>62</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
<b>3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....</b>	<b>65</b>
3.1.1 Tipo de estudio.....	65
3.1.2 Periodo de estudio.....	65
3.1.3 Población a estudio.....	65
Criterios de inclusión.....	65
Criterios de exclusión.....	65
3.1.4 Protocolo terapéutico.....	66
3.1.5 Seguimiento.....	66
3.1.6 Variables y recogida de datos.....	67
<b>3.2 ESTUDIO DE LAS MUESTRAS.....</b>	<b>69</b>
3.2.1 Estudio histológico.....	70
Sistema de Gradación de Black modificado (Ladoire).....	70
3.2.2 Estudio en sangre periférica.....	71
<b>3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>73</b>
3.3.1 Cálculo del tamaño muestral.....	73
3.3.2 Análisis estadístico.....	74
<b>3.4 ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>75</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO.....</b>	<b>77</b>
<b>4.2 RESPUESTA COMPLETA PATOLÓGICA.....</b>	<b>82</b>
4.2.1 Sistema de Miller & Payne.....	82
4.2.2 Sistema TNM patológico.....	83
<b>4.3 DATOS DE SUPERVIVENCIA (SLE, SLED y SG).....</b>	<b>83</b>
4.3.1 Supervivencia a 5 años.....	83
Según respuesta a QTNA.....	84
4.3.2 Supervivencia a 9 años.....	86
Según respuesta a QTNA.....	86
Según inmunofenotipo.....	88
<b>4.4 ESTUDIO DEL PERFIL INMUNITARIO.....</b>	<b>90</b>
<b>4.4.1 Pacientes vs sanas.....</b>	<b>90</b>
Poblaciones celulares en sangre .....	90
Vitamina D en sangre .....	93



Poblaciones celulares y vitamina D en sangre.....	93
<b>4.4.2 Correlación con la RCp.....</b>	<b>94</b>
<b>Sangre periférica.....</b>	<b>94</b>
Sistema TNM patológico.....	94
Mama.....	94
Ganglionar.....	97
Mama y ganglionar.....	101
Sistema de Miller & Payne.....	104
Mama.....	104
Ganglionar.....	107
Mama y ganglionar.....	110
<b>Tejido.....</b>	<b>115</b>
Sistema TNM patológico.....	115
Mama.....	115
Ganglionar.....	117
Mama y ganglionar.....	118
Sistema de Miller & Payne.....	119
Mama.....	119
Ganglionar.....	120
Mama y ganglionar.....	122
<b>4.4.3 Correlación con la supervivencia.....</b>	<b>126</b>
<b>SLE.....</b>	<b>126</b>
Sangre.....	126
Tejido.....	130
<b>SG.....</b>	<b>131</b>
Sangre.....	131
Tejido.....	135
<b>4.4.4 Correlación con el estadio TNM al diagnóstico.....</b>	<b>139</b>
Sangre.....	139
Tejido.....	142
<b>4.4.5 Correlación con el inmunofenotipo tumoral.....</b>	<b>143</b>
Sangre.....	143
Tejido.....	146
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>155</b>
<b>5.1 RESPUESTA COMPLETA PATOLÓGICA.....</b>	<b>156</b>
<b>5.2 SUPERVIVENCIA (SLE, SLED y SG).....</b>	<b>157</b>
5.2.1 Supervivencia según inmunofenotipo.....	157
5.2.2 Supervivencia según respuesta a QTNA.....	158
<b>5.3 VITAMINA D.....</b>	<b>159</b>
5.3.1 Pacientes vs sanas.....	159
5.3.2 Correlación con el perfil inmunitario.....	159
<b>5.4 INFILTRADO INMUNITARIO EN TEJIDO.....</b>	<b>160</b>
5.4.1 Correlación con la RCp.....	160



5.4.2 Correlación con la SLE y SG.....	163
5.4.3 Correlación con el estadio TNM al diagnóstico.....	164
5.4.4 Correlación con el inmunofenotipo tumoral.....	164
<b>5.5 INFILTRADO INMUNITARIO EN SANGRE PERIFÉRICA.....</b>	<b>165</b>
5.5.1 Pacientes vs sanas.....	165
5.5.2 Correlación con la RCp.....	167
5.5.3 Correlación con la SLE y SG.....	168
5.5.4 Correlación con el estadio TNM al diagnóstico.....	169
5.5.5 Correlación con el inmunofenotipo tumoral.....	170
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>171</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>174</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>197</b>
<b>9. ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>213</b>
<b>10. ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>216</b>
<b>11. ACTIVIDADES CIENTÍFICAS RELACIONADAS.....</b>	<b>220</b>



## RESUMEN

**Introducción:** Los estudios traslacionales permiten una correcta interrelación entre la investigación básica y la clínica. La inmunología, y en concreto la caracterización del perfil inmunitario tanto en sangre como en tejido tumoral va, progresivamente, adquiriendo un papel destacado en la patología tumoral, postulándose que el sistema inmunitario de las pacientes con cáncer es diferente al de la población sana, con un perfil basal predominantemente inmunosupresor y pro-tumoral en las pacientes. En carcinoma de mama, muchos son los estudios donde se destacan mayores respuestas completas patológicas a quimioterapia neoadyuvante (QTNA) en tumores de mama con predominio linfocitario. No solo el porcentaje linfocitario infiltrante, sino los diferentes subtipos celulares del sistema inmunitario influyen en la respuesta a tratamiento y supervivencia de las pacientes con carcinoma de mama en tratamiento neoadyuvante. Así, un perfil inmunocompetente compuesto por linfocitos T CD8+ citotóxicos estaría en relación a mejores respuestas a quimioterapia neoadyuvante y mejores tasas de supervivencia, mientras que un perfil inmunosupresor compuesto por linfocitos T reguladores (Treg FOXP3+), neutrófilos asociados a tumor (TANs) y macrófagos asociados a tumor (TAMs) se asocian a peores resultados, respaldándose al sistema inmunitario como papel clave en la respuesta a la terapia oncológica.

**Objetivos:** Caracterización del perfil inmunitario de las pacientes con carcinoma de mama candidatas a tratamiento neoadyuvante antes y después de la QTNA y comparativa con un grupo de personas sanas. Además, determinar su valor predictivo de respuesta a la QTNA, su valor pronóstico y su correlación con otras características como niveles de vitamina D, subtipo histológico y TNM clínico.

**Material y métodos:** Estudio traslacional prospectivo, reclutándose, de enero de 2011 a mayo de 2013, un total de 47 pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama en el Area Hospitalaria Virgen Macarena y consideradas subsidiarias de tratamiento neoadyuvante. Un total de 20 personas sanas formaron el grupo de población sana. Las pacientes recibieron tratamiento neoadyuvante según guías de práctica clínica habitual.

Se realizaron análisis de sangre periférica, biopsia de tejido tumoral al diagnóstico y estudio de la pieza quirúrgica post-tratamiento para la caracterización de las poblaciones celulares del perfil inmunitario en tejido mediante técnicas inmunohistoquímicas (linfocitos T CD8+ y Treg FOXP3+) y en sangre periférica mediante citometría de flujo (leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos Treg y ratios neutrófilos/linfocitos, linfocitos/monocitos, CD4/CD8, CD8/Treg), antes y después del tratamiento neoadyuvante QTNA.

Además, se recogieron las respuestas patológicas alcanzadas (sistema de gradación de Miller & Payne y sistema de estadio TNM patológico), supervivencia libre de enfermedad y global tras 5 y 9 años de seguimiento y características



clincohistológicas del tumor (inmunofenotipo tumoral y estadio TNM), así como los niveles de vitamina D.

**Resultados:** En las pacientes con carcinoma de mama hay mayores niveles basales en sangre de leucocitos ( $p = 0.004$ ), neutrófilos ( $p < 0.001$ ), ratio neutrófilos/linfocitos ( $p < 0.001$ ) y Treg pro-tumoral ( $p = 0.028$ ) y menores niveles de células con acción anti-tumoral como linfocitos T ( $p < 0.001$ ), linfocitos B ( $p = 0.009$ ), T CD4+ ( $p < 0.001$ ), T CD8+ ( $p = 0.001$ ), ratio linfocitos/monocitos ( $p = 0.018$ ) y CD8/Treg ( $p < 0.001$ ), respecto a sanas.

En las pacientes que no alcanzan RCp tras tratamiento neoadyuvante, se produce una disminución de T CD8+ en tejido y en sangre ( $p \leq 0.044$ ); además, hay disminución de Treg en sangre en RCp ( $p \leq 0.044$ ).

En las pacientes que alcanzan mayor SLE y SG tras tratamiento neoadyuvante, hay descenso de Treg en sangre periférica ( $p < 0.05$ ) y un aumento del ratio CD4/CD8 en sangre periférica ( $p = 0.028$ ).

No se ha encontrado correlación con los niveles de vitamina D. El subtipo HER2+ tiene una mayor densidad de TILs, en concreto T CD8+ pre/post-QTNA en tejido y en sangre ( $p = 0.045$ ). Hay una mayor densidad de T CD8+ pre-QTNA en tejido en estadio III y mayor ratio CD4/CD8 post-QTNA en sangre periférica en estadio II ( $p = 0.002$ ).

**Conclusiones:** El perfil inmunitario de las pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama es predominantemente inmunosupresor y diferente al de sanas. El descenso de las poblaciones celulares pro-tumorales y el aumento de las anti-tumorales tras tratamiento neoadyuvante tanto en tejido como en sangre periférica se correlaciona con una mayor RCp y mejor SLE y SG.

Son necesarios más estudios con mayor poder estadístico para establecer definitivamente a las poblaciones celulares del sistema inmunitario como potenciales biomarcadores predictivos y pronósticos.



# 1. INTRODUCCIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



El cáncer constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad en la población mundial. Según los últimos datos disponibles, el **número de tumores diagnosticados continúa aumentando** progresivamente, desde los 14.000.000 de casos en el mundo en el año 2012 a los 18.100.000 en 2019<sup>1</sup>. El incremento poblacional y el envejecimiento asociado a las mejoras en la esperanza de vida, junto a la exposición a factores de riesgo como el tabaco, el alcohol, la contaminación, la obesidad, el sedentarismo, entre otros, han contribuido a este aumento en el número absoluto de cánceres diagnosticados en la última década.

Sin embargo, debido a los avances en **diagnóstico precoz** y en los tratamientos antineoplásicos aplicados, la mortalidad por cáncer ha ido descendiendo progresivamente en los últimos años. Una de las áreas que más se ha desarrollado recientemente ha sido la de la **inmunología e inmunoterapia** del cáncer. Los últimos avances en esta disciplina permiten el desarrollo de la caracterización del perfil inmunitario de los pacientes con cáncer, así como el patrón molecular y el microambiente tumoral de los tumores para poder identificar biomarcadores pronósticos y predictivos. La elaboración de un perfil molecular o un "immunoscore" válido en cáncer, y su aplicabilidad clínica supondría asimismo una nueva herramienta en la era de la **Medicina de Precisión**.

A pesar de las indicaciones establecidas del uso de la inmunoterapia en diferentes tumores sólidos, existen un gran número de neoplasias malignas con necesidades no cubiertas y en las que la inmunoterapia obtiene resultados poco favorables. El cáncer de pulmón o el melanoma han sido las patologías donde se han observado los primeros beneficios en supervivencia con la inmunoterapia, sentando las bases del desarrollo posterior en tumores considerados menos inmunogénicos como es el cáncer de mama, donde también se ha logrado recientemente la primera indicación con inmunoterapia. Este último logro en cáncer de mama impulsa, más aún, el desarrollo de la investigación traslacional en esta patología.

La inmunoterapia con nuevas líneas de investigación, nuevos tratamientos, nuevos biomarcadores, nuevas toxicidades inmuno-relacionadas, con mejores resultados en tasas de respuesta y de supervivencia están impactando directamente en la cronificación de la patología tumoral e incluso la curación en pacientes que previamente tenían un pronóstico pobre. De ahí la importancia de la **caracterización del perfil inmunitario** en los tumores, y en concreto, en este trabajo de tesis, del **carcinoma de mama**.

En los últimos años ha cobrado gran interés el impacto que sobre la evolución clínica de determinadas neoplasias puede tener la composición específica del microambiente inmune del tumor, tanto a nivel de los infiltrados celulares intra y peritumorales como en lo que concierne a la expresión de factores inmunosupresores en sangre periférica. El concepto de inmuno-edición del cáncer reconoce la importancia que los elementos inmunes del propio huésped tienen sobre el desarrollo de los tumores y su evolución, abriendo también una nueva línea para el abordaje terapéutico del cáncer.





En carcinoma de mama, trabajos de autores como Issa-Number et al. o Denkert C et al., destacan mayores tasas de respuestas completas patológicas (RCp) a quimioterapia neoadyuvante (QTNA) en tumores de mama con predominio linfocitario.

Parece que no sólo la densidad de los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) en su conjunto tienen correlación con las tasas de respuestas y de supervivencia, sino que también la composición específica de los mismos puede tener una traducción clínica. Así, trabajos en los que se analiza el grado de infiltración linfocitaria por linfocitos T CD8+ y Treg FOXP3+ en carcinoma de mama, han demostrado que en los subgrupos de pacientes con enfermedad RE- (triple negativa) o RE+ con sobreexpresión HER2, la mayor densidad de infiltración intratumoral por linfocitos T CD8+ se correlaciona con una reducción estadísticamente significativa del riesgo de muerte por cáncer de mama a 10 años del 30% aproximadamente, en ambos subgrupos. La mayor infiltración por linfocitos T CD8+ se asocia a mejor pronóstico al potenciarse la acción citotóxica de destrucción tumoral. Sin embargo, la mayor densidad de neutrófilos asociados a tumor (TANs), macrófagos asociados a tumor de tipo 2 (TAMs) y Treg parece asociarse a una peor evolución clínica, con mayor tasa de recidivas y muertes por enfermedad, así como menor tasa de RCp tras QTNA, al implicar una inhibición de la respuesta inmune citotóxica.

Si bien, la evidencia sobre la relevancia del microambiente inmune en la evolución de los diferentes tipos de cáncer procede en su mayoría de estudios histopatológicos, la posibilidad de acometer análisis de perfiles inmunológicos en sangre periférica proporciona una serie de ventajas sobre las biopsias seriadas como son la comodidad en la obtención de la muestra y posibilidad de monitorización en tiempo real de la evolución de los marcadores inmunológicos. En este sentido, en los últimos años ha emergido el concepto de “biopsia líquida” en cáncer en general (también en cáncer de mama), aprovechando las posibilidades que brinda el estudio de células tumorales y los fragmentos de DNA tumoral circulantes en sangre periférica.

Con todo ello, el diseño de un “immune score” a partir de un reducido número de parámetros inmunológicos claves, procedentes de sangre periférica y tejido, permite la caracterización del perfil inmune en carcinoma de mama con innumerables posibilidades terapéuticas.

De este modo, este trabajo de tesis doctoral tiene de base la inmunología y el cáncer de mama. Se ha realizado un estudio prospectivo caracterizándose mediante técnicas de citometría de flujo, el perfil inmunitario en sangre de las pacientes con carcinoma de mama candidatas a tratamiento neoadyuvante, comparándose con el de una muestra de población sana para poder destacar biomarcadores en carcinoma de mama. Además, se ha estudiado la evolución a lo largo del tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares del sistema inmunitario en sangre y en tejido en las pacientes, para poder destacar biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta al tratamiento neoadyuvante en el análisis de correlación con la respuesta completa patológica alcanzada y con los datos de supervivencia.



Todo ello, con el objetivo de dar una mayor aplicabilidad clínica a la **Medicina de Precisión en carcinoma de mama**.

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7

## 1.1 CÁNCER DE MAMA

### 1.1.1 Epidemiología.

A nivel mundial, el cáncer de mama es el tumor maligno diagnosticado con mayor frecuencia y la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres.

En Estados Unidos (E.E.U.U), el cáncer de mama es el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia representando el 30% de todos los nuevos diagnósticos de cáncer en mujeres y la segunda causa de muerte por cáncer en el sexo femenino, tras el cáncer de pulmón. El cáncer de mama es la principal causa de muerte en mujeres de 40 a 49 años. Se estimaron para el año 2019, 271.270 nuevos diagnósticos de carcinoma de mama en ambos sexos (2.670 en hombres y 268.600 en mujeres) de un total de 1.762.450 casos de nuevo diagnóstico de cáncer en E.E.U.U.\* Del total de 606.880 muertes estimadas por cáncer de cualquier etiología, el cáncer de mama supuso 42.260 muertes en ambos sexos (41.760 en mujeres) en el año 2019<sup>3</sup>.

En España\*\*, el número de tumores diagnosticados en el año 2019, alcanza los 277.234\*\*\*, según las estimaciones de REDECAN<sup>4</sup>. Los más destacados en orden de frecuencia en ambos sexos son el cáncer colorrectal (44.937), próstata (34.394), mama (32.536) y pulmón (29.503). **En mujeres, el cáncer de mama es el más frecuentemente diagnosticado** (32.530), seguido del cáncer colorrectal (18.191), ya que una de cada ocho mujeres sufrirá cáncer de mama a lo largo de su vida. Afortunadamente, **sólo el 5% serán diagnosticadas de novo como estadio IV**. Debido a los avances en diagnóstico precoz y en los tratamientos aplicados, la mortalidad por cáncer de mama ha ido descendiendo en los últimos años, pero todavía sigue siendo la **causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres** (6.489), seguido por cáncer colorrectal (6.307) y cáncer de pulmón (4.853). La supervivencia media relativa del cáncer de mama tras cinco años es cercana al 90% de forma global, variando del 98% en el estadio I a menos del 25% en los estadios  $\geq$ III<sup>5</sup>.

-----  
\*329.970.000 habitantes tiene E.E.U.U. en 2019.

\*\*46.660.000 habitantes tiene España en 2019.

\*\*\*Excluidos los tumores cutáneos no melanoma.



## 1.1.2 Factores pronósticos y predictivos.

- **Edad.**

Entre los factores pronósticos relacionados con las pacientes, destaca la edad. Tanto las pacientes más jóvenes (<35 años) como aquellas de mayor edad (>69 años) parecen tener un peor pronóstico respecto a pacientes de mediana edad (35-69 años). Este aspecto podría estar en relación a una mayor agresividad de la biología tumoral (estadios más avanzados, RH negativos, etc.) en estos rangos de edad; y en el caso de pacientes >65 años se añadirían comorbilidades que ensombrecería aún más el pronóstico.

- **Tamaño tumoral (T), ganglios regionales (N), metástasis (M).**

Otros factores pronósticos son el estadio TNM basándose en el tamaño tumoral, número de ganglios regionales afectados y la presencia de enfermedad metastásica a distancia. Las tasas de supervivencia a cinco años son del 95, 85, 70, 52, 48 y 18% para pacientes que presentan estadio anatómico (sin incorporar los biomarcadores pronósticos) I, IIA, IIB, IIIA, IIIB y IV, respectivamente<sup>6</sup>.

-El tamaño del tumor primario (T) está muy relacionado con la probabilidad de supervivencia a los 5 años: 91% para T>2cm, 80% para T2-5cm y 63% para T>5 cm<sup>7</sup>.

-Además, el tamaño tumoral suele ir en relación a la afectación ganglionar, aunque son dos factores pronósticos independientes.

-El carcinoma de mama inflamatorio (T4d) tiene un peor pronóstico.

-Mientras que la afectación ganglionar macrometastásica es un factor pronóstico independiente claro, la presencia de micrometástasis (<2 mm, pN1<sub>mic</sub>) o células tumorales aisladas (pN0<sub>ITC</sub>) está menos claro.

- **Subtipo histológico.**

En cuanto al subtipo histológico, el carcinoma lobulillar infiltrante aunque tiene bajo porcentaje de recaída en los primeros 6 años (16%) respecto al carcinoma ductal infiltrante, finalmente aumenta la tasa de recaída al 55% tras pasar esos años.

Otros subtipos histológicos como el carcinoma tubular, papilar, mucinoso, medular y adenoide quístico tienen buen pronóstico. Sin embargo, el subtipo micropapilar y metaplásico tienen peor pronóstico.

- **Invasión linfovascular (ILV).**

La invasión linfovascular (ILV) parece tener valor pronóstico según datos de estudios retrospectivos, pero la utilidad clínica permanece desconocida.

- **Biomarcadores.**

La sobreexpresión de HER2, el estado de los receptores hormonales o el grado tumoral son biomarcadores pronósticos necesarios para establecer los grupos del estadio pronóstico de la 8ª edición TNM AJCC. Además, conocer el estado de los



receptores hormonales y la sobreexpresión de HER2 tiene implicaciones terapéuticas.

-El estado de los receptores hormonales (RH): La expresión del receptor de estrógenos (RE) y del receptor de progesterona (RP) se asocian con mejores tasas de supervivencia, y además, la positividad del RE indica la posibilidad de emplear hormonoterapia en el tratamiento. Normalmente, los tumores RE positivos se relacionan con metástasis óseas y tejidos blandos mientras que los RE negativos suelen metastatizar en hígado y cerebro con mayor frecuencia.

-La sobreexpresión y/o amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) está presente en el 20% de los tumores de mama e indica posibilidad de emplear tratamiento anti-HER2. Previo a la introducción de la terapia anti-HER2, la sobreexpresión de HER2 era un marcador de mal pronóstico tanto en tumores con ganglios afectos como no afectos y en tumores  $\leq 1$  cm, pero el empleo de la terapia diana anti-HER2 ha conseguido cambiar ese pronóstico.

La sobreexpresión HER2 se establece bien por IHQ para determinar la expresión de la proteína HER2 o por hibridación in situ (ISH) tipo hibridación fluorescente in situ (FISH) para evaluar el número de copias del gen. La Sociedad Americana de Oncología y Patología<sup>8</sup> establece la secuencia de actuación para determinar el estado de HER2 comenzándose por IHQ y en caso de resultado "ambiguo" (patrón 2+) se realizará ISH:

**IHQ:** Negativo: 0 o 1+; Ambiguo: 2+; Positivo: 3+.

**ISH** (sonda "dual"):

- Posible negativo: HER2/CEP17 (centromeric probe to chromosome 17) ratio  $< 2.0$  Y número copias HER2  $< 4$ .
- Posible ambiguo (requiere test ISH alternativo para confirmar el resultado o IHQ si no se ha realizado previamente): HER2/CEP17 ratio  $< 2.0$  Y número copias HER2  $\geq 4 < 6$ .
- Posible positivo:
  - Ratio HER2/CEP17  $\geq 2.0$  por ISH.
  - Número copias HER2  $\geq 6$  independientemente del ratio por ISH.

Los tumores de mama pueden caracterizarse en diferentes subtipos según la expresión de receptores hormonales y de HER2. Así, la mayoría de los tumores de mama (80%) expresan RH (RE y/o RP); hasta un 23% presentan sobreexpresión de HER2 (67% RH positivo, 32% RH negativo); y tan sólo un 13% son triple negativo (RE, RP y HER2 negativos).

-El grado histológico (G) en carcinomas invasivos: El grado histológico combinado de Nottingham (Modificación de Nottingham del Sistema de gradación Scarff-Bloom-Richardson (SBR)) es el método recomendado y se basa en aspectos morfológicos



(formación tubular, pleomorfismo nuclear y número de mitosis) para puntuar de 1 (favorable) a 3 (desfavorable)<sup>8</sup>. [Tabla 1](#).

G	Definición
GX	No puede establecerse
G1	Grado Bajo
G2	Grado intermedio
G3	Grado alto

Tabla 1. Grado histológico combinado de Nottingham.

- **Células tumorales.**

La medición de las células tumorales tiene implicación pronóstica pero no se aplica todavía en la práctica clínica rutinaria, estando actualmente en desarrollo.

-Las células tumorales circulantes (CTCs) son células tumorales que se desprenden de la entidad tumoral y circulan por el torrente sanguíneo. La presencia de las mismas es un factor pronóstico adverso. El único método aprobado por la FDA es CellSearch®<sup>9</sup> donde a partir de una muestra de 7,5 ml de sangre periférica se consiguen aislar las células tumorales para su conteo. Para enfermedad metastásica, el punto de corte para un pronóstico desfavorable es  $\geq 5$  cels/7.5 ml (el punto de corte para tumor primario de mama se ha establecido en  $\geq 1$  cel/7.5 ml)<sup>10</sup>.

-Las células tumorales diseminadas (CTDs) en médula ósea parecen ser un factor independiente para la recaída metastásica y en consecuencia para peores tasas de supervivencia global en cáncer de mama precoz. Los resultados preliminares del estudio PADDY<sup>11</sup> muestran una asociación entre la presencia de CTDs en médula ósea ( $\geq 1$  cel.) en el momento de la resección tumoral inicial y la recaída postcirugía en cáncer de mama, siendo la correlación mucho más pronunciada en el subtipo luminal B. Todavía están pendiente de publicarse los valores medios hallados de las CTDs ya que por el momento solo se hace referencia a la positividad de las mismas y de establecerse su valor pronóstico relativo.

- **Expresión de PD-L1.**

El papel de la expresión de PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1, ligando 1 de muerte programada) como factor pronóstico y predictivo en carcinoma de mama avanzado, ha sido evaluado en un subanálisis del estudio randomizado fase III IMpassion130/NCT02425891<sup>2</sup>, sin papel establecido por el momento en el carcinoma estadio precoz.

Los resultados del estudio fase III IMpassion130/NCT02425891 publicados recientemente han promovido que la FDA en marzo de 2019 dé la aprobación, como dispositivo diagnóstico, al análisis de detección VENTANA PD-L1, para seleccionar pacientes candidatos a tratamiento con atezolizumab en combinación con nab-paclitaxel a través del análisis del biomarcador PD-L1. Este estudio fase III promovió



la aprobación acelerada de atezolizumab en combinación con nab-paclitaxel en carcinoma de mama triple negativo localmente avanzado o metastásico irreseccable cuyos tumores expresan PD-L1. La SLP fue de 7.2 meses con atezolizumab + nab-paclitaxel versus 5.5 meses con nab-paclitaxel, mientras que la SG fue de 21.3 meses con la combinación versus 17.6 meses con nab-paclitaxel monoterapia, no siendo estadísticamente significativa. Sin embargo, en el grupo de tumores PD-L1 + la mediana de SG fue de 25.0 meses vs 15.5 meses, a favor del grupo experimental.

- **Marcadores de proliferación celular.**

Los marcadores de proliferación celular también se están evaluando para establecer sus implicaciones pronósticas.

- El índice de proliferación celular Ki-67 ha sido ampliamente estudiado en cáncer de mama localizado confirmándose su valor pronóstico independiente para recaída. Los datos publicados por de Azambuja et al. en 2007<sup>12</sup> y por Stuart-Harris et al. en 2008<sup>13</sup> muestran una asociación del Ki-67 con el pronóstico, la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y con la supervivencia global (SG).

En 2009, el Consenso de St Gallen estratificó los tumores en bajo, intermedio o altamente proliferativo según valores de Ki-67 en <15%, 16-30% y >30%, respectivamente. Se pretendía así, identificar pacientes que pudieran potencialmente beneficiarse de tratamiento con quimioterapia o con terapia endocrina. Adicionalmente, otros estudios establecieron el valor de Ki-67 en >10%, >14% ó >20% para definir alto riesgo.

De ahí, que el uso de Ki-67 como marcador pronóstico en la clínica diaria sea controvertido dada la heterogeneidad en los valores empleados para la estratificación (10%, 14% o 20%), inconsistencia de los resultados de los estudios, la falta de validación de test para establecer un "score" y la ausencia de acuerdo entre los expertos.

-La mutación somática en el gen supresor de tumor p53 (TP53) está presente en el 20-30% de los tumores de mama, pero sin sospecha de síndrome hereditario (mutación germinal de p53) no está indicado su realización de manera generalizada. Los datos publicados sugieren que los pacientes con mutaciones en TP53 tienen un peor pronóstico, independiente del tamaño tumoral, afectación ganglionar y estado de RH<sup>14</sup>.

-Otros marcadores como nm23, E-cadherina, cateninas, inhibidor de metaloproteasas (TIMPs), antígeno específico prostático (PSA), la inestabilidad de microsatélites, la metilación de genes supresores, etc. son potenciales indicadores pronósticos, pero requieren más estudios para establecerlos de rutina.

- **Subtipos moleculares.**



El perfil molecular con el estudio de la expresión de genes ha permitido identificar varios subtipos de carcinoma de mama con diferentes implicaciones pronósticas y predictivas a tratamiento. Los genes que identifican estos subtipos son los relacionados con la expresión de RE (luminal), HER2, marcadores de proliferación y aquellos relacionados con el grupo "basal". Cada uno de estos subtipos tiene una historia natural, un patrón de diseminación metastásica y una sensibilidad a tratamiento diferente<sup>15,16</sup>.

Sin embargo, la caracterización molecular no es fácilmente accesible en todos los centros. Así, para facilitar el diagnóstico de los distintos subtipos biológicos de carcinoma de mama para estimar el pronóstico y establecer las guías de actitud terapéutica en la práctica clínica diaria, se ha facilitado la clasificación utilizando biomarcadores establecidos por IHQ (expresión de RE, RP y HER2), el índice de proliferación celular (Ki-67) o la expresión de citoqueratinas<sup>17-19</sup>. [Tabla 2](#).

CLASIFICACIÓN DE CARCINOMA DE MAMA			
Subtipo	Genes	Morfología	IHQ
<b>LUMINAL LIKE</b>			RH + y HER2-
<input type="checkbox"/> <b>Luminal A</b> (30-40%; Pronóstico favorable)	Mutación PIK3CA, MAP3KI, GATA3, FOXA1; alta expresión ESR1, XBP1; ganancia 1q, 8q; pérdida 8p, 16q.	G 1 ó 2. Carcinoma ductal infiltrante bajo grado.	RE+ RP >20% Bajo Ki-67* (<20% ó <14%).
<input type="checkbox"/> <b>Luminal B</b> (20%; Pronóstico más desfavorable; Alto valor recurrencia en Oncotype® sugiere luminal B).	Mutación TP53, PIK3CA; amplificación Cyclin D1, MDM2; amplificación focal 8p12, 11q13; pérdida ATM; aumento inestabilidad genómica.	G 2 ó 3. Carcinoma ductal infiltrante y micropapilar.	RE+ RP <20%, Alto Ki-67* (>20% ó >14%).
<b>HER2 LIKE</b> <b>HER2 positivo</b> (10-15%)	Amplificación HER2, ciclina D1; mutación TP53, APOBEC PIK3CA, EGFR; alta expresión FGFR4; Alta inestabilidad genómica.	G2 o 3. Carcinoma infiltrante, apocrino, lobulillar pleomorfo.	<input type="checkbox"/> <b>"HER2 puro":</b> HER2+ y RE- y RP-  <input type="checkbox"/> <b>"HER2 luminal":</b> HER 2+ y RE+ y RP+/- (" <b>Triple positivo</b> " HER2+ y RE+ y PR+").
<b>BASAL LIKE</b> <b>Triple negativo</b> (15-20%)	Expresión genes citqueratina (KRT5, KRT7, KRT1, TP63), ciclo celular y replicación ADN; mutación EGF, IGFR1.	G3. Alto infiltrado linfocitario.	RE- y RP- y HER2 -





--	--	--	--

Tabla 2. Subtipos de carcinoma de mama. Características moleculares e inmunohistoquímica - Subtipos orientados al tratamiento. *Nota: \* Múltiples estudios usaron el valor de Ki-67 14% para separar luminal A de luminal B; más recientemente se ha empleado el valor Ki-67 20%.*

- **Paneles de expresión génica.**

El uso de los paneles para conocer el perfil de expresión génica del tumor y su potencial riesgo de recurrencia, se está incrementando en los últimos años en poblaciones seleccionadas por sus posibles implicaciones en el manejo clínico, permitiendo de este modo plantear un tratamiento más adecuado y personalizado. Un resultado estimado de menor riesgo de recurrencia en una paciente específica podría correlacionarse con una menor probabilidad de beneficio a la quimioterapia. Los más empleados actualmente son Oncotype Dx® y ProSigna®.

-Oncotype Dx®: Es un test genómico basado en el estudio de la expresión de 21 genes para calcular la probabilidad de recurrencia a distancia en pacientes con RE positivos y ganglios negativos tratados con hormonoterapia. Tras los resultados del estudio TAILORx<sup>20</sup>, una puntuación <11 indica un pronóstico favorable con una supervivencia libre de recurrencia del 99.3% en pacientes tratados con hormonoterapia exclusiva.

-PAM50 (ProSigna®)<sup>21</sup>: Estima, tras el estudio del perfil de expresión de 50 genes y mediante una escala de 0 a 100, la probabilidad de recurrencia a distancia a los 10 años y el subtipo intrínseco tumoral.

-Paneles como MammaPrint® con el estudio de 70 genes; el test IHC4 combinando IHQ con Ki-67, la expresión de RH y HER2; entre otros, son alternativas para conocer el perfil genómico tumoral, el potencial de agresividad biológica y riesgo de recurrencia, y por tanto sus posibles implicaciones pronósticas.

### 1.1.3 Estadío. 8ª edición TNM AJCC/IUCC.

El cáncer de mama se estadifica mediante el sistema TNM de clasificación según la afectación del tumor primario (T, tumor), ganglios linfáticos regionales (N, nodes) y afectación metastásica a distancia (M, metastases) del American Joint Committee on Cancer/International Union for Cancer Control (AJCC/IUCC). [Anexos 1, 2 y 3.](#)

La octava edición del sistema de estadificación TNM (8ª edición TNM AJCC/IUCC)<sup>18</sup>, que entró en vigencia a partir del 1 de enero de 2018, establece tres grupos para el estadio al incluir biomarcadores pronósticos (grado tumoral, expresión de HER2 y estado de los receptores hormonales):

1. El estadio anatómico está basado en la extensión tumoral definidos por las categorías T, N y M. Cuando los biomarcadores están disponibles (grado tumoral,



expresión de HER2 y estado de RE y RP), se debe estadificar mediante los grupos de estadio pronóstico clínico y patológico. [Tabla 3; Anexo 4.](#)

2. El estadio pronóstico clínico se establece tras la historia clínica, examen físico, pruebas de imagen y biopsia al conocer los datos de T, N, M, grado tumoral, expresión de HER2 y estado de los receptores hormonales (RE y RP). [Anexo 5.](#)

3. El estadio pronóstico patológico se emplea para estadificar a pacientes que se someten a resección quirúrgica como tratamiento inicial antes de recibir cualquier terapia sistémica o tratamiento radioterápico. Se basa en toda la información clínica, los datos de los biomarcadores (grado tumoral, expresión de HER2 y estado de RE y RP), los hallazgos de la cirugía y del tejido resecado. [Anexo 6.](#)

En el sistema TNM, a los pacientes se les asigna un estadio clínico (cTNM) antes de la intervención quirúrgica. Después de la cirugía, se determina el estadio patológico (pTNM) y tras tratamiento neoadyuvante, se emplea la letra "y" (ypTNM).

Además de la inclusión de los biomarcadores pronósticos, la 8ª edición TNM AJCC/UICC) tiene en cuenta la aplicación de los paneles de perfil genómico multigenes. Los paneles multigenes pueden proporcionar información pronóstica y predictiva de respuesta a tratamiento que complementa la información del T, N, M y de los biomarcadores. El uso del perfil genómico no es imprescindible para el estadiaje de la 8ª edición TNM AJCC/UICC.

T	N	M	Estadio
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	IA
T0	N1mi	M0	IB
T1	N1mi	M0	IB
T0	N1	M0	IIA
T1	N1	M0	IIA
T2	N0	M0	IIA
T2	N1	M0	IIB
T3	N0	M0	IIB
T0	N2	M0	IIIA
T1	N2	M0	IIIA
T2	N2	M0	IIIA
T3	N1	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIIB
T4	N1	M0	IIIB
T4	N2	M0	IIIB



Cualquier T	N3	M0	IIIC
Cualquier T	Cualquier N	M1	IV

Tabla 3. Grupos Estadio Anatómico (8ª edición TNM AJCC). Adaptado de la AJCC<sup>18</sup>.

Se establecen así tres grupos clínicos según la extensión de enfermedad que tendrán implicaciones pronósticas y terapéuticas diferentes:

- Carcinoma de mama **estadio temprano** si estadio clínico I, IIA o IIB (T2N1).
- Carcinoma de mama **localmente avanzado** si tumor T3 sin afectación ganglionar (T3N0, un subgrupo de pacientes con estadio clínico IIB), IIIA, IIIB y IIIC.
- Carcinoma de mama **metastásico** si estadio IV.

#### 1.1.4. Supervivencia.

Mittendorf E.A. et al.<sup>22</sup> analizaron a propósito de la 8ª edición de TNM, grandes cohortes de pacientes del Hospital MD Anderson determinando, tras un análisis de puntuación de perfiles de riesgo, que la incorporación y combinación de los factores como estadio patológico, RE, RP, HER2 y grado tumoral mejoraban la discriminación pronóstica con respecto al sistema TNM clásico. Así, se estimó la supervivencia específica de enfermedad (Disease-Specific Survival, DSS) y la supervivencia global (SG) a los 5 años, tras la influencia de los factores pronósticos incorporados<sup>23</sup>. Tablas 4-5.

	5-años DSS (%)	Análisis Univariante		Análisis Multivariante		Puntuación
		HR	p	HR	p	
Estadio patológico (7ª Edición)						
I	99.1	Referente		Referente		0
IIA	98.0	2.8	0.002	2.3	0.01	1
IIB	95.6	4.8	< 0.0001	4.0	< 0.0001	2
IIIA	95.4	6.8	< 0.0001	7.2	< 0.0001	3
IIIC	79.5	26.6	< 0.0001	19.9	< 0.0001	4
ER						
Positivo	98.8	Referente		Referente		0
Negativo	92.9	4.9	< 0.0001	2.5	0.001	1
PR						
Positivo	98.8	Referente		Referente		
Negativo	95.2	4.0	< 0.0001		NS	
HER2						
Positivo	97.5	Referente		Referente		0
Negativo	98.0	0.8	0.5	2.2	0.04	1

Tabla 4. Análisis univariante y multivariante de los factores pronósticos y su influencia en la supervivencia específica de enfermedad (DSS). La última columna muestra la puntuación de riesgo asignada según la magnitud del Hazard Ratio (HR). Adaptado del Análisis MD Anderson<sup>22</sup>. Nota: No hay suficientes números de casos estadio IIB para el análisis.



Estadio (7ª Edición)	Perfil riesgo	N	5-a. DSS	IC 95%	5-a. SG	IC 95%
I (IA y IB)	0	36	100%		97%	80.4%-99.6%
	1	1173	99.4%	98.7%-99.7%	96.7%	95.4%-97.0%
	2	274	98.8%	96.4%-99.6%	94.6%	91.0%-96.8%
	3	119	96.6%	91.1%-98.7%	93.8%	87.5%-97.0%
IIA	0	31	100%		96.8%	79.2%-99.5%
	1	634	99.4%	97.5%-99.8%	97.1%	94.7%-98.4%
	2	236	97.5%	93.2%-99.1%	94.1%	88.7%-97.0%
	3	98	91.0%	81.8%-95.7%	88.2%	78.5%-93.8%
IIIB	0	11	100%		100%	
	1	309	96.9%	92.6%-98.8%	94.6%	89.6%-92.2%
	2	107	92.9%	83.6%-97.1%	89.3%	80.1%-94.4%
	3	40	91.5%	75.6%-97.2%	91.5%	75.6%-97.2%
IIIA	0	3	100%		100%	
	1	134	98.3%	88.2%-99.8%	91.5%	82.6%-96.0%
	2	50	92.2%	77.2%-97.5%	90.3%	75.7%-96.3%
	3	7	68.6%	21.3%-91.2%	68.6%	21.3%-91.2%
IIIC	0	0				
	1	39	92.2%	72.1%-98.0%	84.4%	63.7%-93.9%
	2	16	80.8%	51.4%-93.4%	80.8%	51.4%-93.4%
	3	10	33.3%	6.3%-64.6%	33.3%	6.3%-64.6%

Tabla 5. Supervivencia global (SG) y supervivencia específica de enfermedad (DSS) determinados al añadir el perfil de riesgo (0-3 puntos) de los biomarcadores (grado, RE, estado HER2) al estadio patológico de la 7ª Edición TNM AJCC. *Adaptado del Análisis MD Anderson<sup>23</sup>. Nota: No hay suficientes números de casos estadio IIIB para el análisis.*

*Determinación del perfil de riesgo: 0 puntos (grado 1-2, RE+, HER2+); 1 punto (grado 3, RE-, HER2-).*

### 1.1.5. Consejo Genético.

Aunque la mayoría de los tumores de mama y ovario son esporádicos, aproximadamente el 6% de los tumores de mama y el 15% de los de ovario tienen una mutación en los genes de alta penetrancia asociados al síndrome de cáncer de mama y ovario hereditarios (genes 1/2 de susceptibilidad de cáncer de mama, breast cancer susceptibility gene 1/2, **BRCA1/2**). Los tumores de mama con alteraciones germinales en BRCA1/2 suelen ser de características de peor pronóstico, e incluso los que presentan alteración en BRCA1 se caracterizan por mayor grado histológico e índice mitótico, así como gran infiltración linfocitaria, áreas de necrosis y subtipo predominante triple negativo respecto a los tumores esporádicos y los BRCA 2 mutados. Además, con un aumento del riesgo del 12.7% y del 6.8% para desarrollar cáncer de ovario a los 10 años para mutaciones BRCA 1 y BRCA 2 en pacientes con cáncer de mama diagnosticado.

Otros casos de cáncer de mama no relacionados con *BRCA1/2*, pero asociados a mutaciones en otros genes de alta penetrancia son: *TP53* (síndrome de Li-Fraumeni), *PTEN* (síndrome de Cowden), *STK11* (síndrome de Peutz-Jeghers), *CDH1* (cáncer gástrico hereditario) o *BLM* (síndrome de Bloom).

Además, el uso cada vez más extendido de las técnicas de secuenciación masiva han permitido conocer la expresión de genes con riesgo moderado para cáncer de mama por su interacción con las proteínas BRCA 1/2 o su participación en las vías de reparación de ADN, con un riesgo del ≤1% de desarrollar cáncer de mama: ATM,



CHEK2, PALB2, *RAD51*, *BRIP1*. Por el momento con gran incertidumbre respecto a la actitud clínica en los portadores de mutaciones en estos genes de riesgo moderado.

Actualmente, hay establecidos criterios de selección para realizar el estudio genético en línea germinal<sup>24</sup>. [Tabla 6](#).

<b>Independientemente de la historia familiar:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujer con cáncer de mama y ovario (metacrónico o sincrónico).</li> <li>• Cáncer de mama ≤40 años.</li> <li>• Cáncer de mama bilateral (el 1º cáncer de mama ≤ 40 años).</li> <li>• Cáncer de mama triple negativo ≤ 60 años.</li> <li>• Cáncer de ovario o de trompas de Falopio o primario de peritoneo no mucinosos.</li> <li>• Cáncer de mama en varón.</li> </ul>
<b>Dos o más familiares de primer grado con alguna combinación de las siguientes características de alto riesgo:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cáncer de mama bilateral + otro familiar con cáncer de mama ≤50 años.</li> <li>• Cáncer de mama + Cáncer de ovario.</li> <li>• Dos casos de cáncer de mama diagnosticados antes de los 50 años.</li> </ul>
<b>Tres o más familiares directos con cáncer de mama y/o cáncer de ovario.</b>

Tabla 6. Criterios de selección en cáncer de mama para el estudio genético en línea germinal. *Adaptado de Aguirre Ortega E et al.*<sup>24</sup>

Además, con la incorporación de nuevos tratamientos en pacientes portadores de mutación BRCA1/2, estos criterios de selección de estudio genético cada vez son más amplios dada la implicación tanto de consejo genético en síndrome hereditario familiar como en actitudes preventivas ([Tabla 7](#)) y terapéuticas.

<b>Autoexploración mamaria</b>	Mensualmente a partir de los 18 años.
<b>Exploración clínica mamaria</b>	Cada 6-12 meses a partir de los 25 años.
<b>Exploración radiológica mamaria</b>	<b>Mamografía alterna con ecografía o RNM mama</b> cada 6 meses.  <i>Se recomienda iniciar el cribado a los 25 años o 10 años antes del caso más joven de la familia diagnosticado de cáncer de mama.</i>
<b>Ecografía transvaginal y marcador CA125</b>	Cada 6-12 meses.
<b>Mastectomía simple bilateral profiláctica</b>	Cuando clínicamente indicado.



	<i>Reducción del 90% del riesgo de cáncer de mama.</i>
<b>Salpingooforectomía bilateral profiláctica</b>	Plantear si completado su deseo de descendencia.  <i>Reduce el riesgo de cáncer de ovario en un 96% y de cáncer de mama (RH+) en un 50-70%. Persiste un riesgo residual del 4% de cáncer primario peritoneal.</i>

Tabla 7. Prevención en portadores de mutación genética para síndrome de cáncer de mama y ovario hereditarios. *Adaptado de Aguirre Ortega E et al.*<sup>24</sup>

### 1.1.6. Neoadyuvancia en cáncer de mama.

El abordaje multidisciplinar (anatomía patológica, radiodiagnóstico, cirugía, radioterapia, oncología médica, etc.) en el manejo diagnóstico-terapéutico de los tumores implica una reducción en la morbi-mortalidad por cáncer<sup>25</sup>. En los últimos años, existe un consenso general en que la mayoría de las pacientes con carcinoma de mama localmente avanzado y algunas en estadio precoz (particularmente si son fenotipo triple negativo ó HER2 positivo) deberían ser consideradas para terapia sistémica neoadyuvante previa a la cirugía.

Los objetivos del tratamiento neoadyuvante son, entre otras, reducir el tamaño tumoral mejorando las opciones quirúrgicas y obtener información sobre la sensibilidad al tratamiento y la respuesta tumoral. Se pretende, así, incrementar las tasas de cirugía conservadora en aquellas pacientes con carcinoma de mama operable y convertir en operables aquellos tumores inoperables de entrada por tamaño o extensa afectación locorregional.

Los criterios generales a tener en cuenta para la selección de pacientes con carcinoma de mama para aplicar tratamiento neoadyuvante son:

1. **Carcinoma de mama estadio localmente avanzado: IIB (T3N0), IIIA-IIIC** independientemente del subtipo molecular.

2. **Carcinoma de mama estadio temprano: I, IIA, IIB (T2N1):**

-Si no es posible la cirugía conservadora de inicio por gran tamaño tumoral y pequeño volumen mamario.

-Fenotipo triple negativo incluso de tamaño pequeño (T1c) ó HER2 positivo dada las altas tasas de respuesta a la quimioterapia con/sin terapia dirigida.

En cambio, en los tumores con estadio temprano HER negativo y RH positivo la quimioterapia neoadyuvante (QTNA) tiene un beneficio más discutible, salvo en estadios localmente avanzados, por lo que en caso de estadios localizado IIA ó IIB



(T2N1) se puede plantear quimioterapia neoadyuvante o no en base a otros factores (relación tamaño tumor/ mama...) y por supuesto, tras una deliberación multidisciplinar. En estadio I HER negativo y RH positivo casi sin excepción se prefiere cirugía de inicio.

-Afectación ganglionar limitada (cN1) independiente del tamaño tumoral para intentar conseguir N0. Si con QTNA se convierte a N0, serían candidatos a biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC) evitándose la comorbilidad de una linfadenectomía axilar completa.

### **Tratamiento sistémico neoadyuvante**

Se han realizado varios estudios<sup>26</sup> que avalan la seguridad y eficacia de la QTNA. Sus ventajas serían las siguientes:

-Conseguir excelentes tasas de respuestas: tasas de respuesta clínica y patológica de hasta un 60-70% y 30-50%, respectivamente (según estudios, subtipos tumorales y terapias empleadas).

-Lograr una mayor tasa de cirugía conservadora.

-Demostración de no inferioridad con respecto a la quimioterapia adyuvante en cuanto a SLE y SG.

-El valor pronóstico de la respuesta completa patológica (RCp).

-La oportunidad de detectar y estudiar marcadores subrogados, pudiendo así recopilar información predictivo-pronóstica útil para el desarrollo de la medicina personalizada o de precisión, con la incorporación de nuevas estrategias terapéuticas que puedan aumentar las tasas de respuesta y de supervivencia de las pacientes.

Interesa recordar que en la elección del tipo de tratamiento neoadyuvante, es imprescindible conocer la biología tumoral de cada tipo específico de cáncer de mama.

### **1. RH negativo y HER2 negativo.**

En los tumores "triples negativos" (RH negativo y HER2 negativo) se emplea QTNA similar al estándar en adyuvancia con antraciclinas y taxanos, en combinación o de manera secuencial, dado que la tasa de RCp de antraciclinas en monoterapia es del 9-13%, aumentando al 20-40% si se emplean taxanos<sup>27,28</sup>.

La introducción de quimioterapia basada en platino podría incrementar esos resultados, sobre todo en este subtipo TN y en particular en portadoras de mutación BRCA, si bien se precisan de estudios confirmatorios<sup>29,30</sup>.

Los esquemas más empleados son:

- Adriamicina 60mg/m<sup>2</sup> día 1 y ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup> día 1 cada 21 días, seguido de paclitaxel semanal 80 mg/m<sup>2</sup> (AC x4 ciclos -> T x12ciclos).
- Adriamicina 60mg/m<sup>2</sup> día 1 y ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup> día 1 cada 21 días, seguido de docetaxel 100 mg/m<sup>2</sup> día 1 cada 21 días (AC x4->T x4).



- Adriamicina 60mg/m2 día 1 y ciclofosfamida 600 mg/m2 día 1 cada 21 días sin taxanos si contraindicación para su uso (ACx4).
- Docetaxel 75 mg/m2 día 1 y ciclofosfamida 600 mg/m2 día 1 cada 21 días (TCx4) sin antraciclinas por riesgo de cardiotoxicidad.
- 5-Fluoracilo 600 mg/m2 día 1, epirubicina 90 mg/m2 día 1 y ciclofosfamida 600 mg/m2 día 1 cada 21 días, seguido de paclitaxel 100 mg/m2 semanal (FECx4/Tx8).
- 5-Fluoracilo 500 mg/m2 día 1, epirubicina 100 mg/m2 día 1 y ciclofosfamida 500 mg/m2 día 1 cada 21 días, seguido docetaxel 100 mg/m2 día 1 cada 21 días (FECx3/Tx3).
- Docetaxel 75mg/m2 día 1, adriamicina 50 mg/m2 día 1 y ciclofosfamida 500 mg/m2 día 1 cada 21 días (TACx6). Se recomienda soporte con filgrastrim.
- Carboplatino AUC 6 día 1, docetaxel 75 mg/m2 día 1 cada 21 días por 6 ciclos. Se recomienda soporte con filgrastrim.

Tras realizar el tratamiento neoadyuvante y posterior cirugía, se puede continuar con tratamiento adyuvante sistémico en casos seleccionados. Se completará el total de ciclos del esquema de quimioterapia elegido en neoadyuvancia si no se ha completado previamente y se valorará añadir capecitabina 1250 mg/m2 monoterapia durante 14 días en ciclos de 21 días x 6 ciclos, si se objetiva enfermedad residual en la pieza anatomopatológica tras el tratamiento neoadyuvante, según los resultados del estudio CREATE-X<sup>31</sup>.

## 2. RH positivo y HER2 negativo.

Si se plantea neoadyuvancia, se recomienda el empleo de QTNA en lugar de terapia hormonal neoadyuvante al asociarse a mayores tasas de respuesta en menor tiempo<sup>32</sup>. Los esquemas de quimioterapia más empleados contienen antraciclinas y taxanos (empleándose similares esquemas de quimioterapia que enfermedad "RH negativo y HER2 negativo", *ver apartado previo*).

Sin embargo, la terapia hormonal neoadyuvante durante 6 meses podría ser una opción en pacientes con contraindicación a quimioterapia (edad avanzada, comorbilidades, etc.). Aquellos tumores con una fuerte expresión de RH por expresión de RE  $\geq 50\%$  ó una puntuación Allred (combinación de % de células que expresan RH positivos e intensidad) de 7-8 sobre 8 y bajo índice de proliferación celular (Ki-67  $< 10-15\%$ ) parecen tener mayor probabilidad de responder a terapia endocrina neoadyuvante respecto a tumores con baja expresión de RH y alto índice de proliferación<sup>33</sup>. Si se emplea terapia endocrina neoadyuvante en pacientes postmenopausicas se recomienda usar inhibidor de aromatasas (letrozol, exemestano, anastrozol) según los datos publicados<sup>34,35</sup> que sugieren mayores tasas de respuesta clínica (OR 1.69, 95% IC 1.36-2.10), radiológica (OR 1.49, 95% IC 1.18-1.89) y de cirugía conservadora de mama (OR 1.62, 95% IC 1.24-2.12) respecto a tamoxifeno.





Actualmente múltiples estudios están investigando combinaciones de terapias incluyendo inhibidores de aromataasa con inhibidores de quinasa dependiente de ciclina (CDK) 4/6 (neoMONARCH<sup>36</sup>) ó Inhibidor PI3K (LORELEI<sup>37</sup>).

Tras realizar el tratamiento neoadyuvante y posterior cirugía, se continuará con tratamiento adyuvante sistémico tras la cirugía. Se completará el total de ciclos del esquema de quimioterapia elegido en neoadyuvancia si no se ha completado previamente, y dada la positividad en la expresión de RH, se deberá, además, realizar tratamiento hormonal adyuvante.

En los casos en que el tratamiento neoadyuvante haya sido hormonoterapia, se completará el tratamiento hormonal en el momento de la adyuvancia si la paciente sigue sin ser candidata a quimioterapia adyuvante. Se aconseja como mínimo 5 años de terapia hormonal complementaria (tamoxifeno o inhibidor aromataasa con/sin análogos LHRH según sea pre- o post-menopáusica), o incluso hasta un total de 10 años en el caso de tumores de alto riesgo (afectación ganglionar, alto grado tumoral, etc.)<sup>38,39</sup>.

### 3. HER2 positivo.

A los pacientes con carcinoma de mama HER2 positivo se le añadirá al régimen de quimioterapia, una terapia anti HER2 (trastuzumab con/sin pertuzumab). En agosto de 2000, la EMA dió la aprobación para añadir trastuzumab a tumores HER2+ dado el beneficio en tasas de RCp (38% vs 19%) y SLE (58% vs 43%) respecto al uso de quimioterapia sola<sup>40</sup>.

Posteriormente, en junio de 2015, se aprobó el uso de pertuzumab junto a trastuzumab y QTNA en pacientes con carcinoma de mama avanzado, inflamatorio, o estadio temprano si T>2cm ó afectación ganglionar. Pertuzumab se suele emplear entre 3-6 ciclos junto a taxanos y trastuzumab<sup>41,42</sup>.

Los esquemas de QTNA más frecuentemente empleados son:

- **TCH(P)x6:** Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup> intravenoso (iv), carboplatino iv AUC 6 y trastuzumab 6mg/kg iv ó 600 mg subcutáneo (sc) (dosis carga 8mg/kg) +/- Pertuzumab 420 mg iv (dosis de carga 840 mg iv) cada 21 días x 6 ciclos. En lugar de docetaxel puede emplearse paclitaxel semanal **wPCH(P)**.
- **ACx4TH(P)x4:** Adriamicina 60 mg/m<sup>2</sup> iv y ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup> iv cada 21 días x 4 ciclos Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup> iv x 4 ciclos + trastuzumab 6mg/kg iv ó 600 mg subcutáneo (sc) (dosis carga 8mg/kg) +/- Pertuzumab 420 mg iv (dosis de carga 840 mg iv) cada 21 días x 4 ciclos. En lugar de docetaxel puede emplearse paclitaxel semanal **ACx4wPx12+H(P)x4**. Puede emplearse el orden inverso: **TH(P)x4ACx4**.
- **FECx3TH(P)x3:** 5-Fluoracilo 500 mg/m<sup>2</sup>, epirrubicina 100 mg/m<sup>2</sup> y ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup> cada 21 días x 3-4 ciclos Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup> iv



+ trastuzumab 6mg/kg iv ó 600 mg subcutáneo (sc) (dosis carga 8mg/kg) +/- Pertuzumab 420 mg iv (dosis de carga 840 mg iv) cada 21 días x 3 ciclos.

- **TH(P)x4** **Cirugía** **FECx3**: Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup> iv + trastuzumab 6mg/kg iv ó 600 mg subcutáneo (sc) (dosis carga 8mg/kg) +/- Pertuzumab 420 mg iv (dosis de carga 840 mg iv) cada 21 días x 4 ciclos **Cirugía** 5-Fluoracilo 600 mg/m<sup>2</sup>, epirrubicina 90 mg/m<sup>2</sup> y ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup> cada 21 días x 3 ciclos.
- En pacientes frágiles y en aquellos tumores estadio I (T1N0) se podría valorar dar esquemas más simplificados como **paclitaxel y trastuzumab semanal** durante 12-18 semanas.

Tras los esquemas de neoadyuvancia, si hay respuesta tumoral y el tumor es operable, se procederá a intervención quirúrgica y se continuará con terapia anti-HER2 con Trastuzumab 6mg/kg iv ó 600 mg sc (dosis carga 8mg/kg) cada 21 días hasta completar 1 año.

Los nuevos datos publicados por von Minckwitz et al. indican que si hay enfermedad residual tras la neoadyuvancia con quimioterapia basada en taxanos (con/sin antraciclinas) y trastuzumab, el tratamiento adyuvante tras la cirugía con Ado-trastuzumab emtansine (TDM-1) 3.6 mg/kg cada 21 días x 14 ciclos en lugar de emplear trastuzumab, mejora la SLE (88% vs 77%; HR 0.5, IC 0.39-0.64). Sin embargo, el uso de TDM-1 adyuvante no parece mejorar la SLE (HR 0.54, 95% IC 0.27-1.06) si se ha empleado doble terapia her2 (trastuzumab + pertuzumab) en el tratamiento neoadyuvante<sup>43</sup>.

Si además el tumor expresa receptores hormonales, siendo RH positivo y HER2 positivo, se añadirá terapia hormonal adyuvante.

- **Cirugía post-neoadyuvancia.**

Una vez completado el tratamiento neoadyuvante, un examen físico es necesario para valorar la respuesta tumoral. Se realiza, además, la misma prueba de imagen previa a la QTNA (ecografía o resonancia magnética mamaria/axilar) si es necesaria, para valorar la actitud quirúrgica.

Si el tumor no experimenta respuesta al tratamiento sistémico neoadyuvante y permanece inoperable, se considerará terapia sistémica adicional y/o tratamiento radioterápico. En cambio, si el tumor responde tras el tratamiento sistémico neoadyuvante y es operable se procederá a intervención quirúrgica.

Se realiza mastectomía o cirugía conservadora de mama (tumorectomía) según proceda y valoración axilar para actuar en consecuencia.

La mastectomía está indicada en aquellos casos sin indicación de cirugía conservadora de mama, como carcinoma de mama multicéntrico, microcalcificaciones difusas, gran tamaño tumoral en relación al tamaño de la mama a pesar de la terapia neoadyuvante, mutación BRCA, carcinoma de mama



inflamatorio, etc. Para el resto de situaciones, se puede valorar realizar cirugía de mama conservadora.

En el manejo quirúrgico axilar es importante la evaluación ganglionar previa al tratamiento neoadyuvante. Así, es importante el examen físico axilar en todos los pacientes con nuevo diagnóstico de carcinoma de mama. Si hay palpación sospechosa ganglionar en la exploración, es necesaria su confirmación con una biopsia con aguja gruesa (BAG) o con una punción aspiración con aguja fina (PAAF) para descartar falsos positivos por ganglios reactivos u otras patologías benignas. Si no se palpan ganglios sospechosos en la exploración, se ha de realizar una prueba de imagen complementaria (ecografía axilar) y si hay hallazgo ganglionar sospechoso en la imagen, se realiza BAG o PAAF para su confirmación histológica. Una vez confirmado la afectación ganglionar y si la paciente va a recibir tratamiento neoadyuvante, es necesario realizar un marcaje del ganglio sospechoso ("clip" radiopaco o magnético, semilla radiomarcada, etc.), para poder seguir identificándose en el caso que se produzca respuesta patológica axilar tras neoadyuvancia y se quiera intentar evitar la linfadenectomía axilar completa. Algunos especialistas prefieren realizar excisión ganglionar del ganglio sospechoso mediante biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC) pre-neoadyuvancia, en lugar de marcaje y neoadyuvancia, con el inconveniente de que se pierde la información pronóstica ganglionar de respuesta a neoadyuvancia.

El manejo ganglionar axilar tras neoadyuvancia más ampliamente aceptado es el siguiente<sup>44-46</sup>:

Si **cN+** previo a neoadyuvancia:

- Si **cN2-3**, independientemente de la respuesta a la QTNA, se realizará linfadenectomía axilar.
- Si **cN1** previo a la neoadyuvancia:
  - Si ycN+ post-neoadyuvancia:  
Linfadenectomía axilar.
  - Si ycN0 post-neoadyuvancia:  
Linfadenectomía axilar  
ó  
BSGC: Si ypN0--> Radioterapia.  
Si ypN+--> Linfadenectomía axilar.

Si **cN0** previo a neoadyuvancia, se realiza BSGC:

- **pN0**--> No más intervención sobre axila si sigue siendo N0 tras neoadyuvancia.
- **pN1** (1-2 ganglios positivos) --> Se tomará una actitud individualizada tras la neoadyuvancia (radioterapia ó linfadenectomía axilar con/sin radioterapia).
- **pN+** (≥3 ganglios positivos) -->Linfadenectomía axilar.



- **Radioterapia.**

El objetivo de la radioterapia tras cirugía es eliminar cualquier potencial resto tumoral restante tras mastectomía o tumorectomía para reducir el riesgo de recurrencia locorregional y mejorar supervivencia.

La radioterapia tras la cirugía en pacientes que han recibido previamente neoadyuvancia, se basa en las características del tumor y en el estadio de la enfermedad al diagnóstico previo al tratamiento neoadyuvante, en el tipo de cirugía realizada y los resultados anatomopatológicos tras la QTNA<sup>47,48</sup>.

Tras mastectomía se valorará dar radioterapia en la pared costal, región infraclavicular, supraclavicular, cadena mamaria interna y región axilar si cN1 aunque tras neoadyuvancia se consiga respuesta completa (ypN0) ó en cN+ tras neoadyuvancia.

Además, se valora radioterapia (en pared costal y en regiones ganglionares) en pacientes con enfermedad mamaria residual tras mastectomía y neoadyuvancia. Y en ausencia de datos prospectivos para establecer las indicaciones de radioterapia en pacientes con RCp tras neoadyuvancia se suele indicar radioterapia en estadio III, independientemente de la respuesta a neoadyuvancia.

Tras tumorectomía, se indica la irradiación de toda la zona mamaria con/sin sobreimpresión en la zona donde estaba el tumor independientemente de la respuesta a la neoadyuvancia. Además, se considera emplear radioterapia en la región infraclavicular, supraclavicular, cadena mamaria interna y región axilar si cN1 aunque tras neoadyuvancia se consiga respuesta completa (ypN0) ó en cN+ tras neoadyuvancia. En estadio III, independientemente de la respuesta, se valora dar radioterapia en región ganglionar.

En aquellos casos donde se realice linfadenectomía axilar completa con características de bajo riesgo, se podría valorar no dar irradiación axilar.

En estadio II que experimenta respuesta completa a tratamiento neoadyuvante y se realiza mastectomía o tumorectomía, se individualizará el tratamiento radioterápico según otros factores de riesgo del tumor. Actualmente está en marcha el estudio fase III randomizado NSABP B-51 para valorar el papel de la radioterapia en áreas ganglionares en pacientes con cN+ pre-neoadyuvancia (estadios IB, II) con RCp ganglionar tras neoadyuvancia sometidos a mastectomía ó tumorectomía<sup>49</sup>.

### 1.1.7. La respuesta completa patológica (RCp).

- **Valor pronóstico.**



El uso del tratamiento sistémico neoadyuvante puede proporcionar información pronóstica muy relevante<sup>50,51</sup>. La obtención de una RCp tras la terapia neoadyuvante se asocia favorablemente a mejores resultados en SLE y SG en el carcinoma de mama en estadio temprano<sup>52,53</sup>. Así, la RCp es un destacado marcador subrogado con valor pronóstico mayor en aquellos subtipos tumorales de mayor agresividad tumoral (triple negativo ó HER2+)<sup>32,54</sup>. Sin embargo, y aunque los tumores RH+ tienen mejores tasas de supervivencia debido en parte a la naturaleza intrínseca del subtipo y al uso de terapia hormonal en adyuvancia, aquellos que logran RCp también tienen mejores tasas de SG respecto a los tumores RH+ sin RCp (aunque sólo un bajo porcentaje de los pacientes con RH positivo logran RCp tras QTNA)<sup>53,55</sup>.

El estudio **EORTC 10902**<sup>50</sup> tras una mediana de seguimiento de 10 años mostró que el uso de neoadyuvancia no era inferior al empleo de la adyuvancia en términos de SG (HR = 1.09; IC 95% 0.83-1.42; p = 0.54), SLE (HR = 1.12; IC 95% 0.90-1.39; p = 0.30) o recurrencia locorregional (HR = 1.16; IC 95% 0.77-1.74), con mayores tasas de cirugía conservadora a favor de la neoadyuvancia. Similares resultados se objetivan en el estudio **NSABP B-18**<sup>51</sup>, con una mayor tasa de cirugía conservadora con tratamiento neoadyuvante respecto a la terapia adyuvante (67.8% vs 59.8%), similar tasa de recurrencia en mama ipsilateral tras cirugía conservadora (7.9% vs 5.8%, p = 0.23) y no diferencias en SLE (p = 0.99), SLED (p = 0.70) y SG (p = 0.83) entre ambos grupos. Además, se objetivó mejor SLE en los tumores que alcanzaron RCp respecto aquellos con no RCp, respuesta parcial clínica (RPC) o no respuesta clínica (NRc) con tasas del 85.7%, 76.9%, 68.1% y 63.9%, respectivamente, p < 0.0001. El estudio **NSABP B-27**<sup>52</sup> demostró que la adición de docetaxel neoadyuvante tras 4 ciclos de AC mejoraba la respuesta completa clínica (40.1% vs 63.6%; p < 0.001), la RCp (13.7% vs 26.1%; p < 0.001) y la proporción de pacientes con negativización ganglionar (50.8% vs 58.2%; p < 0.001).

Siguiendo la misma línea de correlación entre RCp y supervivencia, e incluso según subtipo tumoral, el autor **Kuerer HM et al.**<sup>53</sup> mostró con el uso de QTNA basada en doxorubicina, una tasa de RCp-mama del 16% y RCp-global (mama y ganglionar) del 12%, siendo la RCp-mama predictiva de alcanzar RCp-ganglionar (p < 0.01). Las tasas de SG y SLE a los 5 años eran mayores en el grupo con RCp-global (89% y 87%, respectivamente) respecto al grupo de no-RCp (64% y 58%, respectivamente), p < 0.01. Además, observó una mayor tasa de RCp en tumores con RE – (p < 0.01) siendo el estado del RE y el grado tumoral factores independientes del tamaño tumoral en el análisis multivariante.

En tumores HER2 +, destaca el estudio **TECHNO**<sup>56</sup> que añadió trastuzumab al esquema con epirubicina, ciclofosfamida y paclitaxel neoadyuvante y muestra la RCp como factor pronóstico para SLE (HR 2.5; IC 95%, 1.2 - 5.1; p = 0.013) y para SG (HR 4.9; IC 95%, 1.4 -17.4; p = 0.012).

El metaanálisis de **Houssami et al.**<sup>57</sup> también demuestra que el subtipo tumoral está asociado a la tasa de RCp (p < 0.0001): 8.3% (6.7-10.2%) en RH+HER2- [OR 1/referente], 18.7% (15.0-23.1%) en HER2+RH+ [OR 2.6], 31.1% (26.5-36.1%) en



triple negativo [OR 5.0] y 38.9% (33.2-44.9%) en HER2+RH- [OR 7.1]; sin embargo, aunque la tasa de RCp (% RCp) fue mayor en HER2+RH- respecto al subtipo triple negativo debido al uso de la terapia anti-HER2, el % de RCp fue muy similar para estos dos subtipos (y OR = 5.0 en ambos) cuando se excluyeron del modelo los estudios que usaban terapia dirigida anti- HER2 junto a la QTNA.

**von Minckwitz G et al.**<sup>54</sup> trató de definir la RCp como la ausencia de tumor residual invasivo e in situ tanto en mama como ganglionar al discriminar mejor los pacientes con mejores y peores resultados. Este autor logró demostrar que la SLE era mayor en pacientes sin tumor residual invasivo/in situ en mama o ganglionar respecto a tener tumor residual in situ, tumor residual invasivo sólo ganglionar, foco invasivo residual sólo en mama o enfermedad residual invasiva macroscópica (p < 0.001). Además, en el análisis por subgrupos según el subtipo tumoral, la RCp se asociaba a mejor SG en tumores HER2+RH- y triple negativo, y a mejor SLE en luminal B HER2- (p = 0.005), HER2 puro (p < 0.001) y en triple negativo (p < 0.001) pero no en luminal A o en luminal B HER2+ (p = 0.39).

Con todos los datos hasta el momento, en el año 2014 se publicaron los resultados del “pooled analysis” del Collaborative Trials in Neoadjuvant Breast Cancer (CTNeoBC)<sup>32</sup>. Este estudio fue una colaboración internacional dirigida por la FDA (United States Food and Drug Administration, Agencia de Medicamentos y Alimentación de EEUU) e incluyó 12 ensayos clínicos y un total de 11.955 pacientes. Los investigadores informaron que la RCp global (mama y axilar), y no solo cuando la RCp se limitaba en la mama, se asociaba con mejores resultados a largo plazo siendo un prometedor marcador surrogado de supervivencia, sobre todo en la enfermedad triple negativa y HER2+. Tras estos resultados, la RCp fue establecida por la FDA como un “endpoint” aceptable para facilitar la aprobación acelerada de agentes como pertuzumab, fármaco que se aprobó rápidamente después de demostrar una mejora absoluta del 18% en RCp en el estudio **NeoSphere** en tumores HER2+ localmente avanzados<sup>42,58</sup>.

El análisis retrospectivo de **Fayanju et al.**<sup>59</sup> confirma y amplía aún más los hallazgos del estudio CTNeoBC al demostrar que la RCp global (mama y ganglionar) es un efectivo “endpoint” en los ensayos clínicos para todos los subtipos tumorales, mientras que el valor pronóstico de la RCp limitado a la mama o a los ganglios debe ser considerado en el contexto de la biología intrínseca del tumor. En este análisis realizado sobre 20.000 pacientes con carcinoma de mama cT1-T3/N0-N1 sometidos a cirugía tras tratamiento neoadyuvante, el 19% logró RCp tanto en mama como en axila, el 1.5% solo en mama y el 3.4% sólo en axila. Los pacientes que consiguieron RCp-global (mama y ganglionar) presentaron un aumento en la supervivencia global comparado con aquellos pacientes que no experimentaron cambios en su estadio inicial (SG a los 5 años del 95%, sin diferencias entre los pacientes que eran cN0 (0.95, IC 95% 0.93- 0.96) o cN1 (0.94, IC 95% 0.92- 0.96) al diagnóstico. En cambio, cuando se alcanzaba RCp-mama, solo el subtipo triple negativo objetivó aumento de supervivencia (HR 0.58, IC 95% 0.37-0.89). Y, cuando se alcanzaba RCp-



ganglionar, la supervivencia aumentaba en triple negativo (HR 0.55, IC 95% 0.39-0.76) y en RH+HER2- (HR 0.54, IC 95% 0.33-0.89).

Los resultados del metaanálisis presentado en SABCS en diciembre de 2018 por **Spring et al.**<sup>60</sup> evaluó la asociación entre la RCp después de la terapia neoadyuvante y la recurrencia posterior, así como el impacto de la quimioterapia adyuvante en ello. Se analizaron 52 estudios entre 1999 y 2016 incluyendo un total de 27.895 pacientes sometidos a una gran variedad de tratamientos. Los pacientes con RCp tuvieron mejor SLE (HR 0.31, IC 95% 0.24-0.39), particularmente el subtipo triple negativo (HR 0.18, IC 95% 0.10-0.31) y HER2+ (HR 0.32, IC 95% 0.21-0.47). Las pacientes RH+HER2- con RCp también mostraron una mayor SLE, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Similares resultados se objetivaron en SG cuando se alcanzaba RCp (HR, 0.22; IC 95% 0.15-0.30), y esta tendencia era consistente entre todos los subtipos (triple negativo, HER2+ y RH+HER2-). Además, la asociación de RCp y una mayor SLE fue similar entre los pacientes que recibieron quimioterapia adyuvante posterior a la neoadyuvancia (HR 0.36, IC 95% 0.19-0.67) y los que no la recibieron (HR 0.36, IC 95% 0.27-0.54),  $p = 0.060$ . Estos resultados apoyan la necesidad de evaluar la utilidad clínica de escalar/desescalar estrategias en la adyuvancia según los resultados en RCp. Así, en subtipos triple negativo y en HER2+ se valora añadir terapia adyuvante con capecitabina o ado-trastuzumab emtansine (TDM-1) respectivamente, según los resultados y consideraciones de los estudios **CREATE-X**<sup>31</sup> y de **Minckwitz et al.**<sup>43</sup> en un intento de mejorar los resultados de los pacientes tras tratamiento neoadyuvante.

- **Sistemas de evaluación de la RCp.**

Múltiples autores han intentado definir el concepto de respuesta tumoral al tratamiento por su relación con el pronóstico. Estas clasificaciones tienen en cuenta el tamaño tumoral, la presencia de carcinoma in situ, la cantidad de celularidad residual, la apariencia histológica, el grado, y la respuesta ganglionar, entre otras variables, relacionadas con el efecto de la quimioterapia. Sin embargo, no existe acuerdo sobre la mejor definición de la respuesta patológica completa. Hay sistemas que aceptan la presencia de carcinoma in situ y/o invasión tumoral linfovascular sin evidencias de carcinoma infiltrante como respuesta patológica completa, así como la inclusión o no de la afectación ganglionar. [Tabla 8.](#)

Clasificación	Descripción
Chevallier et al. (1993) <sup>63</sup>	Clase 1 (RCp): desaparición de todo el tumor. Clase 2 (RCp): presencia de CIS, ausencia de tumor infiltrante y ganglios negativos. Clase 3 (RPp): presencia de carcinoma infiltrante con alteraciones estromales. Clase 4 (NRp): pequeñas alteraciones de la apariencia inicial del tumor.



Sinn et al. (1994) <sup>64</sup>	Grado 0: no efecto. Grado 1: resorción y esclerosis tumoral. Grado 2: foco infiltrante mínimo de 5 mm o menor. Grado 3: solo focos no invasivos residuales. Grado 4: no se detectan células tumorales viables.
Sataloff et al. (1995) <sup>65</sup>	T-A (RCp): efecto terapéutico total o casi total. T-B (RPP): más del 50% de efecto terapéutico, pero menos de un efecto total o casi total. T-C (RPP): menos del 50% de efecto terapéutico, pero evidente. T-D (NRp): ausencia de efecto terapéutico.
Honkoop et al. (1998) <sup>66</sup>	Respuesta completa: ausencia de enfermedad residual en la mama y en la axila. Enfermedad residual mínima: presencia solo microscópica de enfermedad residual en la mama o en la axila. Enfermedad residual macroscópica: enfermedad macroscópica residual en la mama o en la axila.
Kuerer et al. (1998) <sup>67</sup>	RCp: ausencia de tumor residual. RPP: 1 cm <sup>3</sup> o menos de tumor macroscópico residual (se incluyen los focos microscópicos de células residuales). NRp: más de 1 cm <sup>3</sup> de tumor macroscópico residual.
NSABP B-18 (2002) <sup>68</sup>	RCp: ausencia de células tumorales infiltrantes. RPP: presencia de células tumorales individuales o en pequeños grupos en un estroma desmoplásico o hialinizado. NRp: el tumor no muestra ninguno de los cambios descritos anteriormente.
Miller y Payne (2003) <sup>61</sup>	Grado 1 (NRp): ausencia de respuesta. Grado 2 (RPP): reducción menor (inferior al 30%). Grado 3 (RPP): algo de reducción (entre el 30 y el 90%). Grado 4 (casi RCp): reducción marcada (superior al 90%). Grado 5 (RCp): ausencia de cáncer infiltrante residual. Puede haber CIS.
Kuroi et al. (2003) <sup>69</sup>	N-A: axila negativa verdadera. N-B: ganglios axilares positivos sin respuesta terapéutica. N-C: ganglios axilares positivos, pero con evidencias de respuesta terapéutica. N-D: ganglios axilares positivos inicialmente, pero negativizados tras tratamiento.
International Expert Panel (2003) <sup>72</sup>	Próximo a RCp: desaparición casi total del tumor infiltrante. Casi RCp: desaparición total o casi total del tumor infiltrante. Extensa RCp: ausencia de tumor infiltrante residual. Estricta RCp: ausencia de células tumorales en la mama RCpinf: presencia de solo CIS.





	Extensa RCp(m+g): ausencia de tumor infiltrante residual en la mama y en los ganglios. Estricta RCp(m+g): ausencia de células tumorales en la mama y en los ganglios.
Symmans et al. Carga tumoral residual (2007) <sup>62</sup>	RCB-0 (RCp): ausencia de tumor mamario y ganglionar. RCB-I (RPP): respuesta parcial. Mínima carga tumoral. RCB-II (RPP): respuesta parcial. Moderada carga tumoral. RCB-III (NRp): quimiorresistencia. Extensa carga tumoral.
Provenzano et al. (2015) <sup>71</sup>	RCp ó enfermedad residual en mama y ganglionar. RCB: tamaño, celularidad, % Tis, nº ganglios positivos, tamaño de la metástasis más grande, RCB score. Estadio ypTN.
American Joint Committee on Cancer (2017) <sup>18</sup>	Respuesta completa clínica (RCc) ycT0N0; respuesta completa patológica (RCp) ypT0N0 ó ypTisN0. La presencia de ILV, o focos aislados de tumor excluyen la respuesta completa patológica.  Respuesta parcial (RPP ó RPP): Disminución del tamaño o afectación T y/o N pero sin constituir RC.  No respuesta (NR): No cambios o aumento del tamaño o afectación T y/o N.

Tabla 8. Sistema de evaluación de la respuesta completa patológica. *Adaptado de la Revista de Senología y Patología Mamaria*<sup>70</sup>.

Actualmente las clasificaciones más empleadas son el sistema de Miller & Payne<sup>61</sup>, el sistema TNM de la AJCC<sup>18</sup> y la carga tumoral residual (RCB, residual cancer burden)<sup>62</sup>. Anteriormente, se emplearon métodos más imprecisos basados en la evaluación micro/macrocópica<sup>63-68,69,70</sup> del tejido tumoral. [Tabla 8](#).

El sistema de Miller and Payne (M&P)<sup>61</sup> se basa en la reducción de la celularidad y grado histológico del tumor primario en mama post-neoadyuvancia sin incluir la valoración de los ganglios linfáticos. Este sistema de gradación del 1-5 se estableció en 2003 como predictor independiente de supervivencia al observarse una correlación estadísticamente significativa entre la respuesta completa patológica con la SLE ( $p = 0.04$ ) y con la SG ( $p = 0.02$ ):

- Grado 1: No cambios o mínimas alteraciones en las células tumorales pero sin cambios en la celularidad global.
- Grado 2: Reducción discreta de la celularidad tumoral menor al 30%.
- Grado 3: Reducción marcada de la celularidad tumoral del 30-90% de la masa tumoral global.
- Grado 4: Una marcada desaparición de las células tumorales permaneciendo sólo pequeños “clusters” residuales y células aisladas. Pérdida de más del 90% de las células tumorales. Focos microscópicos de carcinoma invasivo.



- Grado 5: No evidencia de tumor residual invasivo. No se evidencian células tumorales, sólo permanece estroma vascular fibroblástico con macrófagos. El carcinoma ductal in situ puede estar presente.

Los grados 1-4 se identifican como respuesta parcial, mientras que el grado 5 se corresponde con respuesta completa patológica.

Dado que este sistema no evalúa la respuesta ganglionar tras QTNA, Kuroi et al.<sup>69</sup> realiza una propuesta con valoración A-D para completar el sistema previo:

- A: Ganglios linfáticos negativos, sin cambios atribuibles a la quimioterapia.
- B: Ganglios linfáticos positivos, sin cambios atribuibles a la quimioterapia.
- C: Ganglios linfáticos positivos, pero con evidencia de respuesta parcial.
- D: Ganglios linfáticos negativos, con cambios atribuibles a la quimioterapia.

El sistema elaborado por Symmans et al.<sup>62</sup> que establece la carga tumoral residual (RCB) se basa en el cálculo de una fórmula matemática que incluye el tamaño del lecho tumoral (determinado en mm es su dimensión mayor y menor), el porcentaje del área global de celularidad tumoral, el porcentaje de tumor in situ, el número de ganglios metastásicos y el tamaño en mm de la metástasis mayor. Con ello se obtiene un resultado numérico con 3 decimales que se extrapola a una escala cualitativa de 4 categorías, correspondiendo el 0 a la respuesta patológica completa y el III a la ausencia de respuesta.

Tresserra<sup>70</sup> et al. determinó la variabilidad entre los dos sistemas de gradación (M&P y RCB) a la hora de catalogar la respuesta patológica a la QTNA en una misma lesión, correlacionando los resultados de ambos sistemas en la misma pieza tumoral. Según el sistema de gradación de MyP las lesiones se clasificaron en grado 1 (6%), 2 (25%), 3 (27%), 4 (27%) y 5 (14%). La clase RCB fue 0 (13%), I (13%), II (54%) y III (20%). La correlación entre MyP 5 y RCB 0, entre MyP 4 y RCB I, y entre MyP 2 y RCB III fue buena. Se detectaron más discrepancias entre MyP 1, 2, 3 y RCB II. Así, aunque la correlación en la respuesta completa es buena entre los 2 sistemas de gradación, hay discrepancias en la ausencia de respuesta entre ambos sistemas, pudiendo ser debido a la inclusión del estado ganglionar en el sistema RCB.

Tanto el sistema de MyP como el RCB se correlacionan de forma significativa con la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad. El sistema de RCB es más objetivo y reproducible que el de MyP, el cual en su versión original no incluye el estatus ganglionar, aunque posteriormente se ha efectuado una propuesta a tal efecto<sup>69</sup>. Sin embargo, no hay trabajos en la literatura en los que se aplique esta versión modificada del sistema de MyP, por lo que no hay correlación con la supervivencia ni la recidiva local. El sistema de MyP es quizás más impreciso, pues el grado 3 representa la respuesta patológica con una reducción entre el 30 y el 90% en la misma categoría. El sistema de RCB es más preciso, pero el hecho de considerar más variables lo hace más difícil de utilizar en la práctica.



El sistema TNM 8º edición AJCC<sup>18</sup> considera la respuesta patológica sin considerar la celularidad como hace el Sistema de Miller & Payne, sino el tamaño y la presencia o no de tumor residual ya sea clínica por exploración física o patológica por evaluación histopatológica. Dentro de la respuesta patológica establecen:

- Respuesta completa patológica en mama “ypT0 ó ypTis”; Respuesta completa ganglionar “ypN0”; Respuesta completa global (mama y ganglionar) “ypT0/ypTis ypN0”.
- Respuesta parcial patológica: Se objetiva una reducción, pero no completa desaparición tumoral.
- No respuesta si no hay cambios o incluso progresión tras quimioterapia neoadyuvante.

En 2015, Provenzano et al.<sup>71</sup> en colaboración con el Breast International Group-North American Breast Cancer Group (BIG-NABCG) intenta la estandarización del método para medir la respuesta patológica tras la neoadyuvancia. Este comité concluye que la evaluación de la enfermedad residual en la pieza quirúrgica post-neoadyuvancia debería incluir:

- Respuesta completa patológica o enfermedad residual: Descripción de presencia/ausencia de enfermedad residual invasiva o in situ en la mama y el estado de los ganglios linfáticos regionales.
- Carga tumoral residual (RCB, Residual Cancer Burden) como el método preferido para la cuantificación más detallada de la enfermedad residual. Especificar las dimensiones finales del tumor residual, celularidad, la proporción de tumor in situ, número de ganglios positivos, el tamaño de la metástasis más grande, así como la puntuación RCB.
- Estadio ypTN usando la edición más actualizada del American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control.

### 1.1.8 Seguimiento en carcinoma de mama estadio temprano.

El seguimiento de las pacientes "supervivientes" de cáncer de mama, es decir, sin evidencia de enfermedad tras el tratamiento, engloba una serie de recomendaciones para la vigilancia y detección de la recaída locorregional (mama contralateral y ganglios locorregionales), y la recaída metastásica de los órganos a distancia.

No sólo la detección de recaída, si la hubiera, sino también es de importancia, el abordaje global del paciente con el manejo de las toxicidades secundarias al tratamiento aplicado y necesidades como la fertilidad y contracepción tras el cáncer de mama o el abordaje psicológico, entre otros.

Así, en cada visita se deberá efectuar una anamnesis completa evaluando la presencia de comorbilidades, evaluar la adherencia hormonal en el caso de que lo esté recibiendo, detectar efectos secundarios y una exploración física del tejido mamario, pared costal o área de reconstrucción mamaria y cadenas ganglionares adyacentes. La frecuencia del control clínico, realizado por especialistas de la patología y/o Atención Primaria se realizará cada 4-6 meses durante los primeros



2-5 años, y posteriormente cada 6-12 meses los primeros diez años de seguimiento, según el grupo de riesgo. [Tabla 9.](#)

Además, se deberá realizar una mamografía anual bilateral durante toda la vida porque estas pacientes tienen un riesgo aumentado durante toda su vida de una recidiva local o segundos tumores respecto a la población sana.

Un seguimiento por los especialistas en Ginecología también está indicado en todas las pacientes de manera regular, y más aún si hubiera signos de alarma como sangrado vaginal por aparición de otras neoplasias en pacientes con/sin tratamiento hormonal.

Otras pruebas complementarias como análisis de sangre, medición de marcadores tumorales (CEA, CA125, Ca 15.3) o estudios de extensión como TAC ó gammagrafía ósea no se recomiendan de manera rutinaria sin la presencia de signos/síntomas que hagan sospechar recaída y/o afectación metastásica.<sup>73</sup>

Grupo riesgo	Recomendaciones
<b>Riesgo Bajo</b> -Tumor hormonossensible. -Tamaño ≤2cm (pT1). -No afectación ganglionar. -Bajo riesgo por plataforma genómica. -Carcinoma <i>in situ</i> .	-Control clínico cada 6 meses, compartido con Atención Primaria (AP) durante 5 años. -Tras los 5 años, control sólo por AP. -Mamografía anual.
<b>Riesgo intermedio</b> -Tumor hormonossensible. -Tamaño entre 2-5 cm (categoría pT2). -Ausencia de metástasis ganglionares ó afectación 1-3 ganglios. -Riesgo intermedio por plataforma genómica.	-Control cada 4 meses compartido con AP los dos primeros años. -Después cada 6 meses hasta el quinto año. -Posteriormente será control solo por AP. -Mamografía anual.
<b>Riesgo alto</b> -Tumor sin expresión de RH. -Tumor con amplificación de HER2. -Tumor de alto riesgo por una plataforma genómica. -Tumor con metástasis en > 3 ganglios axilares. - <b>Tumor tratado con neoadyuvancia.</b> -Tumor localmente avanzado.	-Control cada 4 meses compartido con AP durante 5 años. -Tras el quinto año cada 6 meses compartida con AP hasta los 10 años. -Posteriormente control solo por AP. -Mamografía anual.



Tabla 9. Seguimiento del carcinoma de mama estadio temprano. *Adaptado de Barnadas Agustí et al.*<sup>73</sup>

## 1.2 VITAMINA D.

### 1.2.1 Generalidades.

Existen dos formas de vitamina D (vitamina D3 o colecalciferol y vitamina D2 o ergocalciferol) que son producidas por la radiación ultravioleta B o aportadas a través de la dieta. Ambas formas se transforman en calcidiol o 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] a través de la enzima 25-hidroxilasa (CYP27A1) en el tejido hepático. Finalmente, a través de la enzima mitocondrial 1 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP27B1) se sintetiza la forma activa de la vitamina D (1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D o 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> o calcitriol) en el tejido renal. La enzima 24-hidroxilasa (CYP24A1) también juega un papel importante en la homeostasis de la vitamina D, al revertir el proceso convirtiendo la forma activa 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en metabolitos inactivos<sup>74</sup>. La vida media de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> es sólo de 4-6 horas, por lo que las mediciones séricas de vitamina D recomendadas son las de 25(OH)D, con una vida media de 2-3 semanas<sup>75</sup>. La concentración sérica óptima de 25(OH)D es controvertida al no haber un acuerdo unánime entre los expertos. El rango de común acuerdo es 75-100 nmol/L (30-40 ng/ml). Mientras que niveles <50 nmol/L (<20 ng/ml) se consideran subóptimos para la salud ósea, la correcta concentración para la salud extraesquelética no ha sido establecida. Las guías del Instituto de Medicina (IOM, Institute of Medicine) indican deficiencia si la concentración de vitamina D sérica es <30 nmol/L (<12 ng/ml), insuficiencia 30-50 nmol/L (12-20 ng/ml) y suficiencia si  $\geq$  50 nmol/L ( $\geq$ 20 ng/ml)<sup>76</sup>. Sin embargo, la Sociedad Europea de Endocrinología define suficiencia si  $\geq$ 75nmol/L ( $\geq$ 30 ng/ml)<sup>77</sup>. Por lo tanto, la prevalencia de déficit de vitamina D depende de la definición usada (<50 ó <75 nmol/L [<20 ó <30 ng/ml]). Así, se ha descrito que el 88% de la población mundial tiene concentraciones plasmáticas de 25(OH)D por debajo de 30ng/ml, un 37% valores <20ng/ml y hasta un 7% niveles medios inferiores a 10 ng/ml<sup>78</sup>. En España, esta situación es similar. En individuos mayores de 65 años se han descrito concentraciones de 25(OH)D por debajo de 20ng/ml en un 80-90% de las personas, y en población menor de 65 años el déficit alcanza alrededor del 40% de la población española<sup>79</sup>.

Se ha podido describir la asociación que la hipovitaminosis D tiene con varias enfermedades, y cada vez más estudios se realizan para encontrar esa relación con múltiples patologías. Una observación constante son los niveles inferiores de 25(OH)D en los pacientes con algún tipo de patología, oncológica o no, con respecto a la población sana<sup>80</sup>.

Los recientes resultados del estudio prospectivo observacional realizado en el Servicio de Medicina Intensiva del Hospital del Mar en Barcelona por Zapatero et al. mostraron que el 74% de los pacientes en el momento del ingreso en la Unidad de



Cuidados Intensivos presentaba niveles bajos de 25(OH)D. Los niveles eran significativamente inferiores en el grupo de pacientes que falleció comparado con el grupo de supervivientes (8.14ng/ml [6.17-11.53] vs 12ng/ml [7.1-20.3], p 0.04), siendo el valor de sangre de 25(OH)D al ingreso un factor de riesgo independiente. Además, el punto de corte más acorde para predecir mortalidad fue de 10.9 ng/ml, nivel que también se asoció a mayores tasas de fracaso renal agudo (13 vs 29%, p 0.02)<sup>81</sup>.

En las enfermedades inflamatorias crónicas del aparato digestivo (EII) como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa también es un tema de actualidad, ya que niveles subóptimos de 25(OH)D, hallazgo muy común en EII, estarían en relación con mayores brotes de enfermedad, hospitalizaciones y cirugías por complicaciones y menor respuesta a tratamiento con inhibidores TNF. Se produce una alteración del mecanismo de defensa anti-oxidativo con una menor expresión del receptor de la vitamina D (vitamin D receptor, VDR) en macrófagos y granulocitos, alterando la permeabilidad de la mucosa intestinal con una mayor apoptosis de las células epiteliales y una mayor expresión de citokinas pro-inflamatorias, lo que agravaría las síntomas de la EII<sup>82,83</sup>.

Múltiples estudios se han desarrollado para intentar correlacionar el déficit/insuficiencia de la vitamina D y el riesgo de desarrollo de tumores. En carcinoma de mama los resultados muestran generalmente una asociación inversa entre los niveles de vitamina D y el riesgo de cáncer de mama. Metaanálisis como el realizado por Chen et al.<sup>84</sup> o estudios de casos y controles<sup>85</sup> han reportado que las mujeres con niveles más elevados en sangre de 25(OH)D se asocian con una disminución del 45-50% (OR 0.55, IC 95% 0.38-0.80) del riesgo de carcinoma de mama comparado con mujeres con niveles más bajos de 25(OH)D. Incluso estudios randomizados como el realizado por Bolland et al.<sup>86</sup> (Women's Health Initiative) mostró que la coadministración de calcio y vitamina D disminuyó significativamente el riesgo global de cancer de mama un 14-20%. Desafortunadamente, hay datos discordantes como los de Neuhouser et al.<sup>87</sup> que en otro estudio randomizado de Women's Health Initiative no encontró asociaciones estadísticamente significativas (OR = 1.06; 95% CI = 0.78-1.43).

En cualquier caso, muchos son los datos que relacionan el déficit de vitamina D con un peor pronóstico de las pacientes con cáncer de mama, observándose niveles de 25(OH)D significativamente más elevados en el estadio temprano comparado con la enfermedad localmente avanzada o metastásica<sup>88</sup>. Incluso, parece haber relación de ese déficit con características como enfermedad localmente avanzada ó metastásica, ganglios linfáticos positivos, elevados índices de proliferación y receptores hormonales negativos<sup>89</sup>. Así, hasta un 94% de mujeres diagnosticadas de carcinoma de mama con niveles de vitamina D <20ng/mL desarrolla metástasis y un 73% fallece por enfermedad metastásica<sup>90</sup>.



## 1.2.2 Potencial papel inmunomodulador de la vitamina D en cáncer de mama.

Además del papel ampliamente conocido de la vitamina D en la homeostasis mineral y esquelética, la 1 $\alpha$ ,25-hidroxivitamina D (1,25(OH) $_2$ D $_3$ ) regula la diferenciación, crecimiento y función de las células del sistema inmunitario<sup>91,92</sup>.

Sus potentes propiedades inmunomoduladoras han promovido el uso de la vitamina D en la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas y autoinmunes<sup>93,94</sup>, así como en la reducción del riesgo de carcinogénesis<sup>95,96</sup>.

La 1,25(OH) $_2$ D $_3$  tras interactuar con el receptor de la vitamina D (VDR), localizado en las células del epitelio mamario regula la transcripción de múltiples genes diana con acción antitumoral (anti-proliferativa, pro-diferenciación, anti-metástasis y pro-apoptótica)<sup>97</sup>, lo que produce finalmente un efecto inmunomodulador sobre la inmunidad innata y adaptativa dado que una variedad de células del sistema inmunitario (macrófagos, células dendríticas y células T activadas) también expresan VDR y responden a la acción de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ <sup>98</sup>.

Los múltiples efectos de 1,25(OH) $_2$ D $_3$  sobre el sistema inmunitario pueden conducir a resultados clínicos divergentes, dada la complejidad del sistema.

Por un lado, se ha comunicado que la suplementación de la vitamina D puede favorecer el control sobre las enfermedades autoinmunes y trasplantes al disminuir la capacidad de las células presentadoras de antígenos<sup>99</sup>. La 1,25(OH) $_2$ D $_3$  inhibe la producción de citoquinas derivadas de macrófagos como la IL-1 $\alpha$ , IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ), lo que induce una disminución de la proliferación de células T, y de la producción de IL-2 e interferón gamma (IFN-  $\gamma$ )<sup>100</sup>. Aunque la 1,25(OH) $_2$ D $_3$  no tiene un efecto aparente sobre los linfocitos B, la supresión de las células T inhibe indirectamente la producción de anticuerpos por las células B. Además, aumentan los niveles de los linfocitos T reguladores (Tregs) con expresión del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4, Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) y de la proteína FOXP3 (Forkhead box protein P3) con acción inmunosupresora<sup>101,102</sup>.

Así, los análogos de la vitamina D $_3$  son potencialmente útiles como alternativas/coadyuvantes a las terapias inmunosupresoras convencionales en las enfermedades autoinmunes/ trasplantes.

Por otro lado, y con resultados que contrastan con lo anterior, la 1,25(OH) $_2$ D $_3$  induce la diferenciación de las células madre mieloides, lo que favorece la maduración de los promielocitos a monocitos y macrófagos, y las células supresoras derivadas mieloides (MDSCs) inmaduras a células maduras no supresoras<sup>103</sup>. De este modo, influye en la acción de los linfocitos, monocitos y macrófagos aumentando su citotoxicidad tumoral, fagocitosis y actividad bactericida<sup>104</sup>. Por tanto, el papel potencial de la suplementación con vitamina D en cáncer, radica en la acción inmunomoduladora que promociona la diferenciación de las células



supresoras derivadas mieloides (MDSCs) inmaduras en células maduras no supresoras, favoreciendo, a su vez, la función efectora de las células T CD8+ citotóxicas y de las células natural killer y la disminución de los niveles de los Tregs inmunosupresores como se explica a continuación.

Las MDSCs representan una población heterogénea de células mieloides inmaduras derivadas de progenitores CD34+ y caracterizadas por expresar CD33+, CD11b+ y -/low HLA-DR<sup>105</sup>. La expansión de las MDSCs se produce por la liberación de GM-CSF, VEGF y por la señalización de vías PI3K, Ras, JAK/STAT y NOTCH. Mientras que la acción supresora de las MDSCs es ejercida por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), citoquinas (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6), expresión de enzimas como indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) o arginasa-1 (ARG-1) y la producción de prostaglandina E2 (PGE2)<sup>106,107</sup>. La generación de ROS perjudica el reconocimiento mediante el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), el óxido nítrico (NO) inhibe al receptor de IL-2 afectando al receptor de célula T (TCR) y los altos niveles de ARG1 producen una depleción de L-arginasa y, en consecuencia, una disminución de la vida media del ARNm de la cadena CD3 $\zeta$  de las células T<sup>108</sup>.

De este modo, los tumores que inducen expansión de las MDSCs en su microambiente tumoral contribuyen a los mecanismos de supresión inmunitaria tumor-inducidos (inhibición de la función efectora de las células T CD8 citotóxicas y de las células natural killer; producción de elevados niveles de Tregs inmunosupresores)<sup>109</sup>. Resultado de la influencia de estas poblaciones celulares en el microambiente tumoral, se ha observado una correlación entre la presencia de elevados niveles de MDSCs en sangre periférica y el pronóstico, al asociarse con estadios avanzados, alta tasa tumoral, bajas tasas de supervivencia libre de progresión (SLE) y de supervivencia global (SG)<sup>110,111</sup>, así como con la respuesta al tratamiento oncológico al disminuir la respuesta a la quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia u otras terapias dirigidas<sup>112,113</sup>. Como ejemplo, Diaz-Montero et al.<sup>110</sup> correlacionó el aumento de niveles de MDSCs en sangre periférica con el estadio del cáncer de mama; los niveles de MDSCs eran de 1.96%, 2.46% y 3.77% en estadio I/II, III y IV, respectivamente.

Diferentes enfoques se han explorado para inhibir las MDSCs y lograr mejores respuestas terapéuticas y mayor supervivencia<sup>114</sup>, ya sea promocionando su diferenciación a células maduras no supresoras (all-trans retinoic acid (ATRA)<sup>115</sup>, Vitamin D3<sup>116</sup>) o deplecionando sus niveles con esquemas quimioterápicos clásicos (gemcitabina, 5-FU o docetaxel)<sup>117,118</sup>. Curiosamente, la vitamina D reprime los componentes del eje de señalización de la vía Notch (NF- $\kappa$ B, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, JAG1 y JAG2), relacionada en la expansión de las MDSCs inmaduras inmunosupresoras y en el desarrollo de las células tumorales a partir de células madres precursoras<sup>119,120</sup>.





Wiers et al.<sup>121</sup> observó en estudios preclínicos con modelos murinos que el crecimiento progresivo del carcinoma metastásico estaba asociado al incremento de los niveles de células CD34+ derivadas de la médula ósea con actividad supresora sobre las células T debido al aumento de la producción de GM-CSF por parte del tumor. Concluyó que este proceso se bloqueaba tras el tratamiento con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> al actuar como inductor de la diferenciación mieloide, inhibiendo la producción de GM-CSF por los fibroblastos del tumor y aumentando la producción de IFN-γ, lo que suponía disminución en el número de células CD34+ con perfil inmunosupresor e incremento de los niveles de células T CD8+ citotóxicas<sup>122</sup>.

Estos hallazgos resaltan el potencial terapéutico de la suplementación con vitamina D en pacientes con cáncer y con déficit de vitamina D al interrumpir la cascada inmunosupresora asociada a los precursores mieloides, lo que se refleja en una disminución de la enfermedad metastásica y de la recurrencia tumoral<sup>99,123</sup>.

### 1.3 INMUNIDAD Y CÁNCER DE MAMA

#### 1.3.1 Sistema inmunitario. Generalidades.

La respuesta inmunitaria es la respuesta coordinada y eficaz de un conjunto de tejidos, moléculas y células para proteger al organismo de patógenos y tumores. Destacan dos tipos de respuestas inmunitarias, la innata y la adaptativa. La respuesta inmunitaria **innata** incluye las barreras físicas, químicas y los componentes celulares y moleculares. Dentro de los componentes celulares se encuentran los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos), los monocitos, los macrófagos, las células natural killer (NK) y las células dendríticas. Los componentes moleculares están representados por el complemento, las citoquinas y las proteínas de fase aguda. Las respuestas inmunitarias **adaptativas** están exclusivamente compuestas por reacciones antígeno-específicas mediadas por los linfocitos T y los linfocitos B<sup>124</sup>.

A continuación, se desarrollan aquellos componentes más destacados, con papel no solo ante infecciones por patógenos, sino también con un papel en el desarrollo de tumores y que describimos, dada su importancia, también en nuestro trabajo.

Los **neutrófilos** son las células del sistema inmunitario más abundantes en sangre periférica (60-70% del total de leucocitos). Se originan del precursor de línea mieloide GFU-GEMM (unidad formadora de colonias que genera células mieloides) y posteriormente se diferencian, por acción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), de granulocitos-monocitos (GM-CSF) y de IL-3, a neutrófilo maduro expresando moléculas de adhesión como las integrinas CD11a y CD11b o la selectina CD62L, receptores Fc para la inmunoglobulina IgG, CD32 y CD64, y tras su activación, el CD16. Ante una infección o lesión tisular, los macrófagos



liberan G-CSF y GM-CSF, estimulando a la médula ósea a producir grandes cantidades de neutrófilos liberados al torrente sanguíneo ocasionando la neutrofilia. Cuando el neutrófilo es estimulado, emite pseudópodos para internalizar al patógeno, y se une a lisosomas formando un fagolisosoma, donde por la acción antimicrobiana de NADPH oxidasas, mieloperoxidasas, lisozimas, defensinas y lisozimas, interfiere en el metabolismo de los patógenos facilitando su eliminación. Además, realiza acciones inmunomoduladoras, antiinflamatorias, antitrombóticas y antitumorales<sup>125</sup>.

Las **MDSCs**, como en parte ya se ha comentado en el punto anterior, representan una población heterogénea de células mieloides inmaduras, caracterizadas por expresar CD33+, CD11b+ y -/low HLA-DR<sup>105</sup> y con acción supresora sobre el sistema inmunitario (inhibición de la función efectora de las células T CD8+ citotóxicas y de las células natural killer y aumento de Tregs inmunosupresores)<sup>117</sup> a través de vías relacionadas con la producción de ROS, PGE2, citoquinas (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6), expresión deIDO o ARG-1 y la producción de prostaglandina E2 afectando el reconocimiento mediado por MHC II y a la estructura del TCR del linfocito T<sup>106-108</sup>.

Los **monocitos** circulantes en sangre periférica representan entre el 5-10% de los leucocitos. Constituyen una población leucocitaria heterogénea con la función de iniciar la inflamación y la eliminación directa de los microorganismos patogénicos, pudiendo diferenciarse en los tejidos a macrófagos e, incluso, ante la presencia de IL-4 y GM-CSF, a células dendríticas. Las citoquinas esenciales para su diferenciación son el M-CSF, GM-CSF y la IL-3. Son críticos en la eliminación de bacterias, hongos y parásitos y se caracterizan por la expresión del CD115, el receptor del M-CSF y el CD11b. Los monocitos presentes en sangre periférica se dividen en tres subpoblaciones: monocitos clásicos (CD14+CD16-) para la eliminación de patógenos, inflamatorios (CD14+CD16+CCR2+) y reguladores (CD14-/dimCD16+) con acción inmunomoduladora; los monocitos extravasados a los tejidos se diferencian en múltiples tipos (macrófagos tisulares, macrófagos alveolares, células de Kupffer, células de la microglía, células dendríticas, entre otras). Presentan en su superficie una gran cantidad de receptores capaces de detectar microorganismos, lípidos y restos de células muertas y de producir ROS, prostaglandinas y citoquinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8, IL-10 o vEGF)<sup>126</sup>.

Los **macrófagos** representan el estado de diferenciación final de los monocitos. Mediante sus receptores de superficie, principalmente receptor de tipo toll (TLR, Toll-like receptor), reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, pathogen-associated molecular patterns) y patrones moleculares asociados a daño (DAMP, damage associated molecular patterns). De esta manera reconocen a patógenos u otras señales de estrés o daño, se activan y liberan grandes cantidades de citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-8, imprescindibles para iniciar la inflamación y el



reclutamiento celular. Mediante una fagocitosis mediada por receptor, internaliza los patógenos en compartimentos vesiculares intracelulares donde son destruidos e hidrolizados en fragmentos compuestos por unos pocos aminoácidos que serán posteriormente incorporados a las moléculas de histocompatibilidad de clase II. Además, los monocitos y macrófagos tienen un papel crítico en el desarrollo de tejidos, la homeostasis y la reparación de lesiones, participando en la orientación de la remodelación vascular, la estimulación de las células madre, y la reparación estructural de los tejidos. Consecuentemente, se han descrito dos tipos de macrófagos según su función y su capacidad de secretar citoquinas proinflamatorias o antiinflamatorias, los macrófagos M1 y los M2. Los macrófagos M1 se producirían en presencia de señales inflamatorias como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , mientras que los M2 en presencia de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10. Los primeros presentarían un papel antibacteriano, antivirico y antitumoral, secretando TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6 e IL-12; los segundos suprimirían la respuesta inmunitaria e intervendrían en la reparación del daño y regeneración tisular, secretando IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF y metaloproteinasas. El desequilibrio entre M1/M2 facilitará el desarrollo de tumores, obesidad o enfermedades autoinmunes<sup>127</sup>.

Las **células dendríticas** representan el 0,2-0,5% de los leucocitos en sangre periférica; sin embargo, se encuentran mayoritariamente en los tejidos. Su función principal consiste en enlazar el sistema inmunitario innato con el sistema inmunitario adaptativo. A diferencia de los monocitos, detectan patógenos, los procesan y se trasladan a los órganos linfoides secundarios más cercanos para presentar los antígenos y activar a los linfocitos T. Expresan moléculas de histocompatibilidad de clase I y II, moléculas de coestimulación (CD40, CD54/ICAM-1, CD58/IFA-3, CD80/CD86) y CD83 (marcador de activación de células dendríticas) y producen IL-12, IFN- $\alpha$  e IL-10. Las células dendríticas mieloides de tipo 1 pueden producir citocinas proinflamatorias como IL-12, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , IL-6, IL1 $\beta$ , promoviendo el reclutamiento de granulocitos, monocitos y linfocitos al foco de la inflamación, e induciendo respuestas de tipo Th1<sup>128</sup>.

Las **células NK** representan el 5-15% de los linfocitos en sangre periférica y están implicadas en la lucha frente infecciones víricas, bacterianas intracelulares o en la autoinmunidad al presentar capacidades citotóxicas e inmunorreguladoras. Además, son capaces de eliminar células tumorales sin presentación antigénica en las moléculas de histocompatibilidad clásicas de clase I o II. A diferencia del resto de componentes celulares del sistema inmunitario innato, y a excepción de las células dendríticas plasmacitoides, proceden de la línea de diferenciación linfoide, y de manera similar a los linfocitos T, secretan citoquinas proinflamatorias, antiinflamatorias y presentan mecanismos efectores comunes que incluyen la liberación de moléculas citotóxicas como las perforinas y granzimas o la expresión del receptor de superficie CD95 (FAS) capaces de inducir la lisis y la apoptosis celular. Sin embargo, no expresan TCR (sintetizan CD3, pero no lo expresan en superficie) pero expresan CD56 y CD16, clasificándose en células NK



CD56+dimCD16+brigth que representarían un 90% del total de las NK circulantes en sangre, y se les denomina NK citotóxicas debido a su alta capacidad lítica y su baja capacidad de secretar citoquinas. Las CD56+brightCD16+dim/- representarían entre el 5-10% y se caracterizarían por su baja capacidad citotóxica y su alta capacidad inmunorreguladora, siendo responsables de la liberación de altas cantidades de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Por último, hay un estado intermedio de diferenciación CD56+brightCD16+int capaz de presentar alta capacidad citotóxica y de secretar citoquinas<sup>129</sup>.

Los **linfocitos B** forman el 5-20% de los linfocitos en sangre periférica pero también están localizados en bazo, ganglios linfáticos, amígdalas y médula ósea. Sintetizan y secretan inmunoglobulinas (IgM, IgD, IgA, IgG e IgE), son responsables de la defensa humoral específica y poseen receptores antígeno-específicos BCR (B cell receptor). La activación de las células B requiere una primera señal con el reconocimiento del antígeno a través del BCR clonotípico y una segunda señal o señal coestimuladora. Si la segunda señal es timo-independiente, se produce unión covalente del antígeno al C3d del complemento (opsonización) o unión de secuencias de oligonucleóticos o de lipopolizacáridos (LPS) al TLR9 (toll-like receptor 9). Si la segunda señal es timo-dependiente, la célula B reconoce el antígeno, lo procesa y lo presenta en moléculas de histocompatibilidad de clase II al TCR del linfocito T cooperador activado. Posteriormente, se produce una interacción entre la molécula CD40 del linfocito B con CD40L de la célula T, aportando la señal coestimuladora necesaria para que la célula B prolifere, realice cambio de isotipo y progrese su diferenciación hacia una célula plasmática secretora de anticuerpos<sup>130</sup>.

Los **linfocitos T** constituyen entre el 60-80% de los linfocitos en sangre periférica. Tienen un papel fundamental en la defensa frente a bacterias y parásitos de vida intracelular, células infectadas por virus y células tumorales y poseen receptores antígeno-específicos TCR (T cell receptor). A diferencia de los linfocitos B, los linfocitos T necesitan que los antígenos sean procesados y presentados por las células presentadoras de antígenos (CPA). Hay diferentes tipos de linfocitos T, destacando<sup>131</sup>:

Los **linfocitos T CD8+ (Tc ó citotóxicos)** reconocen antígenos presentados en las moléculas de histocompatibilidad de clase I, presentes en cualquier célula nucleada de nuestro organismo, lo que permite reconocer células infectadas por patógenos intracelulares y secreción posterior de granzimas y perforinas con acción citotóxica para su eliminación.

Los **linfocitos T CD4+ (Th o colaboradores o cooperadores o helper)** reconocen antígenos presentados en las moléculas de histocompatibilidad de clase II, expresadas en las CPA (células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, fibroblastos y células endoteliales), lo que permite reconocer proteínas procesadas provenientes de patógenos extracelulares. Las CPA contribuyen a polarizar los linfocitos T



cooperadores hacia distintos tipos funcionales (Th1, Th2, Treg, ...) promoviendo distintos tipos de respuestas inmunitarias.

En la presentación antigénica se produce una interacción estrecha y bidireccional entre dos células, en un espacio virtual denominado **sinapsis inmunológica**. Las CPA se activan cuando se estimulan sus receptores para PAMP y para citoquinas expresando moléculas coestimuladoras que favorecerán la activación de los linfocitos T. El contacto entre el linfocito T y la célula CPA se inicia con la unión del complejo receptor CD3-TCR con el antígeno presente en el MHC (MCH I para CD8+ y MHC II para CD4+) y de la molécula CD28 coestimuladora de las células T y sus ligandos CD80/CD86 en las CPA ó la unión de la molécula coestimuladora CD40L del linfocito T con CD40 de las CPA. Así, el linfocito T secretará IL-2, IL-4, IL-21 e IFN- $\gamma$  favoreciendo la activación y proliferación de las CPA. También se dan señales inhibitoras con la unión de la molécula CTLA-4 (linfocito T) con sus ligandos CD80/CD86 (CPA), que inhiben a las CPA, autolimitando la respuesta inmunitaria. Y del mismo modo, ocurre inhibición de la respuesta inmunitaria con la unión de PD-1 (linfocito T) y la molécula PDL-1/PD-L2 (CPA), con su consecuente inhibición de la secreción de IL-2<sup>132</sup>.

Según los receptores estimulados en las CPA por los patógenos, se producirá una diferente respuesta y diferenciación de los linfocitos T helper (Th)<sup>133</sup>:

1. Las CPA polarizadas a una respuesta de tipo 1 producen IL-12 favoreciendo, a su vez, la liberación de IFN- $\gamma$ , la diferenciación de los linfocitos de tipo **T helper 1 (Th1)**, activación de los macrófagos M1 (haciéndolos mejores CPA), aumento de la presencia de MHC y estimulación de la inflamación local (mayor atracción de neutrófilos, macrófagos y NK). Este tipo de respuesta contribuye a la vigilancia inmunológica en cáncer y a la eliminación de patógenos intracelulares, así como a la reparación de tejidos dañados.
2. Las CPA polarizadas a una respuesta de tipo 2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, lo que favorece la diferenciación de linfocitos de tipo **T helper 2 (Th2)**, el cambio de clase de isotipo de los linfocitos B, la activación de los macrófagos M2 y la inducción de funciones efectoras en los fagocitos (mastocitos, eosinófilos, basófilos, monocitos) para la lucha contra helmintos/alérgenos.
3. La diferenciación hacia linfocitos **Th17** está estimulada por citoquinas proinflamatorias producidas en respuesta a bacterias extracelulares y hongos y, caracterizada por la liberación de IL-17 e IL-23.
4. Las células **T reguladoras (Treg)** se caracterizan por la expresión de CD3, CD4, CD28, CD25 (la cadena alfa del receptor de IL-2), los receptores TCR, TLR, CTLA-4, GITR (receptor de TNF inducido por glucocorticoides) y el factor nuclear de transcripción FOXP3 de manera específica; lo que les da el fenotipo CD4+CD25+FOXP3+. Hay dos subtipos: células Treg (nTreg) naturales derivadas del timo y células Treg inducidas



periféricamente (iTreg) con acción supresora sobre las células T CD4+, T CD8+, linfocitos B y células dendríticas al producir citoquinas inmunosupresoras (TFG- $\beta$ , IL-10) y granzimas que activan la vía de caspasas y perforinas provocando la muerte del linfocito T citotóxico; además, utilizan IL-2 compitiendo con el linfocito T citotóxico a través de su receptor CD25 produciendo la apoptosis de las células T citotóxicas; inhiben a las CPA a través de la interacción del TCR de las Treg con el MHC II de las CPA y del receptor CTLA-4 del Treg con las moléculas CD80/CD86 de las CPA. Esta acción supresora sobre el sistema inmunitario previene un daño innecesario secundario a un estado inflamatorio continuo, inducen respuesta de tolerancia, pero también permite que los tumores escapen de la vigilancia inmunológica favoreciendo el crecimiento tumoral<sup>134,235</sup>.

### 1.3.2 Inmunoedición. Papel del sistema inmunitario en la carcinogénesis.

Los ya clásicos “hallmarks” o señas de identidad del cáncer identifican las capacidades que adquieren los tumores durante su desarrollo (**carcinogénesis**), destacando los diferentes mecanismos subyacentes: Proliferación (vías de señalización PI3K/AKT/mTOR/PTEN/RAS), evasión de la señal supresora (RB, TP53, Bcl-2, Bcl-xL, Igf1/2), adquisición de la inmortalidad (activación telomerasa, vía Wnt), inducción de la angiogénesis (VEGF-A, MMP-9, vías RAS/Myc), activación de la invasión y metástasis (proteína E-cadherina, factores de transcripción Snail, Slug, Twist y Zeb1/2). Común y a la base de todo lo anterior, se encuentran mecanismos de inestabilidad genómica que generan diversidad genética y de inflamación involucrando elementos del sistema inmunitario. Además, en la última década se han agregado dos mecanismos que se incorporan a los “hallmarks” anteriores: la reprogramación del metabolismo energético mediante técnicas de supervivencia en condiciones de hipoxia y oxidación, y la evasión inmunitaria tumoral<sup>136-137</sup>.

Actualmente se considera que los tumores se componen, además de por las células neoplásicas, por un gran repertorio de otras poblaciones celulares reclutadas formando un “microambiente tumoral” específico, con múltiples interacciones entre todos sus elementos integrantes<sup>138</sup>. Varios trabajos sobre el tema demostraron que los tumores se desarrollaban más frecuentemente en aquellos modelos murinos que presentaban alguna inmunodeficiencia, particularmente con deficiencias en el desarrollo o en la función de los linfocitos T citotóxicos CD8+ (TCD8+), T cooperadores CD4+Th1(TCD4+) o de las células natural killer (NK)<sup>139</sup>.

De este modo, los nuevos modelos en el desarrollo del cáncer incorporan el concepto de **Inmunoedición** como un elemento principal en el proceso de carcinogénesis.

Hay tres fases esenciales en este proceso: eliminación, equilibrio y escape. Inicialmente, el sistema inmunitario innato y adaptativo intentan controlar el



crecimiento tumoral tras el reconocimiento de PAMPs, DAMPs, secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-12 e IFN- $\gamma$ ), aumento de neutrófilos, y acción de las células NK, células dendríticas y macrófagos. Posteriormente, las células dendríticas migran a los ganglios linfáticos cercanos donde presentan los antígenos tumorales y activan a los linfocitos T CD4 + y CD8 + específicos de tumor que emigran al sitio del tumor y realizan su acción citotóxica antitumoral. En esta fase de equilibrio, si el tumor desarrolla mecanismos de escape tumoral eficaces, se producirá la fase de escape, conduciendo a la manifestación clínica tumoral<sup>140</sup>.

Por parte del tumor, en un primer lugar se produce un crecimiento lento, casi homogéneo, de las colonias de células tumorales intentando evadir su detección por el sistema inmunitario innato. Un ejemplo sería el carcinoma ductal in situ de mama (primera etapa-colonización). Posteriormente, esa colonia tumoral va reclutando linfocitos, monocitos y macrófagos y otras células del estroma con liberación de citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y quimioquinas (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4). Durante el proceso, los macrófagos y fibroblastos cercanos se convierten en macrófagos asociados a tumor (TAMs, tumor-associated macrophages), en fibroblastos asociados a cáncer (CAFs, cancer-associated fibroblasts) y en células supresoras derivadas mieloides (MDSCs, myeloid-derived suppressor cell) (segunda etapa-infiltración de linfocitos-eliminación). A continuación, se produce una tercera etapa donde los CAFs encapsulan al tumor con matriz extracelular produciéndose progresión del crecimiento tumoral, de manera “silenciosa”, intentando no liberar señales pro-inflamatorias y con inhibición de los linfocitos (tercera etapa-equilibrio). Finalmente, algunas células tumorales dentro de la masa tumoral pueden emprender el proceso de transición epitelio-mesénquima conduciendo al desarrollo de metástasis (cuarta etapa-transición epitelio-mesénquima-escape inmunitario). Si la metástasis al llegar a un nuevo tejido, evade nuevamente a la respuesta inmunitaria, se establece el estadio metastásico<sup>141-142</sup>.

Así, el fenómeno de la inmunoección se ha postulado como un evento crucial, junto a los modelos previos de alteraciones en genes y al fenómeno de la carcinogénesis, en el inicio y progresión del cáncer. Esta condición de modulación del sistema inmunitario por parte de los tumores puede ser estudiada tanto en sangre periférica como en tejido. La posibilidad de acometer análisis de perfiles inmunitarios en sangre periférica proporciona una serie de ventajas sobre el estudio histopatológico de las biopsias seriadas como son la comodidad en la obtención de la muestra y posibilidad de monitorización en tiempo real de la evolución de los marcadores inmunitarios. En este sentido, en los últimos años ha emergido el concepto de “**biopsia líquida**” en cáncer en general (también en cáncer de mama), aprovechando las posibilidades que brinda el estudio de células tumorales, los fragmentos de ADN tumoral circulantes en sangre periférica, y por qué no, también las poblaciones celulares inmunológicas<sup>143</sup>.

### 1.3.3 Mecanismos de “escape inmunitario” en cáncer de mama.



En el microambiente tumoral (TME, tumor microenvironment), los tumores establecen mecanismos específicos de escape de la vigilancia inmunitaria innata y específica para inhibir la respuesta inmunológica y conseguir así, su progresión<sup>144</sup>. En concreto en cáncer de mama, se produce un TME muy inmunosupresor con una baja inmunogenicidad lo que limita el beneficio de la inmunoterapia en estos tumores<sup>145</sup>.

Entre los mecanismos de escape desarrollados, destacan:

- Alteración en la maquinaria de presentación y procesamiento de antígenos.

Las mutaciones en genes, amplificaciones y pérdida de heterocigosidad produce un aumento de los neoantígenos presentados en MHC I siendo reconocidos como extraños por los linfocitos T CD8+ citotóxicos (antígenos asociados a tumor, TAA, tumor associated antigens). Sin embargo, la expresión en exceso de algunos autoantígenos, como la sobreexpresión de HER2/neu podría disminuir la expresión de MHC I, alterando su unión a los TAA y, en consecuencia, reducir la citotoxicidad de los T CD8+, promocionándose la evasión inmunitaria<sup>146</sup>.

Además, se ha observado como la alteración de las vías de señalización a través de IFN o la baja expresión de B2-microglobulina, calnexina y de la subunidad de procesamiento de antígeno asociado al transportador 1 (TAP, transporter-associated antigen processing) dañan también la expresión de HLA I<sup>147</sup>. Se produce, por lo tanto, una disminución de la infiltración de linfocitos T CD8+ citotóxicos (baja inmunogenicidad), lo que se relaciona con el desarrollo de metástasis, peor pronóstico y peor respuesta a la terapia inmunológica<sup>148,149</sup>.

Del mismo modo, la expresión de HLA-G permite el escape de las células tumorales del reconocimiento mediado por NK y por las células T, cuya expresión incrementada en carcinoma de mama se relaciona con peor respuesta a tratamiento neoadyuvante, aparición de metástasis y peor pronóstico<sup>150</sup>.

- Alteración de la apoptosis.

Se produce un aumento de la señalización de la vía de la apoptosis celular mediada por FAS(CD95)/FASL(CD95L) induciendo la muerte por apoptosis de los linfocitos T CD8+ citotóxicos<sup>151,152</sup>.

También se incrementa la expresión de proteínas anti-apoptóticas tumorales como bcl-2 y caspasa, y disminuyen las pro-apoptóticas como la survivina, relacionándose con peor supervivencia, peor grado tumoral y aparición de metástasis<sup>153</sup>.

- Expresión de moléculas co-represoras.

Hay una sobreexpresión de moléculas co-represoras como PD-1/PDL-1 y CTLA-4/CD80-86, produciendo inhibición de los linfocitos T efectores, inducción de FASL para la apoptosis de linfocitos T y la liberación de citoquinas inmunosupresoras como IL-10. Especialmente en el subtipo triple negativo se ha objetivado esa sobreexpresión de PD-L1 tanto en la superficie de las células tumorales de cáncer de mama, como en las células tumorales circulantes de sangre periférica,





relacionándose con mayor grado tumoral, menor respuesta inmunitaria citotóxica local y peor supervivencia<sup>154</sup>.

Incluso, parece haber una correlación entre una mayor expresión de PD-L1+ (células tumorales) y de FOXP3+ (Treg) en el TME de carcinoma de mama mostrando peor grado histológico, negatividad de RH y subtipo tumoral más agresivo. Así, terapias que bloqueen la vía de PD-L1 y produzcan la depleción de FOXP3+ (Treg), aumentaría las tasas de éxito de la terapia, especialmente en cáncer de mama triple negativo<sup>155</sup>.

Otras moléculas co-represoras, como el gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3, lymphocyte activation gene 3), o la proteína de células T que contiene los dominios inmunoglobulina y mucina (TIM-3, T cell immunoglobulin and mucin domain-3) están implicadas en los mecanismos de escape tumoral. TIM-3 tiene un papel clave en la inhibición de la respuesta Th1 y en la expresión de TNF e INF- $\gamma$ . LAG-3 regula negativamente la proliferación celular, la activación y la homeostasis de las células T efectoras, mientras que TIM-3 influye en la función supresora de las Treg. Ambas moléculas co-represoras se sobreexpresan en tumores con una mayor proporción de PD-1/PDL-1, relacionándose con afectación ganglionar y mayor estadio TNM<sup>156,157</sup>.

- Otros mecanismos de escape tumoral.

Otros mecanismos incluyen la presencia de factores inmunosupresores liberados por el tumor (TGF- $\beta$ , IL-10, IDO) y la infiltración en el TME de células del sistema inmunitario con acción inmunosupresora (Tregs, MDSCs y TAMs)<sup>158</sup>, aspectos que se desarrollaran en los siguientes apartados.

### 1.3.4 Microambiente tumoral en carcinoma de mama.

El microambiente tumoral incluye una gran variedad de elementos interrelacionados entre sí, como son los leucocitos, linfocitos infiltrantes de tumor (TILs, tumor-infiltrating lymphocytes), macrófagos asociados a tumor (TAMs), células endoteliales, fibroblastos asociados a cáncer (CAFs, cancer-associated fibroblasts), matriz extracelular, etc. con implicaciones en su desarrollo, y como consecuencia, en su respuesta a tratamiento y pronóstico. En este sentido, interesa reseñar que, aunque las pacientes tengan un sistema inmunitario aparentemente competente, puede prevalecer un estado de inmunosupresión local que confiera resistencia a la lucha anti-tumoral, lo que favorecería su progresión.

Al igual que ocurre ante una respuesta inmunitaria frente a un organismo infeccioso, cuando se inicia la carcinogénesis, se altera la homeostasis celular y se activa la respuesta inmunitaria innata. Los macrófagos residentes en tejidos y mastocitos secretan citoquinas y quimioquinas que reclutan a los leucocitos polimorfonucleares, más monocitos, a células natural killer y demás células procedentes del torrente sanguíneo<sup>125-129</sup>. Además, las células dendríticas reconocen a los antígenos tumorales y van a los ganglios linfáticos cercanos, donde se realiza el procesamiento y la presentación antigénica a los linfocitos T y B,



activando al sistema adaptativo con acción anti-tumoral<sup>130-132</sup>. En primer lugar, y en un intento de eliminar las células mamarias tumorales, el sistema inmunitario se polariza a una respuesta de tipo 1 con TAMs tipo 1, linfocitos helper CD4+ tipo 1 (Th1) con liberación de IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , predominio de respuesta citotóxica por linfocitos CD8+ efectoras, células NK y linfocitos B con producción de anticuerpos que reconocen a los TAA<sup>133</sup>. Sin embargo, la perpetuación de la presencia de células tumorales, producen cambios inflamatorios crónicos, que junto a los mecanismos de escape tumoral por parte de la neoplasia, aumentan la densidad en el TME de MDSCs, linfocitos T CD4+ de tipo 2 (Th2) y Treg que inhiben la citotoxicidad de los linfocitos T CD8+ efectoras y polarizan a una respuesta TAMs tipo 2 con secreción de citoquinas supresoras IL-4, IL-13, IL-10, IL-6, TGF- $\beta$  y secreción de factores angiogénicos (VEGF)<sup>134</sup> facilitando la progresión del tumor<sup>159</sup>.

A continuación, destacamos los principales elementos del TME en carcinoma de mama.

### **A. Fibroblastos asociados a cáncer (CAFs)**

Representan la mayoría de las células estromales, y aunque en un primer momento intentan controlar el crecimiento tumoral, finalmente el tumor altera sus funciones anti-tumorales, constituyendo los CAFs que promueven el crecimiento, la angiogénesis y el remodelado de la matriz extracelular al secretar factores de crecimiento de fibroblastos, trombospondina-1, TGF- $\beta$  y CXCL12, facilitando la progresión tumoral y metástasis. Curiosamente, la expresión de CAFs podría ser diferente según el subtipo molecular de cáncer de mama, con especial implicación en la progresión en aquellos tumores HER2+ respecto al CMTN ó RH+<sup>160</sup>.

### **B. Macrófagos asociados a tumor (TAMs)**

Los macrófagos en el TME se diferencian a TAMs, funcionalmente similares a los macrófagos M2. Secretan citoquinas inhibitoras (IL-4, IL-13, IL-10, IL-6, TGF- $\beta$ ), prostaglandinas, ROS, metaloproteasas, ... permitiendo la degradación de la matriz extracelular, la diferenciación a macrófagos M2, sobreexpresión de PD-L1 en las células tumorales y la sobreexpresión de PD-1 sobre las células NK, correlacionándose con peor pronóstico, especialmente en CMTN<sup>161</sup>.

### **C. Neutrófilos asociados a tumor (TANs)**

Los neutrófilos se encuentran abundantemente en sangre periférica y tienen la capacidad de migrar a los tejidos y, por lo tanto, de formar parte del TME. En el TME, citoquinas como TGF- $\beta$ , IL-8 ó GM-CSF1, permiten su polarización a TANs con alta expresión de oncostatin M, favoreciendo el incremento de VEGF y la angiogénesis necesaria para el desarrollo de metástasis. En cáncer de mama se ha observado que la presencia de TANs se asocia predominantemente a CMTN, fenotipo tumoral que expresa en mayor cantidad TGF- $\beta$  induciendo el fenotipo TANs N2 pro-tumoral, con impacto pronóstico negativo<sup>162</sup>.



#### D. Células supresoras derivadas mieloides (MDSCs)

Representan una población heterogénea de células mieloides inmaduras, caracterizadas por expresar CD33+, CD11b+ y -/low HLA-DR<sup>105</sup> y con acción supresora sobre el sistema inmunitario<sup>163</sup> (ver apartado 1.2.2). Elevados niveles de MDSCs se han correlacionado con estadio avanzado en cáncer de mama, mayor carga tumoral, baja SLE y SG, así como menor eficacia de la terapia oncológica<sup>164</sup>.

#### E. Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4 ó CD152).

La molécula CTLA-4 es expresada en la superficie de las células T activadas y en Treg que, al interactuar con su ligando CD80/CD86 de las células dendríticas, produce depleción de IL-2 e inhibición de la proliferación de las células T citotóxicas con autolimitación de la respuesta inmunitaria. De este modo, los tumores tienen incrementada la expresión de la molécula CTLA-4 en su superficie como mecanismo de escape tumoral. Así, si se bloquea la inhibición vía CTLA-4, se mantienen activados los linfocitos T citotóxicos, con la consecuente destrucción tumoral. La inmunoterapia con anti-CTLA-4 (ipilimumab) tiene la aprobación de tratamiento en determinados tipos tumorales como en el melanoma; sin embargo, en cáncer de mama, continúa en estudio<sup>165</sup>.

#### F. Proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) y su ligando (PD-L1/2).

PD-1 (CD279) se expresa en células T activadas, vía TGF- $\beta$ , IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21. Su ligando (PD-L1-2) se expresa en células dendríticas y monocitos, vía IFN, GM-CSF, VEGF, IL-10 e IL-14. La interacción entre ambas moléculas inhibe la actividad de las células T. En cáncer de mama, sobre todo en el subtipo triple negativo, hay sobreexpresión de PD-L1, con disminución de los TILs, aumento del porcentaje de Ki-67, desarrollo de metástasis y peor pronóstico<sup>166</sup>.

Bertucci et al.<sup>167</sup> observó en tejido tumoral de pacientes con carcinoma de mama, una relación entre el aumento de la expresión de PD-L1 y características de mal pronóstico: mayor tamaño, alto grado, RH-, HER2+, alta tasa de proliferación y subtipos moleculares agresivos (basal y "HER 2-enriched"). En marzo de 2019, la FDA aprobó el uso de atezolizumab (anti-PD-L1) en combinación con quimioterapia para el tratamiento de primera línea metastásica de carcinoma de mama triple negativo con expresión de PD-L1<sup>2</sup>.

#### G. Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs).

Se ha objetivado un aumento de TILs en el TME, e incluso en relación al subtipo tumoral. Así, el subtipo RH- tiene mayor número de TILs comparado con tumores RH+. Todos los subtipos de TILs (linfocitos T, linfocitos B, Treg) y MDSCs se encuentran en un mayor porcentaje en los subtipos de carcinoma de mama RH-<sup>168</sup>. Los TILs del TME son principalmente linfocitos T CD8+ citotóxicos, T CD4+ helper (Th) y Treg CD4+CD25+FOXP3+ (subgrupo de Th)<sup>169,170</sup>.



Los **linfocitos B** constituyen también un porcentaje importante de TILs en el carcinoma infiltrante de mama, con un aumento de los mismos en los ganglios centinelas de la mama, los cuales, tras iniciarse la respuesta inmunitaria, migran al TME, formando folículos, en los que también encontramos células plasmáticas. Todo ello, provocará finalmente la producción de IL-6 e IL-10 atrayendo más células inmunosupresoras, favoreciendo la progresión tumoral<sup>171</sup>.

Los **Treg CD4+CD25+FOXP3+** tienen acción supresora sobre las células T CD4+, T CD8+, linfocitos B y células dendríticas al producir citoquinas inmunosupresoras (TFG-β, IL-10) y granzimas que activan la vía de caspasas y perforinas provocando la muerte del linfocito T citotóxico; además, utilizan IL-2 compitiendo con el linfocito T citotóxico a través de su receptor CD25 produciendo la apoptosis de las células T citotóxicas; inhiben a las CPA a través de la interacción del TCR de las Treg con el MHC II de las CPA, del receptor CTLA-4 del Treg con las moléculas CD80/CD86 de las CPA y de la interacción de PD-1 del Treg con PD-L1. Esta acción supresora permite que los tumores escapen de la vigilancia inmunológica favoreciendo el crecimiento tumoral<sup>134,135</sup>. FOXP3+ es el factor de transcripción específico de Treg, que les confiere sus capacidades supresoras e induce la expresión de proteínas proapoptóticas con represión de la expresión de la proteína antiapoptótica BCL-2. Se han caracterizado dos tipos fundamentales de linfocitos Treg: los linfocitos Treg naturales (nTregs) que son FOXP3+ de manera estable, se originan en el timo (vía señalización dependiente del reconocimiento de antígenos por el receptor de células T y el correceptor CD28) y los Treg inducidos (iTregs), que se originan en los órganos linfáticos periféricos a partir de linfocitos vírgenes T CD4+CD25-FOXP3-, suelen tener un fenotipo FOXP3 más inestable<sup>172</sup>.

En carcinoma de mama el porcentaje de células Treg FOXP3+ se incrementa con el desarrollo de la enfermedad y en pacientes con carcinoma ductal invasivo se asocia a peor SLE y SG<sup>173,174</sup>. Además, parece que la expresión de FOXP3+ en carcinoma de mama no solo es mayor que en tejido sano, sino que pudiera también localizarse en el citoplasma y no en el núcleo como ocurre en las células sanas, debido a una mutación del factor de transcripción FOXP3 que desencadena expresión del receptor para la quimioquina CCL12 (CXC R4) con la consecuente proliferación celular y metástasis<sup>175</sup>. Por tanto, niveles altos de Treg con alta expresión de FOXP3+ en citoplasma y de citoquinas supresoras (TGFβ, IL-10) podrían asociarse a mayor agresividad y resistencia a terapia<sup>176</sup>.

Los linfocitos **T CD8+ citotóxicos** tienen la capacidad de destruir células tumorales mediante su contacto con los TAA a través de la interacción con la CPA (TCR/MCH I y CD28/CD80-86), la secreción de IL-2, IL-4, IL-21 e IFN-γ y desarrollo del complejo granzima-perforina. Además, la maduración de los T CD8+ citotóxicos también se modula por IFN-γ secretado por los **linfocitos T CD4+Th1**<sup>131,132</sup>. Según el balance de respuesta en el TME, si hay una respuesta anti-tumoral favorable, se verán incrementados los niveles y la función de los linfocitos T CD8+ efectores. Lo



contrario ocurre si prima la respuesta inmunosupresora que favorecería la progresión tumoral.

### 1.3.5 Papel predictivo y pronóstico de las poblaciones celulares del sistema inmunitario en tejido en contexto de neoadyuvancia.

Una infiltración linfocitaria elevada en el TME, parece correlacionarse con una mayor respuesta a la QTNA<sup>177,178</sup> y a un mejor pronóstico<sup>179-185</sup> en determinados subtipos de carcinoma de mama. Al estudiar los TILs como biomarcador pronóstico y predictivo en triple negativo y en HER2+, varios son los estudios realizados en neoadyuvancia en carcinoma de mama que demuestran que no solo el porcentaje de TILs, sino que también el tipo de subpoblaciones celulares presentes en el microambiente tumoral, determinará el balance entre un sistema inmunitario pro-tumoral o anti-tumoral con impacto en la respuesta a tratamiento y en la supervivencia<sup>179-183</sup>. Ladoire et al.<sup>180</sup> muestra como la RCp alcanzada tras QTNA se asoció a la desaparición de los Treg FOXP3+ y Liu et al.<sup>183</sup> muestra como la mayor infiltración de LT CD8+ citotóxicos y la menor densidad de Treg FOXP3+ se relaciona favorablemente con la supervivencia.

Dada la importancia de establecer de manera consistente el infiltrado inmunitario en el TME de las muestras tumorales, Salgado et al.<sup>186</sup> publicaron un documento de consenso con metodología para ofrecer uniformidad y mejorar la consistencia y reproducibilidad en la medición de TILs por técnicas inmunohistoquímicas. Aunque no hay una recomendación estándar establecida con respecto a un umbral de TILs específico para considerar a un tumor con predominio linfocitario (LPBC, Lymphocyte-predominant breast cancer), el término LPBC hace referencia a tumores que contienen más linfocitos que células tumorales, pudiendo variar los límites entre  $\geq 50-60\%$ . Además, establece dos tipos de localizaciones para TILs, los estromales y los intratumorales. Los TILs estromales, localizados en el tejido tumoral sin tener contacto célula-célula con las células tumorales han demostrado ser predictivos de respuesta a QTNA, así como mejorar los resultados en adyuvancia y de supervivencia. Los TILs intratumorales en contacto directo célula-célula con las células del carcinoma, son más difíciles de medir y no parecen aportar información adicional predictiva/pronóstica a los de localización estromal. Por lo que los TILs estromales son el mejor parámetro para caracterizar la densidad de TILs en el TME en cáncer de mama.

Se ha observado como el tratamiento oncológico, ya sea quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia podría alterar el estado inflamatorio inmunitario de los tumores. Concretamente, la QTNA con antraciclinas, sales de platino y taxanos podría inducir muerte celular o apoptosis inmunogénica aumentando los TILs T CD8+, especialmente en CMTN y HER2+. Se produciría así, una liberación de antígenos, reconocidos por las células dendríticas con la posterior activación de Th CD4+ y T



CD8+ con acción citotóxica<sup>177-180</sup>. Trastuzumab, a través de la porción humanizada Fc de la IgG1 es capaz de actuar como un anticuerpo autólogo y activar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) por las células NK. De hecho, autores como Tamura et al<sup>184</sup>. y Gennari et al.<sup>185</sup> muestran un aumento de células T CD8+ y T CD4+ tras QTNA con trastuzumab, apoyando la idea de que este anticuerpo monoclonal humanizado podría activar los mecanismos para reclutar linfocitos en el TME.

Así, la modificación de los TILs por el tratamiento oncológico, podría convertir un tumor frío poco inmunogénico como puede ser el carcinoma de mama en un tumor más inmunogénico, influyendo en la respuesta a tratamiento y en el pronóstico<sup>177-180,184,185</sup>.

Denkert et al.<sup>177</sup> en el año 2010 estudió el infiltrado linfocitario en un total de 1058 biopsias de pacientes con carcinoma de mama previo a QTNA con antraciclinas y taxanos procedentes de los estudios GeparDuo y GeparTrio, concluyendo que el porcentaje de TILs era un predictor independiente de RCp en ambas cohortes (p 0.012; p 0.001). Así, el carcinoma con predominio linfocitario (LPBC) alcanzó tasas de RCp del 40% en GeparTrio y del 42% en GeparDuo, mientras que aquellos tumores sin infiltración linfocitaria (no-LPBC), tuvieron una tasa de RCp del 7% y 3%, respectivamente.

Un nuevo trabajo del equipo de Denkert et al. en el año 2015<sup>187</sup> estudió la densidad de TILs en un total de 580 biopsias tumorales pre-QTNA procedentes del estudio GeparSixto. Se investigaba el efecto sobre la RCp de añadir carboplatino neoadyuvante al esquema con antraciclinas y taxanos en carcinoma de mama HER2+ y triple negativo. También se profundizó en la expresión en el ARNm de factores inmunoestimulantes (CXCL9, CCL5, CD8A, CD80, CXCL13, IGKC, CD21) e inmunosupresores (IDO1, PD-1, PD-L1, CTLA4, FOXP3). El incremento de TILs en el estroma fue factor independiente de RCp tanto en el análisis univariante (p < 0.001) como en el multivariante (p < 0.001). Así, la tasa de respuesta completa patológica fue del 59.9% en LPBC y del 33.8% en no-LPBC. Tasas de RCp ≥ 75% se observaron en LPBC tratados con carboplatino añadido al esquema con antraciclinas y taxanos. Asimismo, todos los marcadores inmunitarios fueron predictores de RCp, sobretodo PD-L1 (OR, 1.57; IC 95% 1.34-1.86; p < 0.001) y CCL5 (OR, 1.41; IC 95% 1.23-1.62; p < 0.001), lo que apoyaba la hipótesis de que un mejor estado inmunitario basal, favorece la respuesta anti-tumoral del tratamiento.

Issa-Nummer et al.<sup>188</sup> estudió de manera prospectiva el valor predictivo de respuesta a QTNA con antraciclinas y taxanos del infiltrado inmunitario en 313 biopsias pre-QTNA de pacientes con carcinoma de mama HER2- procedentes del estudio GeparQuinto. Los TILs intratumorales (iT<sub>u</sub>Ly), TILs estromales (str<sub>L</sub>Ly) y LPBC fueron estudiados y comparados con la RCp. Aquellos pacientes con LPBC



tuvieron una tasa de RCp mayor (36.6%) comparada con no-LPBC (14.3%),  $p < 0.001$ . LPBC y strLy fueron factores predictores para RCp (LPBC: OR 2.7,  $p = 0.003$ , strLy: OR 1.2,  $p = 0.01$ ). Sin embargo, los iTuLy fueron factor predictivo para RCp sólo en el análisis univariante (OR 1.2,  $p = 0.01$ ) pero no en el multivariante (OR 1.2,  $p = 0.11$ ).

Previamente, en el año 2008, Hornychova H et al.<sup>178</sup> estudió los leucocitos infiltrantes de tumor y otros parámetros inmunohistoquímicos en biopsias y en piezas quirúrgicas de 73 pacientes con carcinoma de mama que recibieron QTNA con doxorubicina y paclitaxel. En la evaluación pre-QTNA, diez pacientes con RCp tuvieron expresión elevada de P53, T CD3+ y células dendríticas derivadas de monocitos CD83+ con baja expresión de RP. Sin embargo, en la mayoría de pacientes que no alcanzaron RCp se objetivó un aumento de niveles de T CD3+ post-QTNA en probable relación al intento de la quimioterapia de desencadenar una respuesta inmunológica. Sin embargo, el estudio careció de análisis adicional para determinar las subpoblaciones de TILs involucrados, siendo también el pequeño tamaño de pacientes con RCp otra limitación importante para sacar conclusiones.

Ladoire et al.<sup>179</sup> evaluó la infiltración por TILs CD3+ y sus subtipos TCD8+ y T FOXP3+ en 56 pacientes con carcinoma de mama antes y después de la QTNA. La evaluación pre-QTNA mostró que una mayor infiltración por T CD3+, CD8+ y FOXP3+ se asoció a factores pronósticos negativos como RH-, mayor grado tumoral y afectación ganglionar. La evaluación post-QTNA mostró que la quimioterapia producía un descenso del infiltrado FOXP3+, pero no modificación de T CD3+ ni de T CD8+, a favor de la inducción de una respuesta anti-tumoral por parte de la quimioterapia. Y, en concreto, cuando se alcanzaba RCp, se producía un descenso aún mayor de FOXP3+, mientras que en no RCp se mantenía elevado. Así, la alta infiltración por linfocitos T CD8+ y la no infiltración por FOXP3+ en el tejido post-QTNA, se asoció con la RCp en una alta sensibilidad (75%) y especificidad (93%).

Posteriormente, el mismo autor, Ladoire et al.<sup>180</sup> evaluó el papel pronóstico de la infiltración linfocitaria de T CD8+ y FOXP3+ en 111 pacientes con carcinoma de mama HER2- y 51 pacientes con HER2+ tratados con QTNA. En HER2+, el análisis univariante mostró que la edad > 50 años, el tamaño tumoral pre-QTNA, la afectación axilar, el grado tumoral, estado de RH-, el infiltrado T CD8+ pre-QTNA y FOXP3+ pre-QTNA no se correlacionaban con la SLE ni con SG. Sin embargo, el estadio post-QTNA ( $p < 0.0001$ ), el empleo de QTNA con trastuzumab ( $p = 0.012$ ), la baja infiltración FOXP3+ post-QTNA ( $p = 0.036$ ), la alta infiltración T CD8+ post-QTNA ( $p < 0.0001$ ) se asoció a mejor SLE. Además, el ratio CD8/FOXP3 elevado por altos valores T CD8+ y bajos de FOXP3+ se asoció con RCp ( $p < 0.0001$ ) y con mejor SLE ( $p < 0.0001$ ). Se destacó al estadio TNM patológico post-QTNA y el ratio CD8/FOXP3+ post-QTNA como los mejores factores para predecir SLE. Además, el estadio post-QTNA ( $p < 0.0001$ ), el empleo de QTNA con trastuzumab ( $p = 0.001$ ), la alta infiltración T CD8+ post-QTNA ( $p = 0.001$ ) y ratio CD8/FOXP3+ elevado se



asoció a mejor SG, pero no la baja infiltración FOXP3+ post-QTNA. Similares resultados se consiguieron en la cohorte HER2-. En el análisis multivariado, sólo el TNM patológico post-QTNA y el ratio CD8/FOXP3+ post-QTNA se asoció de manera independiente a la SLE. Incluso, el ratio CD8/FOXP3+ post-QTNA superó a los clásicos factores predictivos como el régimen de quimioterapia o la RCp. Los autores generaron un sistema de puntuación patológico-inmunitario (PathIm) utilizando el TNM patológico post-QTNA y el ratio CD8/FOXP3+ post-QTNA para establecer el pronóstico: los pacientes con mínimo estadio TNM patológico y alto ratio CD8/FOXP3+ tuvieron una tasa de SLE a los 5 años del 96% y de SG del 100%.

Liu F et al.<sup>183</sup> estudió el valor pronóstico de FOXP3+ y de T CD8+ y su correlación con otros factores histopatológicos y subtipo molecular en la pieza quirúrgica de 1270 pacientes con carcinoma de mama; sin embargo, estos no recibieron neoadyuvancia. Se diferenció entre el infiltrado intratumoral y estromal. El infiltrado intratumoral de Treg FOXP3+ y de T CD8+ fue mayor en histologías desfavorables (alto grado histológico y RH-). Además, una mayor densidad de Treg FOXP3+ se asoció con HER2+, disminuyendo la SLE y SG. La densidad de Treg FOXP3+ se relacionó inversamente con el pronóstico de cada subtipo molecular: mayor FOXP3+ en no luminal vs luminal.

En el infiltrado estromal, el ratio LTDC8+/Treg elevado se relacionó con mejor SLE y SG, siendo éste ratio mayor en subtipo luminal vs no-luminal.

Loi S et al.<sup>189</sup> también valoró el papel pronóstico de los TILs según el subtipo tumoral, pero en 2009 pacientes con carcinoma de mama con afectación ganglionar que no recibieron neoadyuvancia, sino procedentes del estudio fase III BIG 02-98 con quimioterapia adyuvante. Se observó que cada 10% de incremento en la infiltración linfocitaria intratumoral y estromal se asociaba con una reducción del 17% y 15% del riesgo de recaída, y una reducción del 27% y 17% del riesgo de muerte en triple negativo, independientemente del tipo de quimioterapia adyuvante empleada. En HER2+, hubo una asociación entre una densidad elevada de TILs estromal y beneficio del tratamiento (sin embargo, no se usaron esquemas con trastuzumab). Así, se concluyó que los subtipos más agresivos (triple negativo y HER2+)<sup>190</sup> tenían niveles mayores de TILs independientemente del tratamiento quimioterápico. Una densidad de TILs elevada se asociaba a excelente pronóstico en CMTN y en HER2+.

Del mismo modo, Tsang et al.<sup>191</sup> encontró que un alto infiltrado linfocitario se asociaba positivamente con el subtipo HER2+ (luminal B HER2+ y HER2+ puro) ( $p < 0.001$ ) y triple negativo ( $p = 0.003$ ), pero negativamente con el subtipo luminal A ( $p < 0.001$ ).

Ali et al.<sup>192</sup> realizó uno de los mayores estudios del papel pronóstico de T CD8+ y su relación con el subtipo de carcinoma de mama, en un total de 12439 pacientes





con carcinoma de mama, sin neoadyuvancia. En RE- (triple negativo y HER2 puro) la infiltración por T CD8+ intratumoral y estromal se asoció con una reducción del riesgo de muerte del 28% y del 21% respectivamente. En triple positivo, sólo la infiltración intratumoral se asoció con una reducción del 27% del riesgo de muerte. Hubo mayor beneficio del uso de antraciclinas en RE- con mayor infiltración T CD8+ (HR 0.54; IC 95% 0.37-0.79) vs no infiltración por T CD8+ (HR 0.87; IC 95% 0.55-1.38).

Liu S et al.<sup>193</sup> estudió el valor pronóstico de FOXP3+ en un total de 3992 carcinoma de mama intervenidos. Objetivó que un elevado infiltrado de FOXP3+ se relacionaba con menor edad, alto grado, RE-, concurrente infiltración T CD8+, subtipos HER2+ puro y triple negativo y peor supervivencia si no había infiltración por T CD8+. Sin embargo, en HER2+ puro, la presencia de FOXP3+ no se asociaba a peor supervivencia siempre y cuando hubiera coexistencia de elevado infiltrado T CD8+. Este mismo autor estudió el valor pronóstico de la infiltración T CD8+ en carcinoma de mama<sup>194</sup>, resultando mayor infiltración en menor edad, alto grado, RE-, HER2+ y basal like. Además, se correlacionaba de manera positiva con la supervivencia.

Mahmoud et al.<sup>195,196</sup> también estudió el infiltrado T CD8+<sup>195</sup> y de FOXP3+<sup>196</sup> en piezas quirúrgicas de carcinoma de mama, sin neoadyuvancia. Se observó que la infiltración T CD8+ se correlacionaba inversamente con la edad al diagnóstico y con la positividad de los RH y positivamente con la supervivencia. FOXP3+ se correlacionó con peor pronóstico, mayor grado tumoral y RH- en el análisis univariante. Sin embargo, en el análisis multivariante, FOXP3+ no resultó ser factor pronóstico independiente, sugiriendo que otras células del TME pudieran tener un papel pronóstico más crítico.

Estos estudios junto a otros más recientes, indican que el cáncer de mama pudiera ser un tumor más inmunogénico de lo que se cree. Hendrickx et al.<sup>197,198</sup> distingue 4 fenotipos inmunitarios (ICR, Immunologic Constant of Rejection) en carcinoma de mama, basándose en la expresión de genes relacionados con elementos del sistema inmunitario, con gradación de ICR1 (fenotipo inmunitario no favorable) a ICR4 (fenotipo inmunitario favorable) asociándose con la progresión y supervivencia de las pacientes con carcinoma de mama.

El fenotipo ICR4 está caracterizado por una alta expresión de genes del sistema inmunitario desarrollándose un estado inflamatorio dominado por la respuesta inmunitaria Th-1 (linfocitos T CD8+ citotóxicas, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y producción de quimioquinas pro-inflamatorias CXCR3, CXCL9, CXCL10, y CXCL11 implicadas en el reclutamiento de los linfocitos T citotóxicos), y activación de vías de señalización inhibitorias de los mecanismos supresores (IDO-1, CTLA-4, CD274 ó PD-L1, PD-1 y FOXP3+), relacionándose con un mejor pronóstico dado que responde mejor al tratamiento oncológico. Sin embargo, el fenotipo ICR1 tiene una baja expresión de genes inmunitarios careciendo de estado inflamatorio, con peor pronóstico y resistencia a tratamiento.



Entre ambos fenotipos extremos, está ICR2 con una expresión medio-baja de genes y el ICR3 con expresión medio-alta de los mismos con la consecuente activación en mayor o menor medida del sistema inmunitario.

Además, mientras que el estadio tumoral fue similar en todos los grupos ICR, sí se objetivaron diferencias según el subtipo tumoral. Sólo un pequeño porcentaje de luminal A (5.4%) y luminal B (10.9%) formaban parte del grupo ICR4 mientras que un mayor porcentaje de basal like (31.9%) y de HER2 enriched (28.6%) formaban parte de este grupo.

### 1.3.6 Papel predictivo y pronóstico de las poblaciones celulares del sistema inmunitario en sangre periférica en la neoadyuvancia del carcinoma de mama.

Múltiples estudios han evaluado también la respuesta inmunitaria sistémica en sangre periférica, dada su facilidad y bajo coste, a diferencia del infiltrado inmunitario del TME en tejido que precisa de un método más cruento y complejo para su evaluación.

Así, marcadores hematológicos y bioquímicos han sido evaluados, como linfocitos, neutrófilos, monocitos, plaquetas, y ratios (ratio neutrófilo/linfocito, plaquetas/linfocito, linfocito/monocito, CD4/CD8, CD8/Treg, etc.) con implicaciones predictivas y pronósticas.

#### Leucocitos

Los leucocitos, también llamados glóbulos blancos, engloban diferentes tipos de células del sistema inmunitario: granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos y linfocitos (células T, células B y natural killer). Las cifras de leucocitos normales en la sangre suelen oscilar entre  $4.00 - 11.00 \times 10^3/\mu\text{L}$ . La presencia de enfermedad podría producir una disminución (leucopenia) o un aumento (leucocitosis), al estar alterado el sistema inmunitario ya sea por activación o por inhibición/destrucción del mismo. Ante una infección, se suele producir una alteración de la cifra de los mismos como consecuencia del aumento o disminución de las poblaciones celulares que lo forman (ej. neutrofilia o linfopenia).

En cáncer, varios estudios han identificado leucocitosis como factor pronóstico en diferentes tipos de tumores, sobre todo en cáncer colorrectal y pulmón, pero también en carcinoma de mama<sup>199</sup>.

Se produce una reacción "leukemoide" de origen paraneoplásico como resultado de la liberación por parte del tumor de factores de crecimiento de la línea mieloide (G-CSF, GM-CSF, IL-6)<sup>125,126</sup>, donde prima la neutrofilia y la monocitosis. Ese estado de leucocitosis favorecería el desarrollo tumoral<sup>200</sup> y la trombosis asociada a cáncer por la generación de NETs por parte de los neutrófilos<sup>201</sup>, liberación de factores pro-



coagulantes, aumento de MDSCs circulantes<sup>202</sup> con acción supresora, etc. y, en consecuencia, impactaría en un peor pronóstico.

Sin embargo, también hay que tener en cuenta que el recuento absoluto del subtipo de leucocitos se puede ver alterado por otros factores diferentes a los tumorales, como tratamientos, infección, malnutrición, otras enfermedades, estrés severo, etc. En los siguientes apartados se comentarán estos aspectos de manera más desarrollada.

### Neutrófilos

Los neutrófilos son de las primeras células del sistema inmunitario en activarse contra un daño producido en el organismo, de ahí que se produzca una neutrofilia<sup>125,140</sup> con la activación del sistema inmunitario ante el proceso de carcinogénesis y la perpetuación del mismo. Sin embargo, finalmente, en los tumores, parece que el incremento de neutrófilos en sangre periférica pudiera estar más en relación a la generación de metástasis<sup>203</sup>.

Tal y como se explicó en el apartado de TME en tejido, los neutrófilos que, en un principio, se encuentran abundantemente en sangre periférica, tienen la capacidad de migrar a los tejidos y, por lo tanto, de formar parte del TME. En el TME, citoquinas como TGF-β, IL-8 ó GM-CSF1, permiten su polarización a TANs con alta expresión de oncostatin M, favoreciendo el incremento de VEGF, la angiogénesis necesaria para el desarrollo de metástasis y la generación de más neutrofilia en sangre periférica y en tejido. En cáncer de mama se ha observado que la presencia de TANs se asocia predominantemente a CMTN, fenotipo tumoral que expresa en mayor cantidad TGF-β induciendo el fenotipo TANs N2 pro-tumoral, con impacto pronóstico negativo<sup>162</sup>.

Aunque la evidencia científica sugiere que el aumento de neutrófilos ya de por sí facilitaría el crecimiento tumoral, recientemente se ha descubierto el papel de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, neutrophil extracellular traps). Las células cancerosas con la liberación de GCSF e IL-8 prepararían a los neutrófilos hacia un fenotipo pro-NETotic<sup>201</sup> a través de la expresión y liberación al espacio extracelular de NETs, que son mallas de ADN que encierra histonas y proteínas antimicrobianas (mieloperoxidasa, elastasa, triptasa, catepsina...) con capacidad para la fagocitosis y para la promoción del crecimiento celular<sup>204</sup>, además de favorecer la trombosis asociada a cáncer<sup>205</sup>.

Yang et al.<sup>206</sup> indica una asociación entre la aparición de niveles elevados de NETs en sangre periférica de carcinoma de mama estadio precoz y la aparición posterior de metástasis, principalmente en hígado. Se destaca así, el papel de las NETs en una monitorización temprana premonitoria de un estadio metastásico. Dado que las células tumorales expresarían el receptor CCDC25 al que se unirían las NETs con gran afinidad y especificidad para el desarrollo de metástasis, bloqueando a nivel del receptor, podríamos mejorar el pronóstico de nuestras pacientes<sup>201</sup>.

### Monocitos



Los niveles y funciones de los monocitos están alterados en carcinoma de mama. Los macrófagos en el TME se diferencian a TAMs<sup>161</sup>, funcionalmente similares a los macrófagos M2 y secretan citoquinas inhibitoras (IL-4, IL-13, IL-10, IL-6, TGF-β), prostaglandinas, ROS, metaloproteasas, etc., permitiendo la degradación de la matriz extracelular, angiogénesis y progresión tumoral. Los TAMs derivados del tejido tumoral se diseminan en grandes cantidades por el torrente sanguíneo al lado de las células tumorales circulantes<sup>206</sup> por lo que grandes cantidades de monocitos M2 (TAMs) en sangre periférica se han observado en diferentes tipos de tumores, principalmente pulmón<sup>207</sup> donde se asocian al riesgo de recurrencia post-cirugía, adenocarcinoma colorrectal<sup>208</sup>, y carcinoma de mama<sup>209-211</sup>.

Wen J et al.<sup>209</sup> y Tiainen S et al.<sup>210</sup> estudiaron como el recuento absoluto de monocitos era factor pronóstico independiente para SG en carcinoma de mama (HR1.37, IC 95% 1.04–1.80, p = 0.023), demostrando que aquellos pacientes con mayor recuento de monocitos (>0.48 x10<sup>9</sup>/L) tenían peor supervivencia respecto a las pacientes con menor recuento. Además, Wen J et al.<sup>209</sup> observó que, el estadio II-III con elevado recuento de monocitos tenía peor SG (HR 1.45 y 1.69, respectivamente, p <0.05), mientras que no hubo diferencias estadísticas en estadio I (p = 0.23) dado que este estadio de por sí, ofrece buen pronóstico. Y, del mismo modo, la SG era menor en subtipo luminal B, HER2+ y triple negativo con elevado recuento de monocitos (p < 0.05), pero no para luminal A (p = 0.170).

Zhang et al.<sup>211</sup> observó que tanto el número absoluto de macrófagos y de monocitos con fenotipo M2 en sangre periférica era mayor en pacientes con carcinoma de mama vs controles, teniendo un valor diagnóstico mayor que el marcador Ca 15.3. Además, elevadas cifras de monocitos M2 se asociaron a afectación ganglionar, RH- y peor grado tumoral.

Ni X-J et al.<sup>212</sup> correlaciona un recuento bajo de monocitos (<0.46 x10<sup>9</sup>/L) pre-tratamiento en carcinoma de mama intervenido y sometido a QTNA, con mejor SLE (p = 0.010).

### Ratio linfocitos/monocitos (RLM)

Un recuento absoluto disminuido de linfocitos y un aumento de monocitos, se asocia a peor pronóstico. Por lo tanto, un ratio linfocitos/monocitos bajo debido a lo anterior, se asociaría también a mal pronóstico en diferentes tumores sólidos como se destaca en el metaanálisis de Teng J-J et al.<sup>213</sup>.

Stotz M et al.<sup>214</sup> y Wei X et al.<sup>215</sup> relacionan un ratio linfocitos/monocitos pre-tratamiento bajo con peor pronóstico en carcinoma colorrectal y en linfoma, respectivamente.

En carcinoma de mama, los resultados son muy variados.

Wen J et al.<sup>209</sup> usó como corte el valor del ratio linfocitos/monocitos en 3.80, y encontró en el análisis univariante que un bajo ratio linfocitos/monocitos pre-tratamiento disminuía la SG (HR 0.776, p<0.05), pero sin resultados concluyentes en el análisis multivariante (HR 1.166 p = 0.167). Del mismo modo, Cho U. et al.<sup>216</sup> también encontró esa asociación, pero con la SLE en el análisis univariante (p < 0.05) aunque sin diferencias en el subtipo molecular.



Siguiendo esa idea, el estudio español de Marín Hernández C, et al.<sup>217</sup> relaciona un elevado ratio linfocitos/monocitos ( $\geq 5.46$ ) con mejor SLE a los 5 años ( $p = 0.048$ ); e incluso era un factor pronóstico independiente favorable para SG en el análisis multivariante ( $p = 0.05$ ). Del mismo modo, Xiao-Jian N et al.<sup>218</sup> defiende que elevado ratio linfocitos/monocitos ( $\geq 4.25$ ) en carcinoma de mama pre-QTNA era factor predictivo y pronóstico independiente al relacionarse de manera favorable con la tasa de respuesta global ( $p = 0.005$ ) y con la SLE ( $p = 0.009$ ).

En cambio, Losada B et al.<sup>219</sup> utilizando el mismo valor de corte ( $\geq 5.46$ ), sólo objetivó un menor riesgo de recaída en SLE a 3 años, pero no a 5 años de seguimiento ni en SG.

Otros autores<sup>220-223</sup>, además de correlacionar un ratio bajo con peor SLE y SG en el global de la muestra, realizan análisis según subtipo molecular de carcinoma de mama. Goto W et al.<sup>220</sup> y Hu R-j et al.<sup>221</sup> mantienen esa relación en el subtipo triple negativo, mientras que Zenan H et al.<sup>222</sup> y Xu et al.<sup>223</sup>, en luminal A y HER2+.

No se demostró relación del ratio linfocitos/monocitos y la RCp<sup>220-221</sup>, salvo en el estudio de Xiao-Jian N et al.<sup>218</sup> donde se relaciona un ratio linfocitos/monocitos elevado con mejor tasa de respuesta a tratamiento neoadyuvante.

### Ratio neutrófilos/linfocitos (RNL)

Un recuento absoluto aumentado de neutrófilos y una disminución de linfocitos, se asocia a peor pronóstico. Por lo tanto, un ratio neutrófilos/linfocitos elevado debido a lo anterior, se asociaría también a mal pronóstico en carcinoma de mama como defienden los autores Losada B et al.<sup>219</sup>, Cho U et al.<sup>216</sup>, Yao M et al.<sup>224</sup>, Azab B et al.<sup>225</sup>, Noh et al.<sup>226</sup> y el estudio español de GEICAM/9906<sup>227</sup>, entre otros. Siguiendo esta hipótesis, Marín Hernández C, et al.<sup>217</sup> y Jia W et al.<sup>228</sup> correlacionan un bajo ratio neutrófilos/linfocitos con mejor SLE y SG.

Los autores Jia W et al.<sup>228</sup> y Azab B et al.<sup>225</sup> defienden, además, que el ratio neutrófilos/linfocitos es superior al ratio plaquetas/linfocitos<sup>225</sup> y al ratio linfocitos/monocitos<sup>228</sup> para predecir supervivencia, y en concreto según Jia W et al.<sup>228</sup>, en triple negativo. Losada B et al.<sup>219</sup> y Vernieri C et al.<sup>229</sup> también destacan el subtipo triple negativo, como el único subtipo en el que se relaciona la supervivencia con el ratio. En cambio, Noh H et al.<sup>226</sup> destaca al subtipo luminal A como el único en el que se relaciona el ratio con la supervivencia. Y, Yao M et al.<sup>224</sup> ve correlación tanto en el subtipo luminal A como en el triple negativo. Por otro lado, el estudio de GEICAM/9906<sup>227</sup> establece el ratio elevado como factor pronóstico adverso en subtipos con RH- y con afectación de 1-3 ganglios linfáticos.

Además, otros trabajos destacan que un ratio neutrófilos/linfocitos bajo se relaciona con una mayor tasa de RCp ( $p < 0.001$ )<sup>230,231</sup> y, lo que es más interesante, los autores muestran no sólo que el subtipo triple negativo es el subtipo con menor valor del ratio neutrófilos/linfocitos sino que dentro de este subtipo, aquellos con menor ratio aún, tenían mejores tasas de RCp y en consecuencia, de SLE y SG.

Además, hay evidencia de un ratio elevado y factores clínico-patológicos adversos como RH.<sup>219,228-231</sup>, alto grado histológico<sup>232</sup>, gran tamaño tumoral<sup>226,233</sup>, afectación ganglionar<sup>225,232,233</sup> y estadio avanzado<sup>232,233</sup>.



Al igual que con el resto de parámetros inflamatorios en sangre periférica de carcinoma de mama, los diferentes estudios con el ratio neutrófilos/linfocitos, utilizan diferentes valores de corte (valores de ratio como  $\geq 2.5^{226}$ ,  $> 3.33^{219}$ ,  $\geq 3^{230}$ , etc. establecidos por curvas ROC, o en el caso del estudio de GEICAM/9906<sup>227</sup> con la mediana de los valores estableciendo el valor corte elevado con  $\geq 1.35$ ), lo que podría influir en los diferentes resultados encontrados, sobre todo en los hallazgos según subtipos tumorales, pero con una gran consistencia en el dato de que un ratio elevado, se correlaciona con peor supervivencia de las pacientes.

### Linfocitos

Los linfocitos en sangre periférica, no solo en el TME del tejido, han sido considerados como indicador pronóstico por numerosos investigadores.

Previamente hemos comentado el papel destacado de los linfocitos formando parte de ratios como el de neutrófilos/linfocitos o linfocitos/monocitos, y en ambos el valor disminuido de linfocitos actuaba como factor pronóstico desfavorable<sup>209-233</sup>.

Los primeros trabajos de autores como Papatestas et al.<sup>234,235</sup> y Ownby HE et al.<sup>236</sup> mostraron que las pacientes con altos niveles absolutos de linfocitos periféricos ( $> 2000/\text{mm}^3$ <sup>234,235</sup> ó  $> 1500/\text{mm}^3$ <sup>236</sup>) pre-cirugía por carcinoma de mama tenían mayores tasas de supervivencia, siendo un indicador de inmunocompetencia. Además, Papatestas et al.<sup>234,235</sup> observó como el estadio III de carcinoma de mama tenía menores cifras de linfocitos absolutos respecto a estadio I.

Trabajos más recientes como el de Losada B et al.<sup>219</sup> asocia altos niveles de linfocitos ( $> 1700/\text{mm}^3$ ) a supervivencia ( $p = 0.01$ ), mientras que Quian Y et al.<sup>237</sup> ( $> 2006/\text{mm}^3$ ) ve una correlación con la RCp (23.9% vs 10.4%;  $p = 0.023$ ).

Sin embargo, Wen J et al.<sup>209</sup> y Ni X-J et al.<sup>212</sup> no pudieron identificar el recuento absoluto de linfocitos como factor pronóstico independiente en cáncer de mama ( $p > 0.05$ ), pudiendo ser los diferentes subtipos de linfocitos, la razón de tal hallazgo. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos tendrían acción anti-tumoral y los linfocitos Treg tendrían acción pro-tumoral, por lo que el equilibrio final entre los diferentes componentes de linfocitos, como veremos a continuación, se relacionaría con un mejor o peor resultado y pronóstico en nuestros pacientes<sup>169,172</sup>.

### Linfocitos B

Hay pocos estudios que destaquen el papel pronóstico/predictivo en patología oncológica de algunas subpoblaciones de linfocitos, como los linfocitos B en sangre periférica.

Murta EF et al.<sup>238</sup> y Tsuda B et al.<sup>239</sup> destacan como las poblaciones de linfocitos B se encuentran en mayor proporción en pacientes con carcinoma de mama respecto a población sana dado el mayor estado inflamatorio en los pacientes diagnosticados con alguna patología respecto a población sana. También se observó que tras tratamiento neoadyuvante se producía un descenso de los niveles de linfocitos B<sup>238</sup>. Incluso, Mahmoud SM et al.<sup>240</sup> observa que aquellos tumores con mayor grado tumoral ( $p < 0.001$ ), RH- ( $p < 0.001$ ) y fenotipo basal ( $p < 0.001$ ) tienen mayores



niveles de linfocitos B. Y, aunque este estudio fue realizado en tejido, se podría extrapolar a los niveles de linfocitos B elevados en sangre periférica que finalmente migran a la localización intratumoral<sup>241,242</sup>. De este modo, Lee YT et al.<sup>242</sup> muestra como en enfermedad metastásica hay mayores niveles de linfocitos B en sangre periférica respecto a estadios más precoces.

En cambio, otros trabajos como el de Iglesia MD et al.<sup>243</sup>, Schmidt M et al.<sup>244</sup>, Mahmoud SM et al.<sup>240</sup> describen como la amplificación de la región de genes relacionados con el receptor de las células B (BCR) y, en consecuencia, una mayor actividad de los linfocitos B, especialmente en los subtipos basal-like y HER2+ de carcinoma de mama, se correlaciona con mejor pronóstico indicando la importancia de la actividad anti-tumoral de los linfocitos B.

### Linfocitos NK

Las células NK tienen la capacidad de reconocer y lisar células tumorales para su eliminación mediante su capacidad citotóxica. Murta EF et al.<sup>238</sup>, Mozaffari F et al.<sup>245</sup> y Ostapchuk YO et al.<sup>246</sup> destacan que las células natural killer se encuentran en mayor proporción en pacientes con carcinoma de mama respecto a población sana dado el mayor estado inflamatorio en los pacientes, especialmente en RH-<sup>247</sup>.

Sin embargo, otros autores como Caras I et al.<sup>248</sup>, Liu X et al.<sup>249</sup>, Nieto-Velázquez NG et al.<sup>250</sup>, Mamessier E et al.<sup>251,252</sup> y Garner WL et al.<sup>253</sup> observan que no hay diferencias en los niveles periféricos de las células natural killer en pacientes respecto a sanas sino una mayor proporción de subgrupos de células NK más inmaduras con capacidad citotóxica disminuida y más inmunomoduladora (CD56+brightCD16+dim/-) en relación a mecanismos de evasión y tolerancia por parte de las células tumorales lo que favorece la invasión y metástasis. E incluso, se produciría una disminución de la expresión del receptor NKG2D<sup>250</sup>, necesaria para la activación de la citotoxicidad. En este sentido, Liu X et al.<sup>249</sup> ve una correlación entre el porcentaje de células NK en sangre periférica, células tumorales circulantes (CTCs) y la aparición de metástasis, dada la función alterada de las células natural killer por el tumor, e indicando que la combinación de ambos biomarcadores pudiera servir de monitorización y pronóstico. Además, Muntasell et al.<sup>254</sup> comunicaron una correlación inversa entre los niveles de células natural killer en sangre periférica pre-QTNA y la RCp en carcinoma de mama HER2+.

Por otro lado, mientras autores como Murta EF et al.<sup>238</sup>, Holl et al.<sup>255</sup>, Verma C et al.<sup>256</sup> observan un aumento de NK tras tratamiento neoadyuvante en carcinoma de mama, Foulds GA et al.<sup>257</sup> muestra que no varían las células NK tras quimioterapia, sino que es la actividad citotóxica con acción antitumoral lo que se incrementa en estas células (mayor expresión del receptor NKG2D...) tras tratamiento oncológico. Kim R et al.<sup>258</sup> y Verma C et al.<sup>256</sup> observan que tras QTNA, el incremento de la actividad de estas células se asocia con la desaparición de la afectación ganglionar (OR 5.41, IC 95% 1.19-24.52, p = 0.0283)<sup>258</sup> y con mayor RCp<sup>256</sup>, por lo que la activación sistémica de las células NK después de la QTNA aumentaría la respuesta



a la QTNA, frenaría el desarrollo de metástasis y mejoraría el pronóstico de las pacientes.

### Linfocitos T

Para una respuesta inmune efectiva se necesita la actuación de las células T, concretamente T CD8+ con acción efectora citotóxica y T CD4+ para mantener la activación de las células T CD8+ y generar memoria de células T<sup>130-133</sup>.

En una primera fase, las células dendríticas reconocen a los antígenos tumorales y migran a los ganglios linfáticos cercanos, donde se realiza el procesamiento y la presentación antigénica a los linfocitos T y B, activando al sistema adaptativo con acción anti-tumoral<sup>130-132</sup> y con predominio de los linfocitos helper CD4+ tipo 1 (Th1) con liberación de IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , y de la respuesta citotóxica por linfocitos CD8+ efectores. Sin embargo, la perpetuación de la presencia de células tumorales, induce cambios inflamatorios crónicos, que junto a los mecanismos de escape tumoral por parte de la neoplasia, genera linfocitos T CD4+ de tipo 2 (Th2) y Treg que inhiben la citotoxicidad de los linfocitos T CD8+ efectores y polarizan a una respuesta TAMs tipo 2 con secreción de citoquinas supresoras IL-4, IL-13, IL-10, IL-6, TGF- $\beta$  y secreción de factores angiogénicos (VEGF)<sup>134</sup> facilitando la progresión del tumor<sup>159</sup>.

Por lo tanto, y aunque en un principio parece que aumentan los niveles de linfocitos dado el estado inflamatorio que se desarrolla, finalmente, por los mecanismos de escape tumoral, se produce una inmunodeplección de linfocitos T citotóxicos efectores y un aumento de aquellos con acción inmunosupresora pro-tumoral como los Tregs.

Li CH et al.<sup>259</sup>, Wang ZK et al.<sup>260</sup>, Liu JT et al.<sup>261</sup> y Liyanage UK et al.<sup>262</sup> objetivan un aumento de los niveles de Treg en sangre periférica en pacientes con carcinoma de mama respecto a personas sanas.

Song G et al.<sup>263</sup> objetiva un aumento de los niveles de linfocitos T CD4+ y T CD8+ en sangre periférica en pacientes con carcinoma de mama avanzado respecto a personas sanas.

El autor Huang Y et al.<sup>264</sup> muestra cómo los subtipos de TCD4+ cambian de una polarización Th1 anti-tumoral en estadios tempranos de enfermedad a un subtipo de Treg y Th17 en estadios más avanzados con acción pro-tumoral. Asimismo, Fu G et al.<sup>265</sup> objetivó que un descenso de los niveles en sangre periférica de células Th1 y un aumento de Treg tras cirugía de carcinoma de mama, se asociaba a una menor SLE.

Por lo tanto, el subtipo de linfocito afectado, será el que determine el balance hacia mejor o peor pronóstico<sup>169,172</sup>. Aún así, hemos visto como la disminución de los niveles de linfocitos afecta en el mal pronóstico, por la inmunodeficiencia producida principalmente, en el desarrollo o en la función de los linfocitos T citotóxicos CD8+ (T CD8+) y T cooperadores CD4+Th1(T CD4+)<sup>129,209-233</sup>.

Son muchos los trabajos desarrollados sobre el infiltrado linfocitario en tejido tumoral (TILs) con impacto pronóstico y predictivo<sup>179-183</sup> en carcinoma de mama, sin





embargo, los trabajos con respecto a perfil inmunitario en sangre periférica son más escasos, a pesar de que el análisis es más sencillo y económico, por lo que no se ha podido establecer hasta el momento claramente el papel pronóstico/predictivo del mismo.

Siguiendo los hallazgos de los trabajos con TILs en tejido, hay datos en sangre periférica que relacionarían niveles elevados de **T CD8+**<sup>263,264,266,267</sup> y **T CD4+**<sup>263,268</sup> con mejores RCp y mejor pronóstico. Mientras que niveles elevados de **Treg**<sup>264-266,268</sup> se asociarían con menores tasas de RCp y peor pronóstico en los pacientes. Un **ratio CD8/Treg**<sup>263,264,266,267,269,273-275</sup> disminuido (bajos niveles T CD8+ y elevados niveles Treg) se asociaría con peor pronóstico.

Además, hay autores que correlacionan el perfil inmunitario en sangre periférica con las características clínico-patológicas. Whitford P et al.<sup>276</sup> muestra que el subtipo de linfocitos T CD8+ citotóxico es el predominante por encima de los T CD4+ y aunque no ve una relación entre los niveles de los mismos y el tamaño o grado tumoral, si hay una correlación inversa entre los niveles de linfocitos T CD4+ y T CD8+ con los RH+. Decker T et al.<sup>277</sup> tampoco ve correlación con el tamaño, el grado o el estadio pero sí en el subtipo HER2+. Del mismo modo, Lin KR et al.<sup>278</sup> observa un aumento de linfocitos T CD8+ en HER2+ respecto a HER2-. Sin embargo, Liu JT et al.<sup>261</sup> observa que aquellos pacientes con mayor tamaño tumoral tenían mayores niveles de Treg y menores T CD8+ y células natural killer. Wang ZK et al.<sup>260</sup> observa un incremento de Treg en las pacientes con estadio más avanzado respecto a estadios más precoces.

Por otra parte, Sevcíková L et al.<sup>271</sup> y Bilik R et al.<sup>272</sup> muestran una menor ratio CD4/CD8 en pacientes con características adversas como mayor tamaño tumoral, mayor grado de diferenciación tumoral y afectación ganglionar o metastásica.

Chen R et al.<sup>268</sup>, Shao B et al.<sup>269</sup> y Lin KR et al.<sup>278</sup> observaron como el tratamiento con quimioterapia produce una modulación en el infiltrado periférico. Tras tratamiento neoadyuvante, hay trabajos que muestran un incremento de los linfocitos T CD4+ Th1<sup>268</sup> y de los T CD8+<sup>278</sup> y un descenso de los Tregs en relación a una mayor respuesta y mejor pronóstico<sup>268,269</sup>. Y otros, como el realizado previamente por nuestro equipo<sup>273</sup>, donde se muestra un descenso de Treg y de T CD4+ pero no modificación de las TCD8+, aumentando el ratio CD8/Treg, especialmente en HER2+, asociándose a una mayor respuesta y mejor pronóstico.



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



## HIPÓTESIS

### 1. Hipótesis principal:

El perfil inmunitario en sangre periférica en pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama candidatas a QTNA es diferente a la población sana, con predominio de un ambiente inmunosupresor.

La respuesta inmunitaria medida en sangre periférica y en tejido, y sus modificaciones con la QTNA en carcinoma de mama, caracterizada por el estudio de las poblaciones celulares presentes antes y después del tratamiento, tiene valor predictivo para respuesta completa patológica (RCp) y valor pronóstico en relación a supervivencia.

### 2. Hipótesis secundaria:

Las distintas poblaciones celulares del sistema inmunitario y sus implicaciones pronósticas y predictivas de respuesta son diferentes según el fenotipo tumoral, estadio tumoral y niveles de vitamina D.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivos primarios:

1.-Evaluación de las poblaciones celulares pre-QTNA y sus modificaciones tras QTNA en tejido (linfocitos T CD8+ y Treg FOXP3+) y en sangre periférica (leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos Treg y ratios neutrófilos/linfocitos, linfocitos/monocitos, CD4/CD8, CD8/Treg), así como los niveles basales de vitamina D en grupo de pacientes y comparación con el grupo de sanas.

2.-Determinación del valor predictivo de respuesta a la QTNA (respuesta patológica alcanzada medida por el sistema de gradación de Miller & Payne y por el sistema de estadio TNM patológico) y el valor pronóstico (supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de enfermedad a distancia) de las poblaciones celulares del sistema inmunitario en tejido y en sangre periférica, tanto pre-QTNA como post-QTNA.

### 2. Objetivos secundarios:

1.-Determinación de la respuesta patológica (medida por el sistema de gradación de Miller & Payne y por el sistema de estadio TNM patológico) en mama, ganglionar y global (mama y ganglionar).

2.-Determinación de la supervivencia (supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de enfermedad a distancia) global, según fenotipo de carcinoma de mama y según respuesta a QTNA.

3.-Evaluación de determinadas poblaciones celulares del sistema inmune pre-QTNA y post-QTNA en tejido y en sangre periférica en los diferentes fenotipos de carcinoma de mama y en los diferentes estadios según TNM clínico.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



## 3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

### 3.1.1. Tipo de estudio

Estudio traslacional prospectivo, basado en la caracterización del perfil inmunitario en tejido y en sangre periférica, antes y después de la quimioterapia neoadyuvante (QTNA) y su correlación con los niveles basales de vitamina D en sangre, respuestas patológicas alcanzadas, supervivencia y características clínico-histológicas del tumor (inmunofenotipo tumoral y estadio TNM) en una cohorte de pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama candidatas a QTNA según guías de práctica clínica habitual en el Hospital Universitario Virgen Macarena, y comparativa con una cohorte de personas sanas.

Al ser un estudio traslacional, incluye una investigación básica de laboratorio/anatomía patológica y una investigación clínica, de manera que se facilite la transición y aplicabilidad de los hallazgos de la investigación básica en la práctica clínica y, en consecuencia, lograr un potencial impacto clínico mayor en el área de la salud.

### 3.1.2. Periodo de estudio

Del 1 enero 2011 a 31 enero 2020.

### 3.1.3. Población de estudio

Reclutamiento de pacientes con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma de mama en el Área Hospitalaria Virgen Macarena durante enero 2011-mayo 2013 y consideradas subsidiarias de QTNA en el seno de la Subcomisión de Cáncer de Mama, bien con intención de cirugía conservadora o por tratarse de carcinoma de mama localmente avanzado.

Los criterios de inclusión/exclusión fueron los siguientes:

#### Criterios de inclusión:

- o Carcinoma primario unilateral de mama, confirmado histológicamente con biopsia incisional.
- o Tumor medible bi-dimensionalmente por mamografía, ecografía o RM.
- o No evidencia de metástasis a distancia.
- o Edad de 18 a 70 años.
- o Aceptación por escrito del consentimiento informado y de análisis de poblaciones celulares en sangre periférica y en tejido tumoral.

#### Criterios de exclusión:

- o Cáncer de mama bilateral y/o metastásico.
- o Cáncer de mama previamente tratado (cirugía, radioterapia, tratamiento endocrino o citotóxico).

Las pacientes que cumplieron todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, y fueron consideradas subsidiarias de QTNA por la Subcomisión Clínica de Cáncer



de Mama del HUV Macarena se incluyeron en el estudio, conllevando su aceptación la firma de consentimiento informado (Anexos 7-8). Posteriormente, se registraron con un código numérico según el orden de entrada en el estudio. El esquema de visitas y procedimientos durante el estudio se muestran en Anexo 9.

Además, se incluyó un grupo de personas sanas, con características similares a las pacientes (edad, sexo femenino), pero sin diagnóstico conocido de cáncer.

### 3.1.4. Protocolo terapéutico.

El tratamiento aplicado se realizó según subtipo tumoral determinado por inmunohistoquímica (luminal A/B/HER2+, HER2+ puro, triple negativo) y basado en las Guías de Protocolo de la patología, atendiendo a las mejores evidencias científicas y grados de recomendación. El esquema de tratamiento no forma parte de ningún ensayo clínico. A continuación, se exponen las líneas generales del tratamiento aplicado: QTNA +/- terapia anti-HER2 (Si HER2+) --> Cirugía --> Radioterapia si procede --> Hormonoterapia (si RH+) / Terapia anti-HER2 (Si HER2+).

#### 1.- QTNA

A) Her-2 +: (Esquema CDH) Carboplatino AUC 6 + Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup>-Trastuzumab 8 mg/kg (inducción) seguido de 6 mg/kg ciclos cada 21 días x 6 ciclos. Posteriormente, Trastuzumab adyuvante hasta completar 1 año.

B) Her-2 -: (Esquema TAC) Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup>-Doxorrubicina 50 mg/m<sup>2</sup>-Ciclofosfamida 500 mg/m<sup>2</sup> + G-CSFx7 días ciclos cada 21 días x 6 ciclos.

#### 2.- CIRUGÍA

Si RP o RC clínica: cirugía radical.

#### 3.- RADIOTERAPIA

Administrada según protocolo habitual, en función del estadio inicial y/o resultado final del estudio anatomopatológico tras cirugía radical.

#### 4.- HORMONOTERAPIA

En mujeres con tumores con RH+ y según protocolo habitual.

### 3.1.5. Seguimiento

Se realizó un seguimiento total durante 9 años (108 meses) para el análisis de supervivencia global y libre de enfermedad, contando desde la fecha de diagnóstico de la primera paciente incluida en enero 2011 hasta enero 2020.

- Supervivencia libre enfermedad (SLE) definida como el tiempo en meses transcurrido desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de recaída.
- Supervivencia libre recaída a distancia (SLED) definida como el tiempo en meses transcurrido desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de recaída a distancia.
- Supervivencia global (SG) definida como el tiempo en meses transcurrido desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de muerte.



Se realizó un análisis de supervivencia a 5 años (60 meses) con fecha de 31 enero 2016 y otro análisis de supervivencia a 9 años (180 meses) con fecha de 31 enero 2020.

### 3.1.6. Variables y recogida de datos.

Se ha diseñado una base de datos, para la información clínica, epidemiológica y del análisis traslacional relevante para el posterior análisis de datos de este estudio:

#### A) Variables clínicas y epidemiológicas.

- Fecha de diagnóstico.
- Edad al diagnóstico (años).
- SG (meses).
- SLE (meses).
- SLED (meses).
- Sitio de la recaída (pulmonar, hepática, SNC, ósea, ganglionar, cutánea-Subcutánea y/o mama contralateral).
- Causa de éxitus (carcinoma de mama versus otras causas).
- Estadío clínico (TNM 8º edición AJCC) al diagnóstico.
- Histología (carcinoma lobulillar infiltrante vs ductal infiltrante).
- Grado histológico establecido por la Modificación Nottingham del sistema de gradación Scarff-Bloom-Richardson: G1=Favorable; G2=Moderadamente favorable; G3=No favorable.
- Porcentaje de expresión de los receptores hormonales (RE, receptor estrógenos; RP, receptor de progesterona), expresión Ki67, positividad para Her2.
- Fenotipo tumoral por inmunohistoquímica:
  - Luminal A (RH+, Ki67 <14%, Her2-)
  - Luminal B (RH+, Ki67 ≥14%, Her2-)
  - Luminal Her2+ (RH+, Her2+)
  - Her2+ puro (RH-, Her2+)
  - Triple negativo (RH-, Her2-)
- Tratamiento neoadyuvante aplicado:
  - Si expresión de Her2+: CDH (Docetaxel 75 mg/m2, carboplatino AUC 6 y trastuzumab 6mg/kg iv ó 600 mg subcutáneo (sc) (dosis carga 8mg/kg) cada 21 días x 6 ciclos.
  - No expresión de Her2: TAC (Docetaxel 75mg/m2 día 1, adriamicina 50 mg/m2 día 1 y ciclofosfamida 500 mg/m2 día 1 cada 21 días x 4-6 ciclos. (Soporte con filgrastrim).
- Número de biopsia al diagnóstico.
- Número de bloque tumoral de la cirugía.
- Tipo de cirugía realizada en mama y en axila (mastectomía ó tumorectomía, linfadenectomía y/ó biopsia selectiva de ganglio centinela).



- Tipo de respuesta a QTNA medido mediante Miller & Payne y estadio patológico TNM:
  - **Miller & Payne:** Se considera **respuesta completa patológica** en mama si gradación “G5”; ganglionar axilar si gradación “D”; en mama y axila si gradación “G5D”:
    - Valoración respuesta en mama:
      - G1= Mínimos cambios celulares individuales, sin reducción en su número global.
      - G2= Reducción < 30% del número de células tumorales (celularidad global aún muy elevada).
      - G3= Moderada reducción entre 30-90% del número de células tumorales.
      - G4= Casi RCp= Casi respuesta completa patológica= presencia residual de focos microscópicos con reducción superior al 90% (pequeños clusters de células dispersas).
      - G5= RCp= Ausencia completa de células tumorales identificables en la localización previa del tumor.
    - Valoración respuesta ganglionar axilar:
      - A= Ganglios linfáticos negativos, sin cambios atribuibles a la quimioterapia.
      - B= Ganglios linfáticos positivos, sin cambios atribuibles a la quimioterapia.
      - C= Ganglios linfáticos positivos, pero con evidencia de respuesta parcial.
      - D= Ganglios linfáticos negativos, con cambios atribuibles a la quimioterapia.
  - **Estadio patológico** postneoadyuvancia según **TNM** 8º edición AJCC: Se considera respuesta completa patológica en mama “ypT0 ó ypTis”; ganglionar axilar “ypN0”; en mama y axila “ypT0/ypTis ypN0”.
  - Si no se produce respuesta completa patológica, se considera “**respuesta parcial**” si se objetiva cambio, pero no completa desaparición tumoral; y “**no respuesta**” si no hay cambios o incluso progresión tras quimioterapia neoadyuvante.

#### **B) Variables del análisis traslacional. Poblaciones celulares.**

Las variables del análisis traslacional incluyen las poblaciones celulares del sistema inmunitario del microambiente tumoral en tejido tumoral (evaluadas con la Clasificación de Ladoire o Black modificado) y en sangre periférica (células/microlitro) y los niveles de vitamina D (ng/ml) medidos en sangre periférica.

- En muestra histológica:
  - Linfocitos T citotóxicos (T CD8+)





- Linfocitos T reg (FOXP3+)
- En sangre periférica:
  - Leucocitos
  - Neutrófilos
  - Linfocitos
  - Monocitos
  - Linfocitos T (CD3+)
  - Linfocitos B (CD19+)
  - Linfocitos NK (CD3-CD16+56+)
  - Linfocitos T CD4+ helper (CD3+CD4+)
  - Linfocitos T CD8+ citotóxicos (CD3+CD8+)
  - Linfocitos Treg (CD4+CD25+CD127+)
  - Ratio neutrófilos/linfocitos
  - Ratio linfocitos/monocitos
  - Ratio CD4/CD8
  - Ratio CD8/Treg
  - Niveles basales de vitamina D según parámetros de la guía del Instituto de Medicina (IOM, Institute of Medicine):
    - Deficiencia: <12 ng/ml
    - Insuficiencia 12-20 ng/ml
    - Suficiencia  $\geq$ 20 ng/ml.

Una vez introducida toda la información en la base de datos y tabulados los datos del estudio se practicó el control de calidad y análisis estadístico. Los resultados se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### 3.2. ESTUDIO DE LAS MUESTRAS.

Se ha realizado: [Tabla 10](#).

- 1.- Evaluación del perfil inmunitario en tejido en la cohorte de pacientes (antes y después del tratamiento neoadyuvante).
- 2.- Evaluación del perfil inmunitario en sangre periférica en la cohorte de pacientes (antes, durante y después del tratamiento neoadyuvante) y en la cohorte de sanas (basal).
- 3.- Evaluación de los niveles de vitamina D en la cohorte de pacientes (antes del tratamiento neoadyuvante) y en la cohorte de sanas (basal).



Tabla 10. Extracción de muestras en cohorte de pacientes y cohorte de sanas. QTNA, quimioterapia neoadyuvante; C3, ciclo 3; C6, ciclo 6.

### 3.2.1 Estudio histológico.

Para el estudio de las poblaciones celulares del sistema inmunitario en el microambiente tumoral en tejido se ha empleado el siguiente protocolo.

- **Muestra histológica pre-neoadyuvancia.**

Antes de iniciar el tratamiento se obtuvieron de cada paciente 6 biopsias trucut ecodirigidas de diferentes zonas representativas del core tumoral (3) y su periferia (3), para diagnóstico histopatológico de certeza y análisis inmunohistoquímico.

- **Muestra histológica post-neoadyuvancia.**

La pieza tumoral procedente de la cirugía (mastectomía o cirugía conservadora, extracción ganglio centinela o linfadenectomía parcial/radical) tras QTNA se estudió exhaustivamente con un amplio muestreo de los márgenes para posterior análisis inmunohistoquímico.

- **Estudio de TILs.**

- **Sistema de Gradación de Black modificado (clasificación de Ladoire, Black grading system).**

Se realizó un estudio de los TILs con hematoxilina-eosina para obtener un sistema de clasificación semicuantitativo denominado sistema de Black modificado (clasificación de Ladoire, Black grading system): grado 0 (ausencia de infiltrado linfocitario), grado 1 (mínima presencia de linfocitos, algunos linfocitos aislados), grado 2 (presencia moderada de linfocitos), grado 3 (presencia moderada-alta de linfocitos) y grado 4 (intensa infiltración por linfocitos, asemeja órgano linfoide).

Los grados 2 y 3 se concentraron en un solo grupo, quedando por tanto 3 categorías (0, 1, 2 y 3). El análisis ulterior de TILs se llevó a cabo examinando 20 CGA de 10 áreas independientes con mayor densidad de TILs (5 de área epitelial tumoral y 5 de área estromal). En el caso de remisión completa patológica, se

	PACIENTES	SANAS
<b>Basal/Pre-QTNA</b>	Perfil inmunitario tejido Perfil inmunitario sangre Vitamina D sangre	Perfil inmunitario sangre Vitamina D sangre
<b>C3/Durante-QTNA</b>	Perfil inmunitario sangre	
<b>C6/Post-QTNA</b>	Perfil inmunitario tejido Perfil inmunitario sangre	

analizó exhaustivamente el estroma donde inicialmente asentaba el tumor, valorando 10 áreas y calculando la media de TILs del estroma post-remisión



completa. El estudio semicuantitativo se aplicó también sobre las diferentes subpoblaciones linfocitarias (linfocitos T citotóxicos CD8+ y T reguladores FOXP3+). De este modo, se estableció el grado de infiltración linfocitaria empleándose el sistema de Black modificado (clasificación de Ladoire, Black grading system):

Grado 0: ausencia de células de una población linfocitaria específica.

Grado 1: 1-5 células en 5f/20x.

Grado 2: 5-15 células en 5f/20x.

Grado 3: > 15 células en 5f/20x.

- **Anticuerpos específicos para TIL (CD3+) y subtipos (T CD8+ y Treg FOXP3+)**

El estudio inmunohistoquímico se realizó sobre tejido parafinado con anticuerpos dirigidos específicamente contra T CD3+ (#IS503), T CD8+ (#IS623) y Tregs (FOXP3+), de la casa DAKO y e-Bioscience.

### 3.2.2 Estudio en sangre periférica.

Para el estudio del infiltrado inmunitario en sangre periférica se ha empleado el siguiente protocolo.

- **Muestras de sangre periférica.**

Por cada paciente incluido en el estudio se realizaron tres extracciones de sangre periférica (antes, durante y tras el tratamiento) correspondientes a las extracciones basal, ciclo 3 y C6; para el grupo control se realizó un único análisis (basal).

De la muestra basal de sangre de cada paciente se obtuvieron dos tubos con EDTA, uno con la muestra de sangre periférica que posteriormente se analizó, y otro tubo con activador de coagulación que contenía suero, que fue utilizado para realizar el análisis de vitamina D. De las muestras durante y tras tratamiento se obtuvieron sólo un tubo con EDTA por cada extracción y por cada paciente.

Por cada muestra de sangre periférica se realizó un hemograma y un marcaje celular con anticuerpos monoclonales para su análisis por citometría de flujo; se empleó el citómetro de flujo FACSCanto™ II. Con el porcentaje de las poblaciones celulares dadas por el citómetro y a partir del número absoluto de leucocitos, neutrófilos, linfocitos totales y monocitos dados por el hemograma, se calcularon los números absolutos de las diferentes poblaciones celulares; los resultados obtenidos se recogieron con el *software* BD FACSDiva™.

- **Estudio de vitamina D.**

A partir del tubo de ensayo con 300 uL de suero se empleó el método de quimioluminiscencia DiaSorin Liason® para medir los niveles de vitamina D.

- **Hemograma.**



Se realizó un hemograma en el laboratorio de Urgencias (Equipo Sysmex CS-1000) con el que se obtuvo un recuento absoluto de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos totales y monocitos.

● **Estudio de linfocitos T reguladores.**

Para el marcaje de los linfocitos T reguladores se empleó el siguiente anticuerpo monoclonal:

- Human Regulatory T Cell Cocktail (Ref: 560249; BD Pharmingen™). Contiene:
  - FITC Anti-Human CD4;
  - PE-Cy™7 anti-Human CD25;
  - Alexa Fluor® 647 anti-Human CD127.

Aunque este anticuerpo monoclonal no incluye el factor de transcripción FOXP3, reconocido marcador de las células de interés, se han considerado a estas células como linfocitos T reguladores. El marcaje de FOXP3 requiere la permeabilización de la membrana celular, lo que inutilizaría estas células para su posible utilización posterior. Por otro lado, CD127, presente en el anticuerpo monoclonal empleado, fue identificado como un buen marcador para el aislamiento de linfocitos T reguladores por citometría de flujo con la estrategia de gateo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>. La expresión de CD127 se correlaciona de forma inversa con FOXP3, por lo que gatear la región negativa para CD127 es adecuado para garantizar la presencia de FOXP3<sup>+</sup> en la región celular seleccionada.

● **Estudio de otras subpoblaciones linfocitarias.**

Se analizaron subpoblaciones de linfocitos T, B y NK empleando el siguiente anticuerpo monoclonal:

- BD Multitest™ 6-Color TBNK (Ref: 337166; BD Multitest™). Contiene:
  - FITC / CD3;
  - PE / CD16 + PE / CD56;
  - PerCP-Cy™5.5 / CD45;
  - PE-Cy™7 / CD4;
  - APC / CD19;
  - APC-Cy™7 / CD8.

- **Citometría de flujo.** Por cada paciente incluido en el estudio se realizaron tres análisis por citometría de flujo (antes, durante y tras el tratamiento) correspondientes a las extracciones basal, ciclo 3 y C6; para el grupo control se realizó un único análisis. Las muestras fueron procesadas de acuerdo con el protocolo de rutina empleado en el Laboratorio de Citometría de Flujo del



Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena. El procedimiento es el siguiente:

1. Pasar 50 µL de muestra de sangre periférica a cuatro tubos de ensayo, uno para cada estudio citométrico.
2. Añadir los anticuerpos monoclonales correspondientes a cada tubo de ensayo, tal como se muestra en la sección 4, con los volúmenes recomendados por el fabricante.
3. Agitar en vortex e incubar 15 minutos en oscuridad.
4. Añadir en cada tubo de ensayo 2 mL de BD FACS™ Lysing Solution 10X Concentrate para lisar los eritrocitos, que podrían influir en la obtención de los datos.
5. Agitar en vortex e incubar 3 minutos en oscuridad.
6. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm y desechar sobrenadante.
7. Añadir 2 mL de PBS 1X para lavar el pellet celular y agitar en vortex.
8. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm y desechar sobrenadante.
9. Añadir 0,5 mL de PBS 1X y agitar en vortex.
10. Adquirir 100.000 eventos en el citómetro de flujo para obtener los resultados.

### 3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

#### 3.3.1 Cálculo del tamaño muestral.

Para el cálculo del tamaño mínimo de muestra se consideraron los datos de remisión completa tras tratamiento y en consecuencia, de supervivencia referenciados en la bibliografía, teniendo en cuenta los esquemas de tratamiento empleados en la población de estudio, se publicaban cifras de remisión completa anatomopatológica del 65% en pacientes HER2+ y del 30% en pacientes HER2-. Puesto que aproximadamente un 30% de las pacientes son HER2+, la cifra de remisión completa patológica global esperable estaría en torno al 41%, que asumiendo un error alfa de 0,05 y una precisión de 0,2 nos da un tamaño de muestra mínimo de 24 pacientes.

Sin embargo, si queremos realizar este cálculo independientemente para cada estrato, puesto que deseamos analizar la remisión completa anatomopatológica en el conjunto de las pacientes, pero también separadamente en aquellas cuyos tejidos tumorales sobreexpresan o no la proteína HER2, para un 65% y un 30% de remisión completa anatomopatológica, asumiendo un error alfa de 0,05 y una precisión de 0,2, el tamaño mínimo muestral necesario era de 43 pacientes.

Para la selección del tamaño muestral de la población sana, tras elegir a 20 sujetos sanos iniciales y comprobar la no variabilidad de la muestra en las variables analizadas, se consideró un tamaño muestral de sanas de 20 como representativo. Finalmente, se reclutaron un total de 47 pacientes para la cohorte de pacientes y un total de 20 personas en la cohorte de sanas.



### 3.3.2 Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Inicialmente se realizó un análisis descriptivo de las variables clínicas, epidemiológicas y de las poblaciones celulares (variables categóricas y numéricas).

Se empleó el test de Shapiro Wilk para contrastar normalidad, mostrándose ausencia de distribución normal en nuestra muestra. Para la expresión cuantitativa de las poblaciones celulares y niveles de vitamina D en sangre se empleó la mediana e intervalo de confianza del 95% (IC 95%), mientras que para la expresión de las poblaciones linfocitarias en tejido se empleó el porcentaje e IC 95% de pacientes para cada categoría del sistema de gradación. En el estudio de las variaciones de las poblaciones linfocitarias y ratios de los mismos empleamos como punto de corte la mediana calculada.

Para el contraste estadístico entre grupos planteamos como hipótesis nula que NO habría diferencias en los niveles celulares entre los pacientes con RCp y los pacientes con no RCp, así como entre los niveles celulares entre cohorte sana y cohorte de pacientes ( $p > 0.05$ ), mientras que la hipótesis alternativa sería que SÍ habría diferencias ( $p < 0.05$ ).

Las poblaciones celulares fueron comparadas antes y después del tratamiento neoadyuvante empleándose el test para muestras apareadas de Wilcoxon, mientras que para comparar los niveles de poblaciones celulares según RCp/no RCp ó según cohorte de pacientes/sanas se empleó el test de U Mann-Whitney.

Para analizar la correlación entre diferentes variables como son los valores basales de vitamina D y las poblaciones celulares en una misma cohorte se empleó el coeficiente de correlación de Spearman.

En el análisis de supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de enfermedad a distancia, se realizaron curvas de Kaplan-Meier.

Se asumió un error alfa de 0,05 y por lo tanto  $p \leq 0.05$  fue considerado para indicar diferencias estadísticamente significativas.

La heterogeneidad del carcinoma de mama, el tamaño muestral limitado y los pocos eventos para el análisis de supervivencia pueden suponer limitaciones en las correlaciones que se establezcan y que no arrojen resultados estadísticamente significativos si las diferencias no son excesivamente grandes.

La coordinación del equipo de trabajo es igualmente compleja, si bien, es subsanable con el buen funcionamiento del Subcomité Hospitalario de Cáncer de Mama y la correcta aplicación del protocolo propuesto.



### 3.4 ASPECTOS ÉTICOS.

Este estudio se ha llevado a cabo en cumplimiento con el protocolo, de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, la última versión de la Declaración de Helsinki, el Convenio de Oviedo sobre los derechos humanos y biomedicina, así como resto de normas y/o legislación que le fuesen de aplicación.

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Hospital Virgen Macarena ([Anexo 10](#)).

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



## 4.RESULTADOS

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**





## 4.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-ANATOMO-EPIDEMIOLÓGICAS.

De enero de 2011 a mayo de 2013 se reclutaron un total de 47 pacientes con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma de mama en el Área Hospitalaria Virgen Macarena y consideradas subsidiarias de QTNA en el seno de la Subcomisión de Cáncer de Mama, bien con intención de cirugía conservadora o por tratarse de carcinoma de mama localmente avanzado. Un total de 20 personas sanas con características similares a las de las pacientes y sin diagnóstico conocido de patología tumoral, formaron el grupo de población sana.

La media de edad del grupo de pacientes fue de 51 años, mientras que en el grupo de sanas fue de 35 años. El 85% de las pacientes tenían un performance status (PS) de 0, mientras que sólo el 4% tenía PS de 2. El 100% de las pacientes y el 100% de sanas eran de sexo femenino.

Entre las características del tumor, el subtipo histológico, el grado y el inmunofenotipo fueron registrados. El subtipo histológico ductal infiltrante se objetivó en 43 (91%) pacientes, mientras que sólo 4 (9%) eran lobulillar. En cuanto al grado histológico (G), 20 (30%) de las biopsias tumorales fueron G3, 8 (17%) fueron G2, 5 (11%) fueron G1 y 14 (30%) desconocido. La mayoría de los tumores mostraron fenotipo luminal en las técnicas inmunohistoquímicas con 6 (12%), 19 (40%) y 14 (30%) biopsias con fenotipo luminal A, luminal B y luminal HER2, respectivamente; mientras que sólo 4 (9%) biopsias fueron HER2 puro y otras 4 (9%) fueron triple negativo.

Todas las pacientes realizaron tratamiento con quimioterapia con intención neoadyuvante y posterior cirugía con intención curativa. El esquema de tratamiento neoadyuvante fue establecido según la expresión de HER2. Así, las 17 (36%) pacientes que tenían sobreexpresión de HER2 recibieron 6 ciclos de carboplatino, docetaxel, y trastuzumab (esquema CDH), mientras que las 30 (64%) pacientes sin sobreexpresión de HER2 recibieron 6 ciclos de docetaxel, doxorubicina y ciclofosfamida (esquema TAC) previo a la cirugía. Se realizaron 19 (40%) cirugías conservadoras y 28 (60%) mastectomías. En cuanto a la cirugía ganglionar axilar, 12 (26%) pacientes se sometieron a BSGC pre-QTNA necesaria para el estadio y propuesta de tratamiento inicial, y hasta en 37 (79%) pacientes se realizó linfadenectomía post-QTNA entre los que se incluyen 2 pacientes previamente con N+ en BSGC pre-QTNA.

Se realizó seguimiento desde la fecha de la primera paciente incluida en el estudio en enero de 2011 hasta 31 enero de 2020 para el análisis de supervivencia total.

Se constató recaída en 13 (28%) pacientes, ocurriendo las primeras 10 (22%) recaídas dentro de los 5 años de seguimiento y 3 (6%) recaídas a partir de los 5 años de seguimiento. La afectación metastásica visceral ocurrió en 11 (24%) pacientes. La localización de la recaída por orden de frecuencia fueron la ósea y



hepática con 8 (17%) pacientes por cada una de ellas, seguido de la localización cutánea-subcutánea en 5 (11%) pacientes, ganglionar en 4 (8%), pulmonar en 2 (4%), SNC en 1 (2%) y mama contralateral en 1 (2%) paciente. Hasta 6 (13%) pacientes recayeron en dos localizaciones, mientras que 4 (8%) pacientes recayeron en tres localizaciones, 2 (4%) pacientes tuvieron una localización y sólo 1 (2%) paciente tuvo más de 3 zonas afectas por metástasis.

El exitus ocurrió en 7 (15%) pacientes, de las cuales, 5 pacientes fallecieron en los primeros 5 años de seguimiento y 2 (4%) pacientes fallecieron posteriormente; 1 paciente se trasladó de ciudad por lo que fue pérdida de seguimiento. Entre las causas de exitus, la progresión de la enfermedad fue la razón en 6 (13%) pacientes, 1 paciente falleció por otras causas diferentes a la patología tumoral (sd. neuroléptico maligno en paciente con antecedentes psiquiátricos) y no se produjeron causas de exitus por toxicidad secundaria a tratamiento.

En la **Tabla 11** se muestran las características clínico-epidemiológicas de la cohorte de pacientes.

	<b>Pacientes (N= 47) N (%)</b>
<b>Edad (años)</b>	
Media	51
<50	19 (40)
≥50	28 (60)
<b>ECOG- Performance Status</b>	
0	40 (85)
1	5 (11)
2	2 (4)
<b>Tipo Histológico</b>	
Lobulillar	4 (9)
Ductal	43 (91)
<b>Grado histológico (G)</b>	
G1	5 (11)
G2	8(17)
G3	20 (42)
Desconocido	14 (30)
<b>Fenotipo tumoral</b>	
Luminal A	6 (12)
Luminal B	19 (40)
Luminal HER2	14 (30)
HER2 puro	4 (9)
Triple negativo	4 (9)
<b>Tratamiento neoadyuvante<sup>(1)</sup></b>	
CDH	17 (36)
TAC	30 (64)



<b>Cirugía mama</b> Tumorectomía Mastectomía	19 (40) 28 (60)
<b>Cirugía axilar</b> <b>BSGC pre-QTNA<sup>(2)</sup></b> N0 N+	<b>12 (27)</b> 10 (21) 2 (4)
<b>Linfadenectomía post-QTNA<sup>(3)</sup></b> 1-3 ganglios resecaados 4-9 ganglios resecaados >10 ganglios resecaados	<b>37 (79)</b> 3 (6) 5 (11) 29 (62)
<b>Recaída</b> <b>Si</b> <5 años 5-9 años <b>No</b>	<b>13 (28)</b> 10 (22) 3 (6) <b>34 (72)</b>
<b>Recaída visceral</b> Si No	11 (24) 2 (4)
<b>Localización recaída</b> Pulmonar Hepática SNC Ósea Ganglionar Cutánea-Subcutánea <sup>(4)</sup> Mama contralateral <sup>(5)</sup>	2 (4) 8 (17) 1 (2) 8 (17) 4 (8) 5 (11) 1(2)
<b>Nº sitios recaída</b> 1 2 3 >3	2 (4) 6 (13) 4 (8) 1 (2)
<b>Exitus</b> <b>Si</b> <5 años 5-9 años <b>No</b> <b>Desconocido<sup>(6)</sup></b>	<b>7 (15)</b> 5 (11) 2 (4) <b>39 (83)</b> <b>1 (2)</b>
<b>Causa exitus</b> Progresión enfermedad Toxicidad Otras <sup>(7)</sup>	6 (13) 0 (0) 1 (2)

Tabla 11. Características clínico-epidemiológicas de la cohorte de pacientes.  
(1) CDH, Carboplatino AUC 6 + Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup> + Trastuzumab 8 mg/kg (inducción) seguido de 6 mg/kg ciclos cada 21 días x 6 ciclos; TAC, Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup> + Doxorubicina 50 mg/m<sup>2</sup> + Ciclofosfamida 500 mg/m<sup>2</sup> cada 21 días x 6



ciclos. (2) Dos pacientes se realizaron BSGC pre-QTNA y posteriormente linfadenectomía axilar post-QTNA. (3) Sin incluir los ganglios extirpados previamente en la técnica BSGC pre-QTNA. (4) 3 pacientes tuvieron recaída en cicatriz de mastectomía, 1 supraesternal y 1 en cuero cabelludo. (5) Recaída de carcinoma de mama contralateral (portadora de mutación BRCA). (6) Pérdida de seguimiento. (7) Síndrome neuroléptico maligno en paciente con antecedentes psiquiátricos.

Se estableció el estadio pre-QTNA y post-QTNA, así como la respuesta alcanzada tras el tratamiento neoadyuvante.

En el estadio pre-QTNA se objetivaron estadios de IIA a IIIC en las siguientes frecuencias: 9 (19%), 14 (30%), 17 (36%), 6 (13%) y 1 (2%) pacientes para estadio IIA, IIB, IIIA, IIIB y IIIC respectivamente. El estadio cT pre-QTNA fue del 53%, 32%, 2% y 13% para cT2, cT3, cT4b y T4d, respectivamente, mientras que el estadio cN ó pN pre-QTNA fue del 23%, 52%, 19% y 6% para N0, N1, N2 y N3, respectivamente.

En el estadio post-QTNA se objetivaron estadios de ypT0ypN0cM0 a IIIC en las siguientes frecuencias: 6 (13%), 3 (6%), 1 (2%), 14 (31%), 2 (4%), 10 (21%), 5 (11%), 3 (6%), 1 (2%) y 2 (4%) pacientes para estadio ypT0ypN0cM0, ypT0pN0cM0, 0 (ypTisypN0cM0), IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB y IIIC, respectivamente. El estadio ypT post-QTNA fue del 0%, 21%, 4%, 50%, 21%, 2% y 2% para ypTx, ypT0, ypTis, ypT1, ypT2, ypT3 y ypT4, respectivamente, mientras que el estadio ypN post-QTNA fue del 21%, 41%, 25%, 9% y 4% para ypNx, ypN0, ypN1, ypN2 y ypN3, respectivamente.

En la [Tabla 12](#) se muestran los datos del estadio pre/post-QTNA y respuestas completas patológicas alcanzadas en la cohorte de pacientes.

Estadio pre-QTNA	
TNM	N (%)
0	0 (0)
IA	0 (0)
IB	0 (0)
IIA	9 (19)
IIB	14 (30)
IIIA	17 (36)
IIIB	6 (13)
IIIC	1 (2)
Estadio clínico tumor (cT)	
cTx	
cT0	0 (0)
cTis	0 (0)
cT1	0 (0)



cT1mi	0 (0)
cT1a	0 (0)
cT1b	0 (0)
cT1c	0 (0)
cT2	0 (0)
cT3	25 (53)
cT4a	15 (32)
cT4b	0 (0)
cT4c	1 (2)
cT4d	0 (0)
6 (13)	
<b>Estadio ganglionar (cN ó pN<sup>(1)</sup>)</b>	
Nx	0 (0)
N0	11 (23)
N1	24 (52)
N2	9 (19)
N3	3 (6)
<b>TNM post-QTNA</b>	
<b>TNM</b>	
ypT0ypN0cM0	6 (13)
ypT0pN0 <sup>(2)</sup> cM0	3 (6)
0 (ypTisypN0cM0)	1 (2)
IA	14 (31)
IB	2 (4)
IIA	10 (21)
IIB	5 (11)
IIIA	3 (6)
IIIB	1 (2)
IIIC	2 (4)
<b>Estadio patológico tumor (ypT)</b>	
ypTx	0 (0)
ypT0	10 (22)
ypTis	2 (4)
ypT1mi	6 (13)
ypT1a	2 (4)
ypT1b	2 (4)
ypT1c	13 (29)
ypT2	10 (21)
ypT3	1 (2)
ypT4a	0 (0)
ypT4b	0 (0)
ypT4c	0 (0)
ypT4d	1 (2)
<b>Estadio patológico ganglionar (ypN)</b>	
ypNx <sup>(3)</sup>	10 (21)
ypN0	19 (39)
ypN1mi	2 (4)



ypN1a	10 (21)
ypN1b	0 (0)
ypN1c	0 (0)
ypN2a	4 (9)
ypN2b	0 (0)
ypN3a	2 (4)
ypN3b	0 (0)
ypN3c	0 (0)
<b>Respuesta completa patológica (RCp)</b>	
<b>RCp TNM patológico</b>	
Mama (ypT0/Tis)	12 (26)
Ganglionar (ypN0)	19 (39)
Mama + Ganglionar (ypT0/Tis ypN0)	7 (15)
<b>RCp Miller &amp; Payne</b>	
Mama (G5)	11 (21)
Ganglionar (D)	15 (32)
Mama+ Ganglionar (G5D)	7 (15)

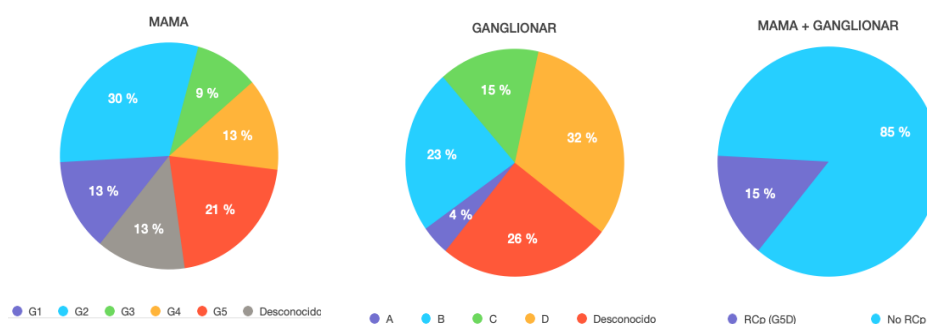
Tabla 12. Datos del estadio pre/post-QTNA y respuestas completas patológicas alcanzadas en la cohorte de pacientes. (1) pN, afectación ganglionar establecida por biopsia/BSGC pre-QTNA. (2) pN0, BSGC pre-QTNA, no se puede determinar el estadio ganglionar post-QTNA. (3) ypNx, BSGC pre-QTNA, no se puede determinar el estadio ganglionar post-QTNA.

## 4.2 RESPUESTA COMPLETA PATOLÓGICA (RCp)

Las RCp se muestran por estadio TNM patológico y por sistema clasificación Miller & Payne.

### 4.2.1 Sistema de Miller & Payne

En el sistema de Miller & Payne, 11 (21%) pacientes alcanzaron RCp en mama (G5), 15 (32%) a nivel ganglionar (D) y 7 (15%) pacientes alcanzaron RCp en mama y ganglionar (G5D). [Figura 1.](#)



Miller & Payne		Miller & Payne		Miller & Payne	
MAMA	N	GANGLIONAR	N	MAMA + GANGLIONAR	N
G1	7	A	2	RCp (G5D)	7
G2	16	B	11	No RCp	40
G3	5	C	7		
G4	7	D	15		
G5	11	Desconocido	12		
Desconocido	7				

Figura 1. Respuesta según Sistema de Miller & Payne.

#### 4.2.2 Sistema TNM patológico

En el estadio TNM patológico, 12 (26%) pacientes alcanzaron RCp en mama (ypT0/Tis), 19 (39%) a nivel ganglionar (ypN0) y 7 (15%) pacientes alcanzaron RCp en mama y en ganglionar (ypT0/Tis ypN0). [Figura 2.](#)

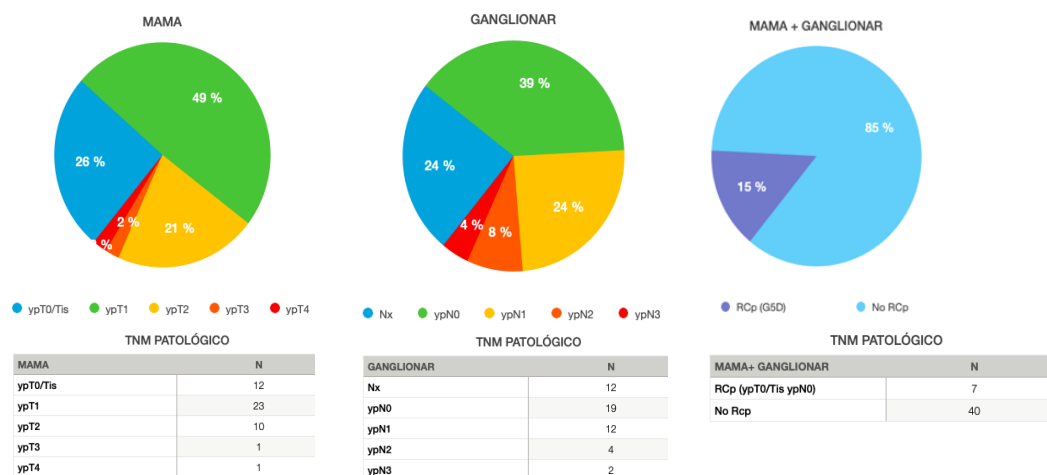


Figura 2. Tasa respuesta según sistema TNM Patológico.

### 4.3 DATOS DE SUPERVIVENCIA

Se realizó seguimiento total de 9 años (108 meses) desde la fecha de la primera paciente incluida en el estudio en enero de 2011 hasta el 31 enero de 2020 para el análisis de **supervivencia a 9 años**. Además, se analizó la **supervivencia a 5 años** con fecha de 31 de enero de 2016 (60 meses).

#### 4.3.1 Supervivencia a 5 años.



A fecha de 31 de enero de 2016, tras 5 años de seguimiento, los datos de supervivencia fueron 78.7%, 80.9% y 87.2% para supervivencia libre de enfermedad (SLE), supervivencia libre de enfermedad a distancia (SLED) y supervivencia global (SG), respectivamente. **Figura 3.**

Se produjo recaída de la enfermedad tumoral en 10 (21%) pacientes. 1 (2%) paciente tuvo solo recaída locorregional en mama contralateral siendo portadora de mutación en gen BRCA, mientras que 9 (19%) pacientes tuvieron recaída a distancia con o sin recaída locorregional añadida.

Se produjeron 5 (11%) exitus, de los cuales 4 (8%) fueron por progresión de enfermedad y 1 (1%) por sd neuroléptico maligno en paciente con antecedentes psiquiátricos. (Ver apartado 4.1. "Estudio descriptivo de las características clínico-anatomo-epidemiológicas" para detalles).

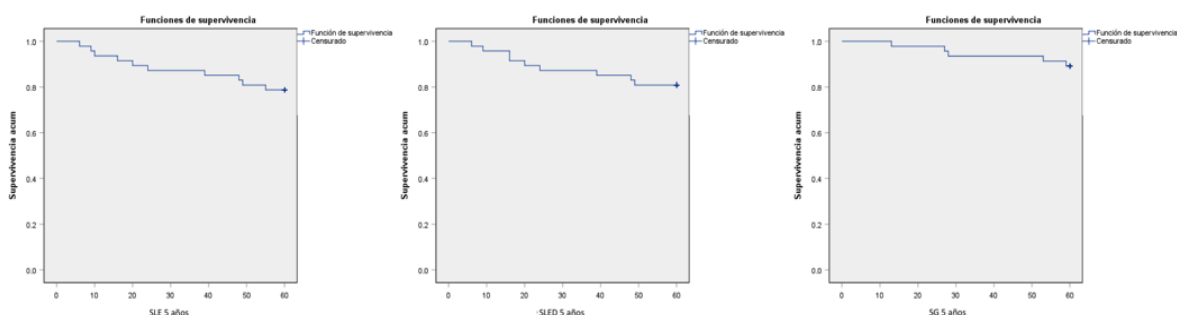


Figura 3. Curvas Kaplan Meier de SLE, SLED y SG a 5 años.

- **Según respuesta a QTNA.**

La SLE y la SG son similares en los dos sistemas de valoración de la respuesta (Miller & Payne; TNM patológico). Así, la SLE y la SG a los 5 años es mayor en aquellos pacientes que alcanzan RCp respecto a los pacientes con no RCp.

La SLE a los 5 años es del 86% vs 76% para RCp vs no RCp (mama+ganglionar). **Figuras 4 y 5.**

La SG a los 5 años es del 100% vs 86% para RCp vs no RCp (mama+ganglionar). Ningún paciente con RCp falleció tras un seguimiento de 5 años. **Figuras 6 y 7.**





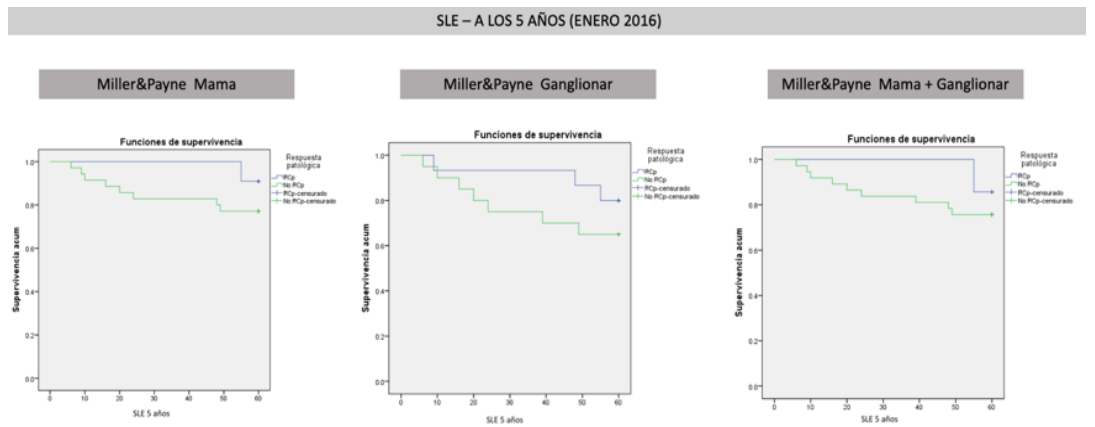


Figura 4. SLE a los 5 años según respuesta patológica medida por Sistema de Miller & Payne.

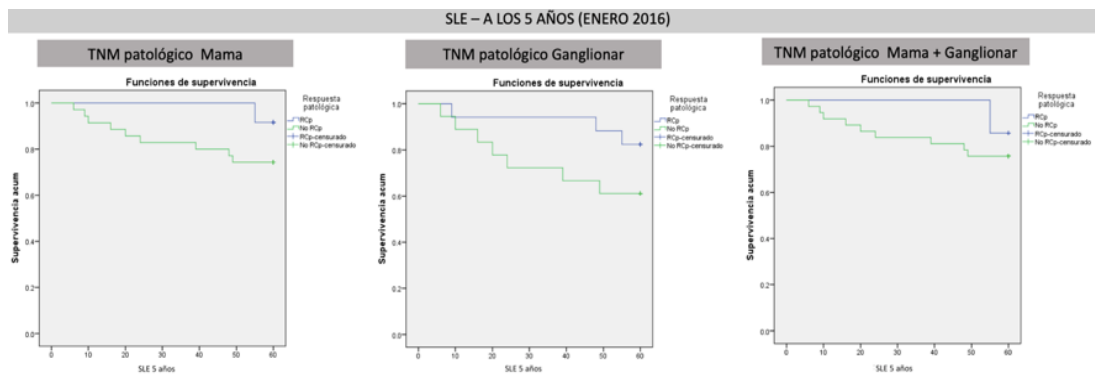


Figura 5. SLE a los 5 años según respuesta patológica medida por estadio TNM Patológico.

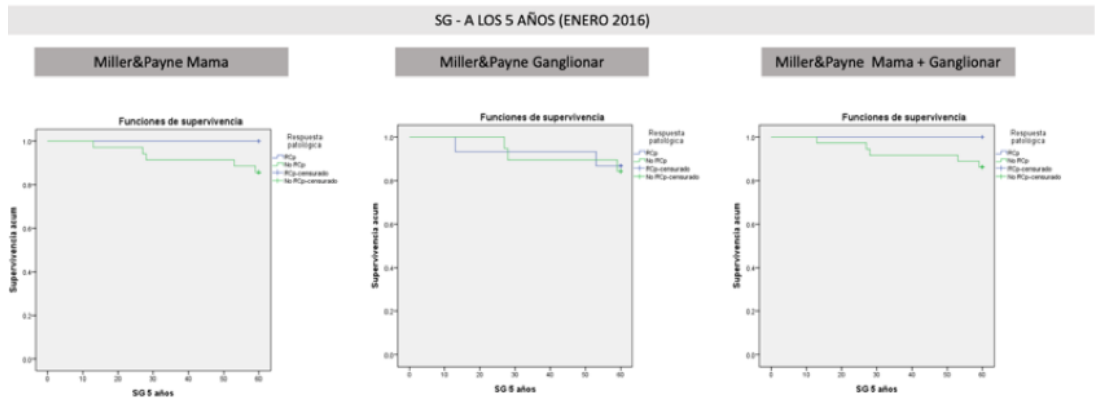


Figura 6. SG a los 5 años según respuesta patológica medida por Sistema de Miller & Payne.



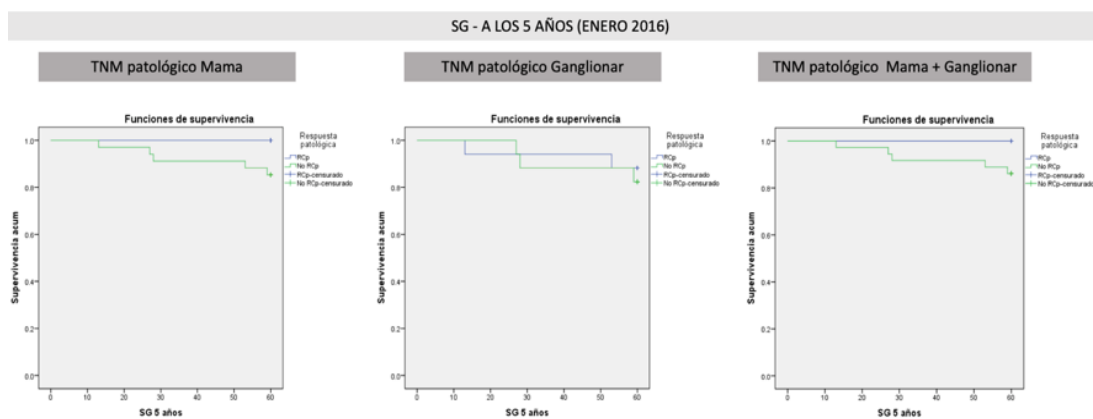


Figura 7. SG a los 5 años según respuesta patológica medida por estadio TNM Patológico.

### 4.3.2 Supervivencia a 9 años.

A fecha de 31 de enero de 2016, tras 9 años de seguimiento, los datos de supervivencia fueron **72.3%**, **74.5%** y **83.0%** para supervivencia libre de enfermedad (SLE), supervivencia libre de enfermedad a distancia (SLED) y supervivencia global (SG), respectivamente. [Figura 8.](#)

Se produjo recaída de la enfermedad tumoral en 13 (28%) pacientes. 1 (2%) paciente tuvo solo recaída locorregional en mama contralateral siendo portadora de mutación en gen BRCA, mientras que 11 (23%) pacientes tuvieron recaída a distancia con o sin recaída locorregional añadida.

Se produjeron 7 (15%) exitus, de los cuales 6 (13%) fueron por progresión de enfermedad y 1 (1%) por sd neuroléptico maligno en paciente con antecedentes psiquiátricos. (Ver apartado 1. “Estudio descriptivo de las características clínico-anatomo-epidemiológicas” para detalles).

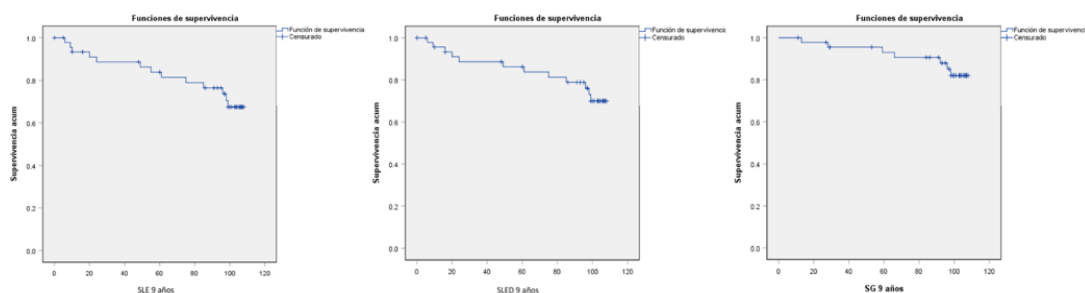


Figura 8. Curvas Kaplan Meier de SLE, SLED y SG a 9 años.

- **Según respuesta a QTNA.**

La SLE y la SG son similares en los dos sistemas de valoración de la respuesta (Miller & Payne; TNM patológico). Así, la SLE y la SG a los 9 años es



mayor en aquellos pacientes que alcanzan RCp respecto a los pacientes con no RCp.

La SLE a los 9 años es del 86% vs 68% para RCp vs no RCp (mama+ganglionar). Figuras 9 y 10.

La SG a los 9 años es del 100% vs 81% para RCp vs no RCp (mama+ganglionar). Figuras 11 y 12.

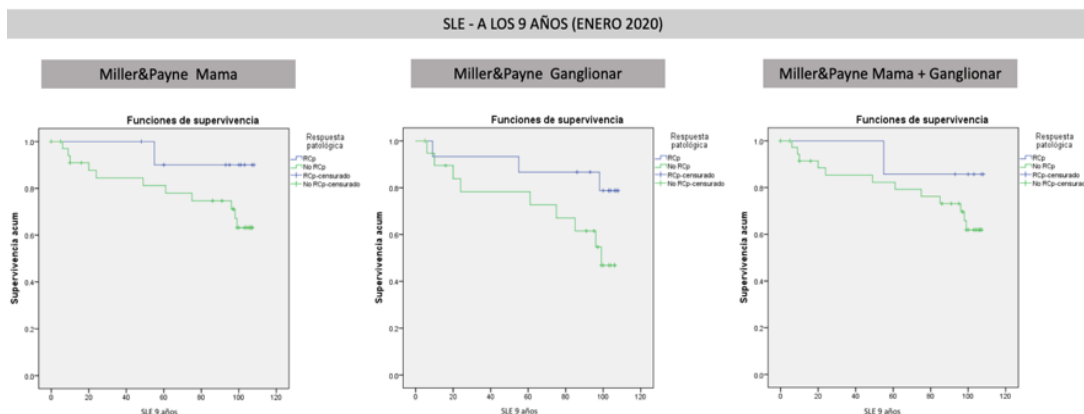


Figura 9. SLE a los 9 años según respuesta patológica medida por Sistema de Miller & Payne.

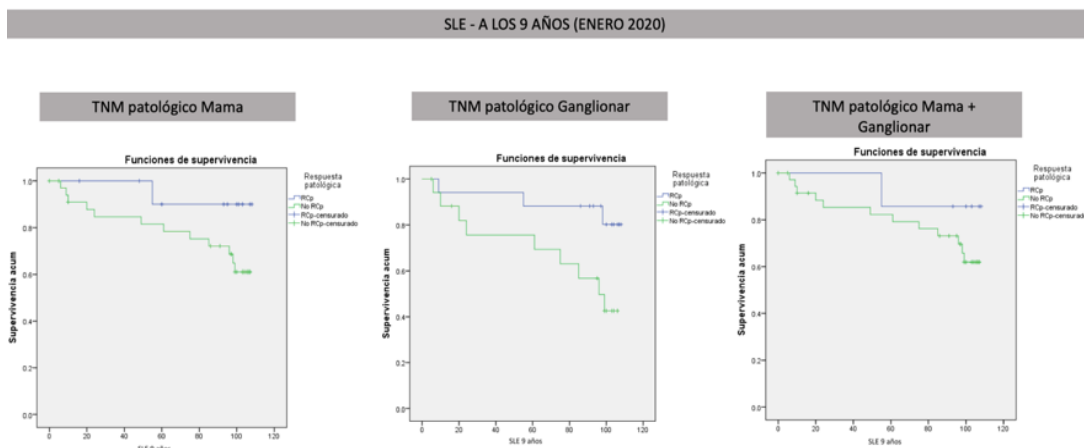


Figura 10. SLE a los 9 años según respuesta patológica medida por estadio TNM patológico.



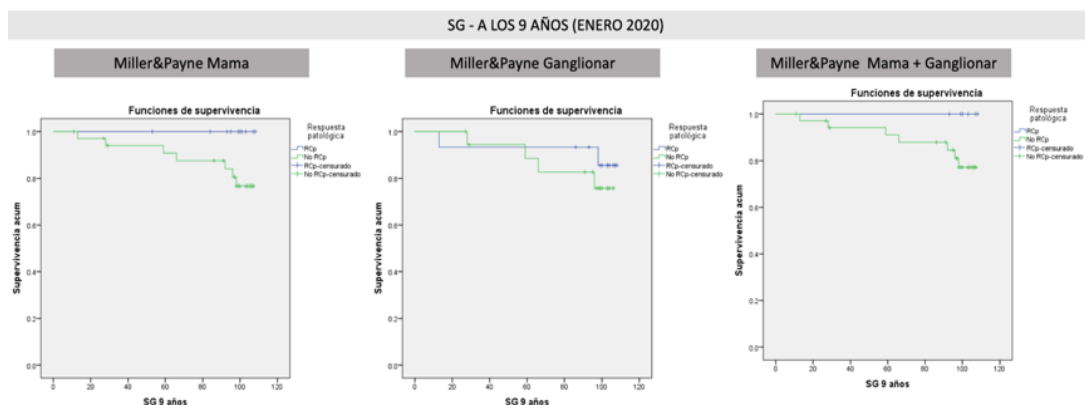


Figura 11. SG a los 9 años según respuesta patológica medida por Sistema Miller & Payne.

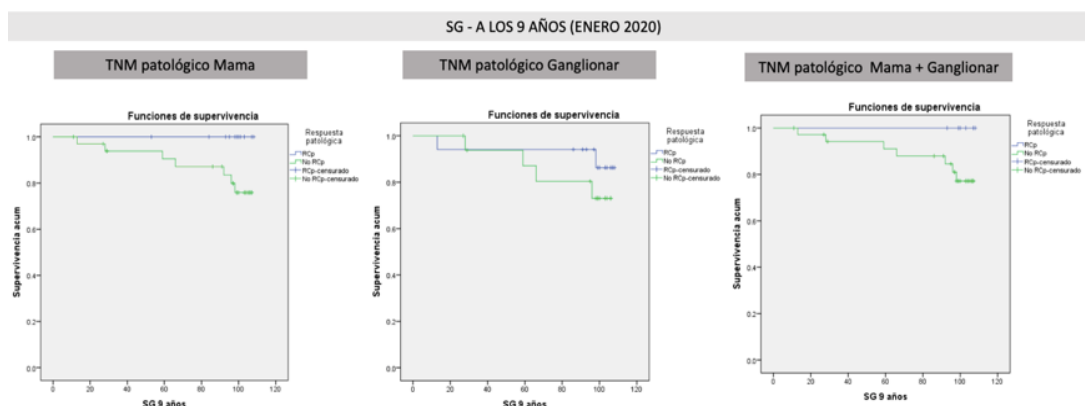


Figura 12. SG a los 9 años según respuesta patológica medida por estadio TNM patológico.

- **Según inmunofenotipo.**

La supervivencia libre de enfermedad (SLE y SLED) es mayor para las pacientes con inmunofenotipo HER2 puro, seguido del luminal (A, B, HER2) y posteriormente del triple negativo. [Figura 13.](#)

La supervivencia global (SG) es mayor para las pacientes con inmunofenotipo luminal HER2+, seguido del luminal A, HER2 puro, luminal B y posteriormente, del triple negativo. [Figura 13.](#)



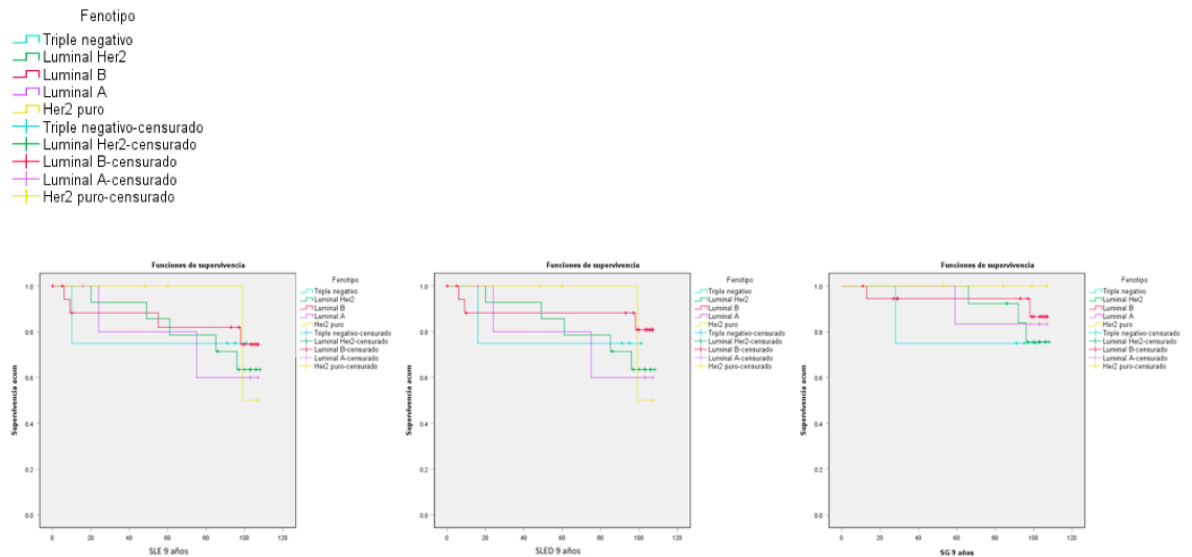


Figura 13. SLE, SLED y SG a los 9 años según inmunofenotipo.

**-Según sobreexpresión HER2.**

La supervivencia libre de enfermedad (SLE y SLED) y supervivencia global (SG) es mayor para las pacientes con sobreexpresión HER2 que han recibido terapia anti-HER2 (tarstuzumab) respecto a las pacientes sin sobreexpresión HER2. [Figura 14.](#)

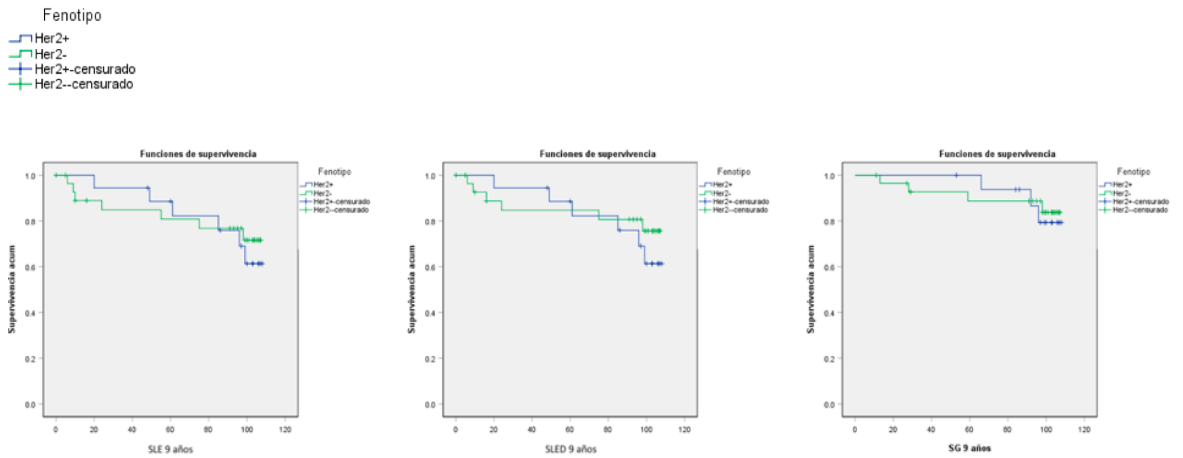


Figura 14. SLE, SLED y SG a los 9 años según sobreexpresión HER2.



## 4.4 ESTUDIO DEL PERFIL INMUNITARIO

### 4.4.1 Pacientes vs sanas.

- **Poblaciones celulares en sangre.**

Se lograron detectar **mayores niveles basales de leucocitos y neutrófilos estadísticamente significativos en pacientes** debido al mayor estado inflamatorio en esta cohorte respecto a sanas.

Las medianas de niveles basales de leucocitos fueron 9050 (IC 95% 6930-10360) vs 6825 (IC 95% 5700-7480) cels/ul en pacientes y en sanas respectivamente ( $p = 0.004$ ). Las medianas de niveles basales de neutrófilos fueron 6000 (IC 95% 4970-8319) vs 3625 (IC 95% 3180-3860) cels/ul en pacientes y en sanas respectivamente ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, **no hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de monocitos** en pacientes vs sanas. [Tabla 13](#), [Figura 15](#).

**La cohorte de pacientes tiene menores niveles basales estadísticamente significativos de subtipos celulares con actividad anti-tumor (linfocitos totales, linfocitos B, linfocitos T, linfocitos T CD4+ cooperadores y de linfocitos T CD8+ citotóxicos) respecto a sanas.**

Las medianas de niveles basales de linfocitos fueron 1120 (IC 95% 980-1360) vs 2090 (IC 95% 1740-2410) cels/ul en pacientes y en sanas respectivamente ( $p < 0.001$ ). Las medianas de niveles basales de linfocitos B fueron 147 (IC 95% 132-202) vs 199 (IC 95% 175-263) cels/ul en pacientes y en sanas respectivamente ( $p = 0.009$ ). Las medianas de niveles basales de linfocitos T fueron 890 (IC 95% 587-1096) vs 1610 (IC 95% 1245-1709) cels/ul en pacientes y en sanas respectivamente ( $p < 0.001$ ). Las medianas de niveles basales de linfocitos T CD4 fueron 476 (IC 95% 308-646) vs 968 (IC 95% 824-1138) cels/ul en pacientes y en sanas respectivamente ( $p < 0.001$ ). Las medianas de niveles basales de linfocitos T CD8+ fueron 299 (IC 95% 226-360) vs 467 (IC 95% 446-503) cels/ul en pacientes y en sanas respectivamente ( $p < 0.001$ ).

Además, se observaron **mayores niveles basales, estadísticamente significativos, de linfocitos Tregs en pacientes** vs sanas.

Las medianas de niveles basales de linfocitos Tregs fueron 93 (IC 95% 73-135) vs 65 (IC 95% 49-83) cels/ul en pacientes y en sanas respectivamente ( $p = 0.028$ ).

**No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles basales de linfocitos NK entre sanas y enfermas.** [Tabla 13](#), [Figura 15](#).

	Pacientes	Sanas	Valor p
<b>Leucocitos</b>	9050 (6930-10360)	6825 (5700-7480)	<b>0.004</b>
<b>Neutrófilos</b>	6000 (4970-8319)	3625 (3180-3860)	<b>&lt;0.001</b>



Linfocitos	1120 (980-1360)	2090 (1740-2410)	<0.001
Monocitos	450 (390-540)	530 (440-570)	0.336
Linfocitos T	890 (587-1096)	1610 (1245-1709)	<0.001
Linfocitos B	147 (132-202)	199 (175-263)	0.009
Linfocitos NK	201 (185-246)	246 (170-286)	0.566
Linfocitos T CD4+	476 (308-646)	968 (824-1138)	<0.001
Linfocitos T CD8+	299 (226-360)	467 (446-503)	0.001
Linfocitos Treg	93 (73-135)	65 (49-83)	0.028
Ratio neutrófilos/linfocitos	4.34 (2.71-6.65)	1.76 (1.36-2.14)	<0.001
Ratio linfocitos/monocitos	3.18 (2.57-3.97)	4.38 (3.71-4.95)	0.018
Ratio CD4/CD8	1.63 (1.45-1.81)	2.15 (1.98-2.44)	0.003
Ratio CD8/Treg	2.4 (1.97-3.14)	5.13 (3.86-7.33)	<0.001

Tabla 13. Medianas (IC 95%) de niveles (cels/ul) y ratios basales de poblaciones celulares del sistema inmunitario en sangre periférica en sanas versus pacientes.

**Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores basales de los ratios de las poblaciones celulares entre pacientes vs sanas.**

El ratio neutrófilos/linfocitos es mayor en pacientes que en sanas 4.34 (IC 95% 2.71-6.65) vs 1.76 (IC 95% 1.36-2.14), respectivamente,  $p < 0.001$ .

El ratio linfocitos/monocitos es menor en pacientes que en sanas 3.18 (IC 95% 2.57-3.97) vs 4.38 (IC 95% 3.71-4.95), respectivamente,  $p = 0.018$ .

El ratio CD4/CD8 es menor en pacientes que en sanas 1.63 (IC 95% 1.45-1.81) vs 2.15 (IC 95% 1.98-2.44), respectivamente,  $p = 0.003$ .

El ratio CD8/Treg es menor en pacientes que en sanas 2.40 (IC 95% 1.97-3.14) vs 5.13 (IC 95% 3.86-7.33), respectivamente,  $p < 0.001$ .



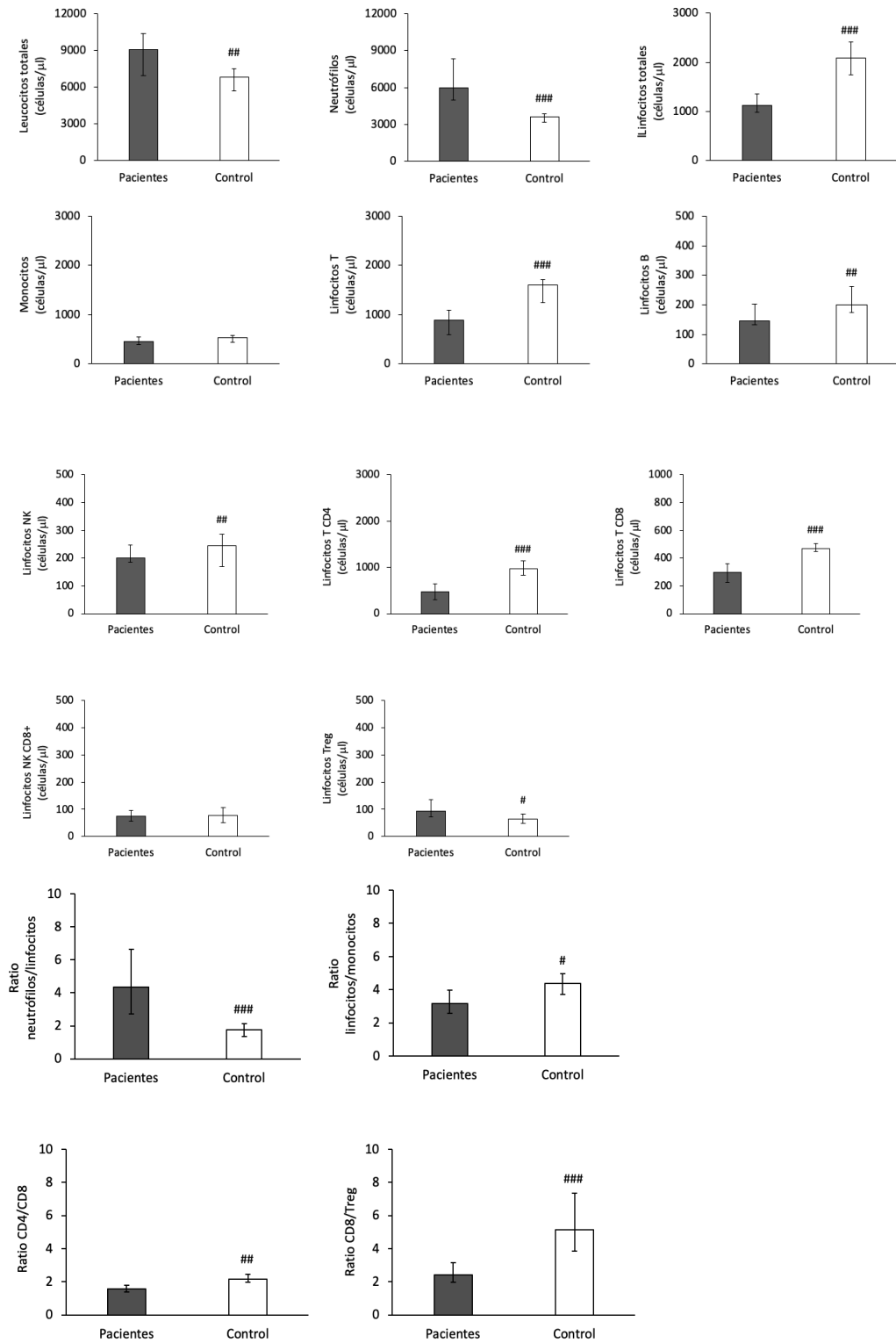


Figura 15. Medianas (IC 95%) de niveles (cels/ul) y ratios basales de poblaciones celulares del sistema inmunitario en sangre periférica en sanas versus pacientes. #,





## y ###,  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente, comparativa con pacientes. Se han empleado diferentes escalas.

- **Vitamina D en sangre**

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles basales de vitamina D en sanas versus pacientes. Los niveles de vitamina D fueron 18.6 (IC 95% 16.0-22.6) vs 16.6 (IC 95% 14.7-21.3) ng/mL en pacientes vs sanas ( $p = 0.986$ ).

Tabla 14, Figura 16.

	Pacientes	Sanas	Valor p
<b>Vitamina D</b>	18.6 (16.0-22.6)	16.6 (14.7-21.3)	0.986

Tabla 14. Medianas (IC 95%) de niveles (ng/mL) basales de vitamina D en sangre periférica en sanas versus pacientes.

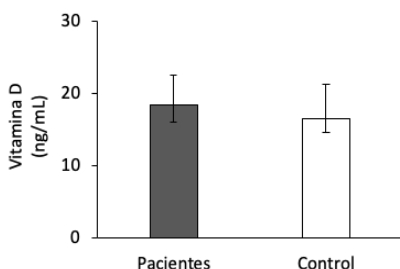


Figura 16. Medianas (IC 95%) de niveles (ng/mL) basales de vitamina D en sangre periférica en sanas versus pacientes.

- **Poblaciones celulares y vitamina D en sangre.**

**-Cohorte de sanas.**

No hay relación entre los valores basales de vitamina D y las poblaciones celulares ni ratios en sangre periférica en cohorte de sanas. Tablas 15 y 16.

		Correlaciones										
		Leucocitos	Neutrófilos	Linfocitos Totales	Monocitos	Linfocitos T	Linfocitos B	Linfocitos NK	LinfocitosT_CD4	LinfocitosT_CD8	LinfocitosNK_CD8	Treg
Rho de Spearman	Vitamina D	.069	.041	.350	.345	.295	.156	.106	.245	-.105	-.045	.434
	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral)	.799	.884	.168	.174	.251	.550	.696	.361	.700	.864	.121

Tabla 15. Correlación entre los valores basales de vitamina D y las poblaciones celulares en sangre periférica en cohorte de sanas mediante coeficiente de correlación de Spearman.



Correlaciones						
			RatioNL	RatioLM	RatioCD8Treg	RatioCD8CD4
Rho de Spearman	VitD	Coefficiente de correlación	-.169	-.141	-.429	.106
		Sig. (bilateral)	.516	.602	.086	.696

Tabla 16. Correlación entre los valores basales de vitamina D y ratio de poblaciones celulares en sangre periférica en cohorte de sanas mediante coeficiente de correlación de Spearman. *Ratio NL, ratio neutrófilos/linfocitos; Ratio LM, linfocitos/monocitos.*

#### -Cohorte de pacientes.

No hay relación entre los valores basales de la vitamina D y las poblaciones celulares (y ratios) estudiadas en sangre periférica y en tejido en pacientes. Niveles elevados de vitamina D no se correlacionan con niveles elevados de poblaciones celulares anti-tumor (linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+ cooperadores, NK, NKCD8+, ratio CD8/Tregs elevado). Niveles bajos de vitamina D no se correlacionan con niveles bajos de poblaciones celulares pro-tumor (Tregs). [Tablas 17 y 18.](#)

Correlaciones															
			Leucocitos	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	B1_CD3 rec	B1_CD19 rec	B1_CD16-56 (NK) rec	B1_CD3-4 rec	B1_CD3-8 rec	B1_CD25 H (TREG) rec	CD8 tejido (1= antes neoadyuvancia)	CD8 tejido (1)	FovP3 tejido (1)
Rho de Spearman	Vitamina D	Coefficiente de correlación	.040	.044	.020	-.084	.003	.212	-.248	.023	.132	-.190	-.196	-.274	-.049
		Sig. (bilateral)	.821	.801	.908	.636	.986	.222	.151	.894	.443	.266	.291	.136	.792

Tabla 17. Correlación entre los valores basales de vitamina D y las poblaciones celulares en cohorte de enfermas mediante coeficiente de correlación de Spearman.

Correlaciones						
			RatioNL	RatioLM	RatioCD8Treg	RatioCD8CD4
Rho de Spearman	VitD	Coefficiente de correlación	.198	-.113	.219	.185
		Sig. (bilateral)	.248	.493	.180	.281

Tabla 18. Correlación entre los valores basales de vitamina D y ratio de poblaciones celulares en sangre periférica en cohorte de enfermas mediante coeficiente de correlación de Spearman. *Ratio NL, ratio neutrófilos/linfocitos; Ratio LM, linfocitos/monocitos.*

#### 4.4.2 Correlación con la RCp.

##### POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA

- Sistema TNM patológico. [Tablas 19 y 21.](#)
  - a. Respuesta patológica en mama (ypT0/Tis). [Figura 17.](#)

Se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de **leucocitos totales** en RCp con medianas de 8360 (IC 95% 6570-12000) vs 4060 (IC 95% 1057-6525) cels/ul en basal y C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ).



No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la variación de los niveles de **neutrófilos o monocitos** en sangre periférica antes, durante o tras el tratamiento, ni entre los valores de aquellos pacientes que alcanzan RCp vs no RCp medida en mama.

Sin embargo, se produce descenso estadísticamente significativo de los niveles de **linfocitos totales** en no RCp con medianas de 1182 (IC 95% 1020-1750) vs 360 (IC 95% 155-590) cels/ul en basal y C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ). Además, los niveles basales de linfocitos totales en no RCp son estadísticamente más elevados respecto a los niveles basales de RCp con medianas de 1182 (IC 95% 1020-1750) vs 830 (IC 95% 705-1240) cels/ul ( $p = 0.045$ ).

En los **linfocitos B y linfocitos NK** se produce un descenso estadísticamente significativo tanto en RCp como en no RCp. Así, las medianas de los niveles de linfocitos B en no RCp fueron 164 (IC 95% 136-224) vs 33 (IC 95% 17-46) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ); y los niveles de linfocitos B en RCp fueron 146 (IC 95% 89-243) vs 51 (IC 95% 32-79) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.015$ ). Mientras las medianas de los niveles de linfocitos NK en no RCp fueron 213 (IC 95% 183-270) vs 127 (IC 95% 97-163) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.001$ ); y los niveles de linfocitos NK en RCp fueron 195 (IC 95% 154-214) vs 114 (IC 95% 80-173) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.017$ ).

En cuanto a los **linfocitos T**, hay un descenso significativo en no RCp con medianas de 972 (IC 95% 728-1128) vs 583 (IC 95% 319-710) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.003$ ); mientras prácticamente no hay modificación de los niveles de linfocitos T en RCp con medianas de 610 (IC 95% 403-968) vs 500 (IC 95% 439-718) cels/ul en basal vs C6, respectivamente. Estas variaciones observadas en los linfocitos T con el tratamiento aplicado podrían estar en relación al descenso estadísticamente significativo de las subpoblaciones de **linfocitos T CD8+ y T CD4+** en no RCp vs no modificación de los niveles de los mismos en RCp. Los niveles de linfocitos T CD8+ en no RCp fueron 308 (IC 95% 230-459) vs 179 (IC 95% 122-317) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.004$ ); mientras que en RCp fueron 252 (IC 95% 189-380) vs 286 (IC 95% 211-384) cels/ul en basal vs C6, respectivamente. Los niveles de linfocitos T CD4+ en no RCp fueron 508 (IC 95% 406-637) vs 296 (IC 95% 151-381) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.006$ ); mientras que en RCp fueron 305 (IC 95% 222-476) vs 264 (IC 95% 111-483) cels/ul en basal vs C6, respectivamente. Sin embargo, y aunque se observa una tendencia al descenso de los niveles de **linfocitos Tregs** con el tratamiento tanto en RCp y en no RCp, el descenso es mayor en RCp (no estadísticamente significativo).

**El ratio neutrófilos/linfocitos** aumenta a lo largo del tratamiento en no RCp, con diferencias estadísticamente significativas entre basal 5.24 (IC 95% 2.80-7.50) vs C6 8.74 (IC 95% 6.32-10.86),  $p=0.047$ .

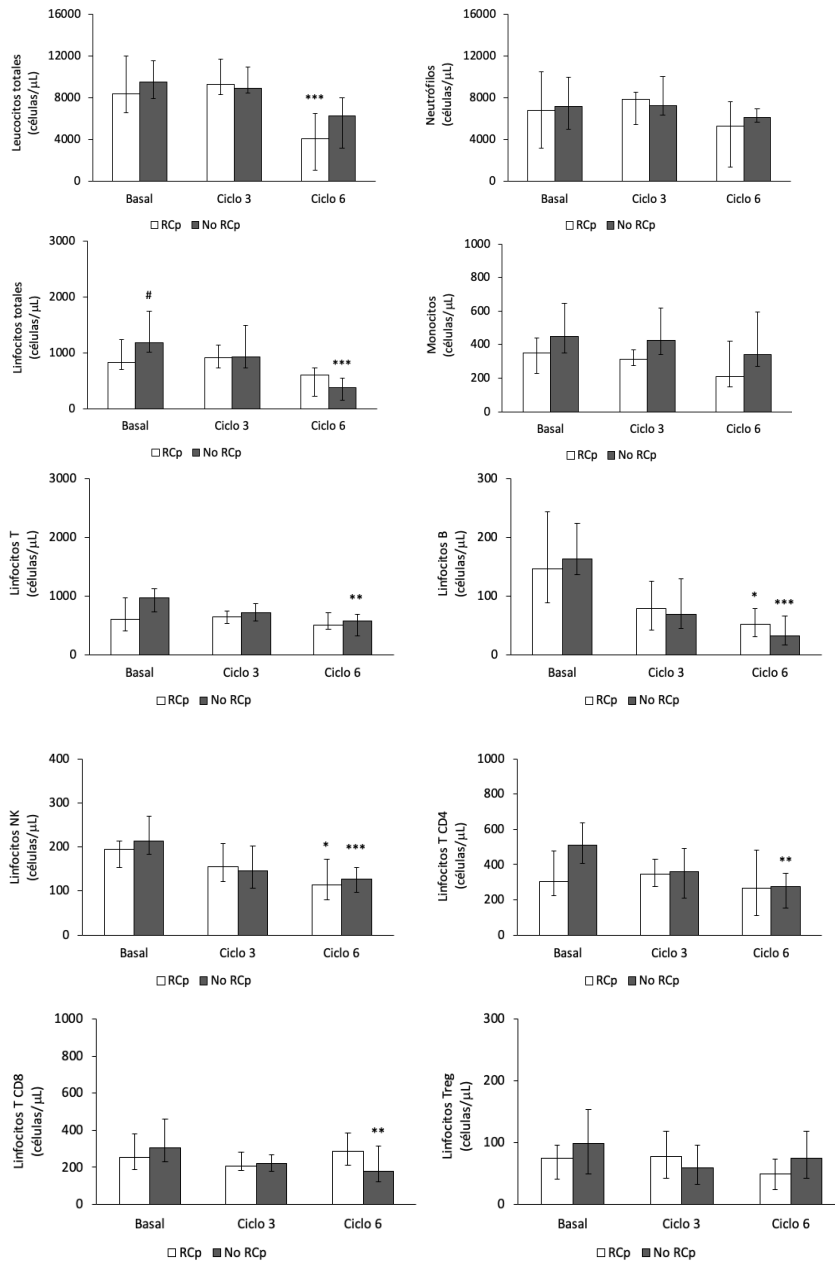
**El ratio linfocitos/monocitos** disminuye a lo largo del tratamiento en no RCp, mientras que se mantiene constante en RCp. Los valores fueron en basal 3.06 (IC



95% 2.44-3.78) vs C6 1.54 (IC 95% 1.12-1.87) en no RCp, p = 0.001. Los valores en C6 fueron 3.72 (IC 95% 1.74-6.13) en RCp vs 1.54 (IC 95% 1.12-1.87) en no RCp, p = 0.008.

**El ratio CD8/Treg** disminuye ligeramente en no RCp y aumenta en RCp a lo largo del tratamiento pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

**El ratio CD4/CD8** disminuye ligeramente en no RCp a lo largo del tratamiento, con diferencias estadísticamente significativas entre basal 1.67 (IC 95% 1.41-1.86) vs C6 1.25 (IC 95% 1.06-1.46), p=0.03.



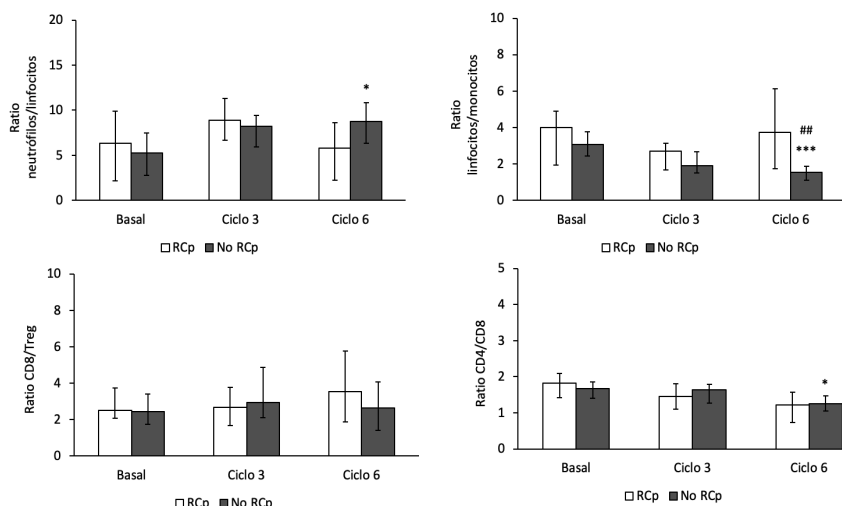


Figura 17. Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama (estadio TNM patológico). \*, \*\* y \*\*\*,  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente, comparativa con basal. # y ##,  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ , respectivamente, comparativa con RCp en basal. Se han empleado diferentes escalas.

## 2. Respuesta patológica ganglionar (ypN0). Figura 18.

Aunque se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de **leucocitos totales** en RCp con medianas de 6625 (IC 95% 5700-8895) vs 4700 (IC 95% 1411-7082) cels/ul en basal y C6, respectivamente ( $p = 0.012$ ), este descenso es menos significativo que cuando se ha valorado la respuesta patológica sólo en mama. Además, encontramos que los valores de los mismos en RCp son menores y estadísticamente significativos en cada una de las mediciones (basal, C3 y C6) respecto a no RCp. Las medianas de los niveles de neutrófilos para RCp vs no RCp fueron 6625 (IC 95% 5700-8895) vs 11350 (IC 95% 7845-11440) cels/ul ( $p = 0.005$ ), 7750 (IC 95% 4940-10065) vs 10205 (IC 95% 8900-13699) cels/ul ( $p = 0.047$ ) y 4700 (IC 95% 1411-7082) vs 7760 (IC 95% 5865-8900) cels/ul ( $p = 0.048$ ) en medición basal, C3 y C6, respectivamente.

Al igual que cuando se ha valorado la respuesta patológica sólo en mama, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la variación de los niveles de **neutrófilos y monocitos** en sangre periférica antes, durante o tras el tratamiento, al mantenerse prácticamente constantes. Sin embargo, sí se muestran menores niveles estadísticamente significativos de estas poblaciones celulares en aquellos pacientes que alcanzan RCp vs no RCp tanto a nivel basal como en C6. Las medianas de los niveles de neutrófilos para RCp vs no RCp fueron 5325 (IC 95% 3350-7150) vs 8330 (IC 95% 5310-10480) cels/ul ( $p = 0.02$ ) y 4350 (IC 95%



1354-6330) vs 6070 (IC 95% 5475-7660) cels/ul ( $p = 0.046$ ) para basal y C6, respectivamente. Las medianas de los niveles de monocitos para RCp vs no RCp fueron 320 (IC 95% 190-450) vs 570 (IC 95% 360-710) cels/ul ( $p = 0.02$ ) y 205 (IC 95% 109-315) vs 510 (IC 95% 380-780) cels/ul ( $p = 0.001$ ) en medición basal y C6, respectivamente.

Se produce descenso estadísticamente significativo de los niveles de **linfocitos totales** en no RCp con medianas de 1270 (IC 95% 880-1820) vs 480 (IC 95% 105-860) cels/ul en basal y C6, respectivamente ( $p = 0.008$ ). Sin embargo, en RCp prácticamente no hay apenas modificación de los niveles de esta población celular. En los **linfocitos B** y **linfocitos NK** también se produce un descenso estadísticamente significativo tanto en RCp como en no RCp. Así, las medianas de los niveles de linfocitos B en no RCp fueron 154 (IC 95% 123-246) vs 22 (IC 95% 17-38) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ); y los niveles de linfocitos B en RCp fueron 164 (IC 95% 105-251) vs 31 (IC 95% 6-46) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.022$ ). Mientras las medianas de los niveles de linfocitos NK en no RCp fueron 200 (IC 95% 188-253) vs 100 (IC 95% 75-129) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.012$ ); y los niveles de linfocitos NK en RCp fueron 228 (IC 95% 167-294) vs 158 (IC 95% 94-198) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.012$ ).

En cuanto a los **linfocitos T**, hay un descenso significativo en no RCp con medianas de 889 (IC 95% 528-1260) vs 701 (IC 95% 347-893) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.017$ ); mientras prácticamente no hay modificación de los niveles de linfocitos T en RCp con medianas de 649 (IC 95% 414-925) vs 516 (IC 95% 400-664) cels/ul en basal vs C6, respectivamente. Estas variaciones observadas en los linfocitos T con el tratamiento aplicado podría estar en relación al descenso estadísticamente significativo de las subpoblaciones de **linfocitos T CD8+** en no RCp vs no modificación de los niveles de los mismos en RCp. Además, destaca la significación estadística que se muestra en los niveles de linfocitos T CD8+ al inicio de tratamiento entre RCp vs no RCp. Los niveles de linfocitos T CD8+ en basal fueron 201 (IC 95% 140-308) vs 401 (IC 95% 221-511) cels/ul en RCp vs no RCp, respectivamente ( $p = 0.009$ ).

Sin embargo, los niveles de linfocitos T CD4+ apenas se modificaron. Los niveles de linfocitos T CD4+ en no RCp fueron 410 (IC 95% 241-616) vs 327 (IC 95% 222-414) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo); mientras que en RCp fueron 314 (IC 95% 225-505) vs 276 (IC 95% 230-382) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo).

Se observa un descenso de los niveles de **linfocitos Tregs** a lo largo del tratamiento en RCp, mientras que se mantienen constantes en no RCp. Los niveles de linfocitos Tregs en no RCp fueron 96 (IC 95% 54-160) vs 105 (IC 95% 85-128) cels/ul en basal vs C6, respectivamente; mientras que en RCp fueron 80 (IC 95% 40-126) vs 38 (IC 95% 28-63) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). En cambio sí se detectan diferencias estadísticas al final de tratamiento con los niveles de linfocitos Tregs entre RCp vs no RCp. Los niveles de



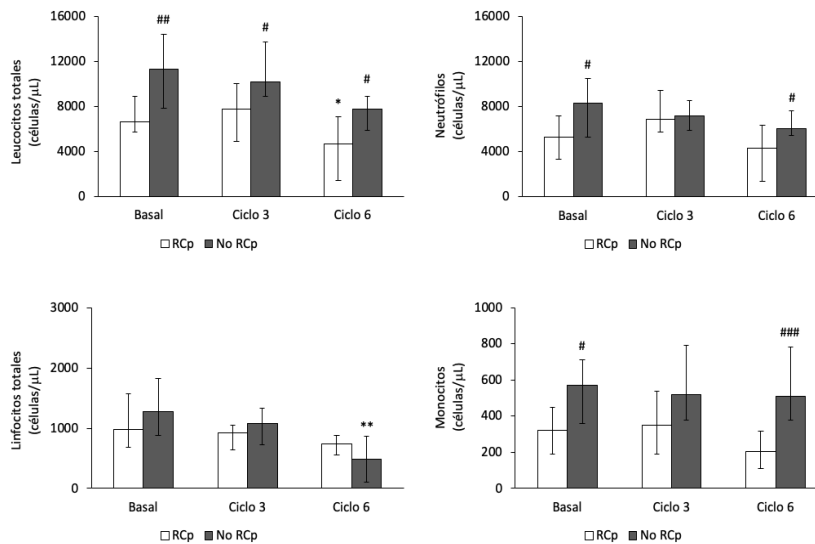
linfocitos Tregs en C6 fueron 38 (IC 95% 28-63) vs 105 (IC 95% 85-128) cels/ul en RCp vs no RCp, respectivamente ( $p < 0.001$ ).

**El ratio neutrófilos/linfocitos** aumenta a lo largo del tratamiento en no RCp, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

**El ratio linfocitos/monocitos** disminuye a lo largo del tratamiento en no RCp (estadísticamente significativo), mientras que se mantiene constante en RCp. Los valores fueron en basal 3.12 (IC 95% 1.72-3.91) vs C6 1.12 (0.36-2.39) en no RCp,  $p = 0.0017$ . Además, tras tratamiento (C6), los pacientes con no RCp tienen menor ratio que los que alcanzan RCp. Los valores en C6 fueron 3.25 (IC 95% 1.95-5.13) en RCp vs 1.12 (IC 95% 0.36-2.39) en no RCp,  $p = 0.049$ .

**El ratio CD8/Treg** disminuye ligeramente en no RCp y aumenta en RCp a lo largo del tratamiento, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

**El ratio CD4/CD8** disminuye en no RCp a lo largo del tratamiento, con diferencias estadísticamente significativas entre basal 1.37 (IC 95% 0.86-1.78) vs C6 0.88 (IC 95% 0.34-1.28),  $p=0.049$ . Además, tras tratamiento (C6), los pacientes con no RCp tienen menor ratio que los que alcanzan RCp. Los valores en C6 fueron 1.87 (IC 95% 1.08-2.63) en RCp vs 0.88 (IC 95% 0.34-1.28) en no RCp,  $p = 0.007$ .



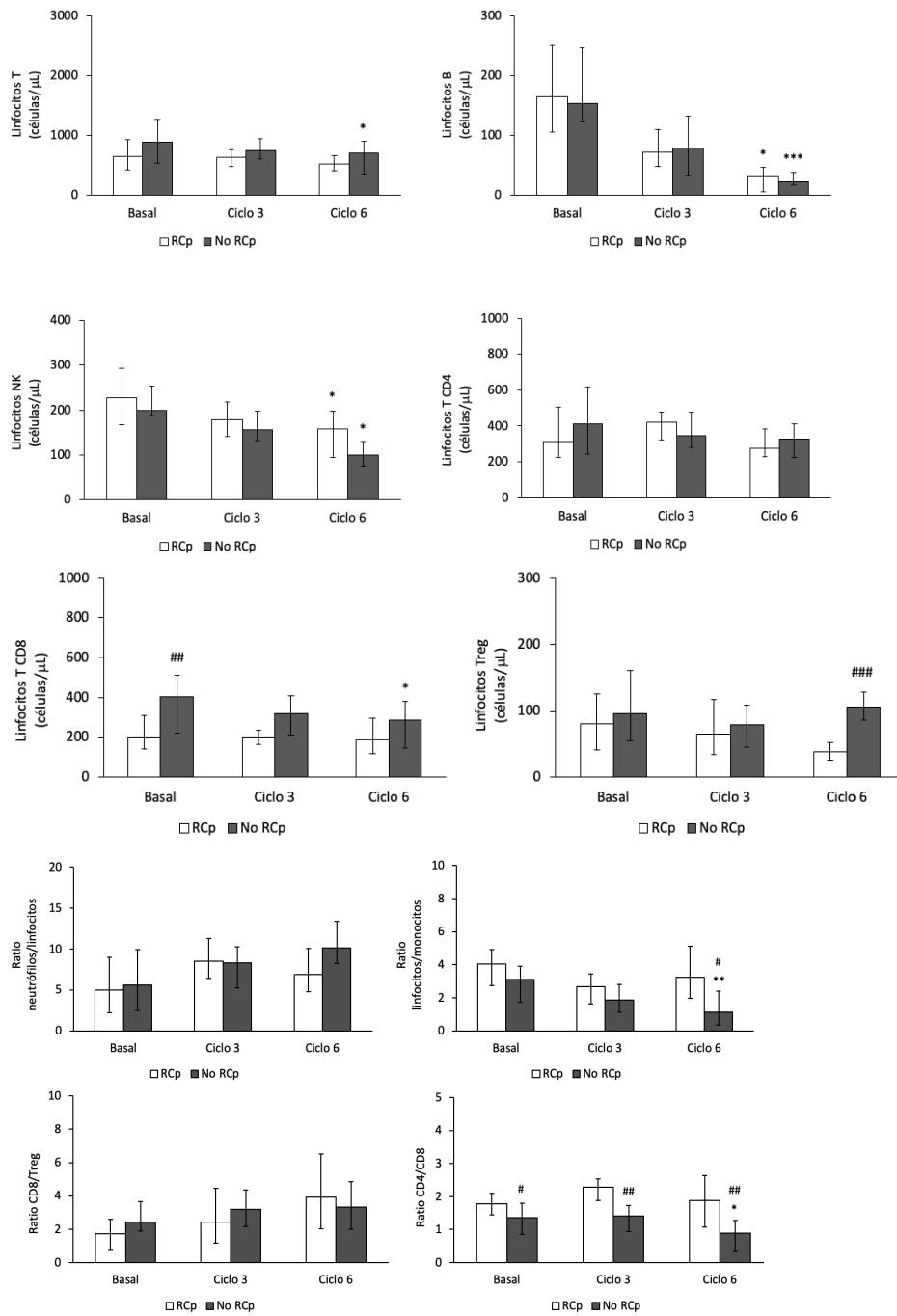


Figura 18. Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica ganglionar (estadio TNM patológico). \*, \*\* y \*\*\*,  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente, comparativa con basal. #, ## y ###,  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente, comparativa con RCp. Se han empleado diferentes escalas.





### 3. Respuesta patológica en mama y ganglionar (ypT0/Tis ypN0). Figura 19.

Hay mayores niveles basales estadísticamente significativos de **leucocitos totales** en no RCp respecto a RCp con medianas de 8600 (IC 95% 6710-9720) vs 6135 (IC 95% 4050-6740) cels/ul, respectivamente ( $p = 0.011$ ). Además, los niveles de esta población celular, aunque tienden a aumentar en C3, se mantienen con valores similares a los basales en C6 tanto en RCp como en no RCp. Los niveles de leucocitos totales en RCp fueron 6135 (IC 95% 4050-6740) vs 5300 (IC 95% 2820-6400) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo) y los niveles en no RCp fueron 8600 (IC 95% 6710-9720) vs 7490 (IC 95% 6030-8355) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). Aunque no se encontraron diferencias estadísticas en las variaciones de los niveles de **neutrófilos** a lo largo del tratamiento, dado que se mantienen similares los niveles antes y tras tratamiento, sí se observan mayores niveles estadísticamente significativos de neutrófilos basales y en C6 en no RCp respecto a RCp. Los niveles basales fueron 3775 (IC 95% 2150-5513) vs 8600 (IC 95% 6710-9720) cels/ul en RCp vs no RCp, respectivamente ( $p = 0.007$ ) y los niveles en C6 fueron 4350 (IC 95% 1410-5310) vs 7490 (IC 95% 6030-8355) cels/ul en RCp vs no RCp, respectivamente ( $p = 0.005$ ).

Sin embargo, si se observa un descenso en los valores de **monocitos** a lo largo del tratamiento en RCp vs apenas modificación de los mismos en no RCp. De este modo, hay diferencias estadísticas con los niveles de monocitos en C6 entre RCp vs no RCp. Los niveles de monocitos en RCp fueron 335 (IC 95% 250-420) vs 200 (IC 95% 150-210) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.043$ ) y los niveles en no RCp fueron 450 (IC 95% 380-650) vs 350 (IC 95% 310-540) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). En C6, los niveles de monocitos fueron 200 (IC 95% 150-210) vs 350 (IC 95% 310-540) cels/ul en RCp vs no RCp, respectivamente ( $p = 0.019$ ).

Se produce descenso estadísticamente significativo de los niveles de **linfocitos totales** en no RCp con medianas de 1220 (IC 95% 970-1750) vs 380 (IC 95% 155-760) cels/ul en basal y C6, respectivamente ( $p = 0.001$ ). Sin embargo, en RCp, aunque se produce también descenso de los niveles, éste es menor con medianas de 1030 (IC 95% 750-1730) vs 740 (IC 95% 305-920) cels/ul en basal y C6, respectivamente ( $p=0.046$ ).

En los niveles de **linfocitos B** y **linfocitos NK** también se produce un descenso tanto en RCp como en no RCp, pero con significación estadística sólo en no RCp. Así, las medianas de los niveles de linfocitos B en no RCp fueron 154 (IC 95% 137-223) vs 25 (IC 95% 17-38) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ); y los niveles de linfocitos B en RCp fueron 136 (IC 95% 89-232) vs 52 (IC 95% 46-74) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). Mientras, las medianas de los niveles de linfocitos NK en no RCp fueron 202 (IC 95% 186-258) vs 125 (IC 95% 79-178) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.001$ ); y



los niveles de linfocitos NK en RCp fueron 223 (IC 95% 155-307) vs 156 (IC 95% 95-258) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). En cuanto a los **linfocitos T**, hay un descenso significativo en no RCp con medianas de 807 (IC 95% 690-1096) vs 550 (IC 95% 353-701) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.003$ ); mientras prácticamente no hay modificación de los niveles de linfocitos T en RCp con medianas de 687 (IC 95% 456-1170) vs 518 (IC 95% 400-882) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). Estas variaciones observadas en los linfocitos T con el tratamiento aplicado podría estar en relación al descenso estadísticamente significativo de las subpoblaciones de **linfocitos T CD8+ y T CD4+** en no RCp vs no modificación de los niveles de T CD4+ y discreto aumento de T CD8+ en RCp. Los niveles de linfocitos T CD8+ en no RCp fueron 304 (IC 95% 226-421) vs 180 (IC 95% 127-272) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.005$ ); mientras que en RCp fueron 298 (IC 95% 154-425) vs 327 (IC 95% 215-377) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). Los niveles de linfocitos T CD4+ en no RCp fueron 441 (IC 95% 262-616) vs 296 (IC 95% 222-382) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.013$ ); mientras que en RCp fueron 334 (IC 95% 207-575) vs 276 (IC 95% 111-483) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo).

Se observa un descenso de los niveles de **linfocitos Tregs** a lo largo del tratamiento en RCp, mientras que se mantienen constantes en no RCp. Los niveles de linfocitos T regs en no RCp fueron 95 (IC 95% 62-154) vs 84 (IC 95% 50-116) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo); mientras que en RCp fueron 87 (IC 95% 41-130) vs 25 (IC 95% 10-45) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.043$ ). En este sentido, se detectan diferencias estadísticas al final de tratamiento con los niveles de linfocitos Tregs entre RCp vs no RCp. Los niveles de linfocitos Tregs en C6 fueron 25 (IC 95% 10-45) vs 84 (IC 95% 50-116) cels/ul en RCp vs no RCp, respectivamente ( $p = 0.003$ ).

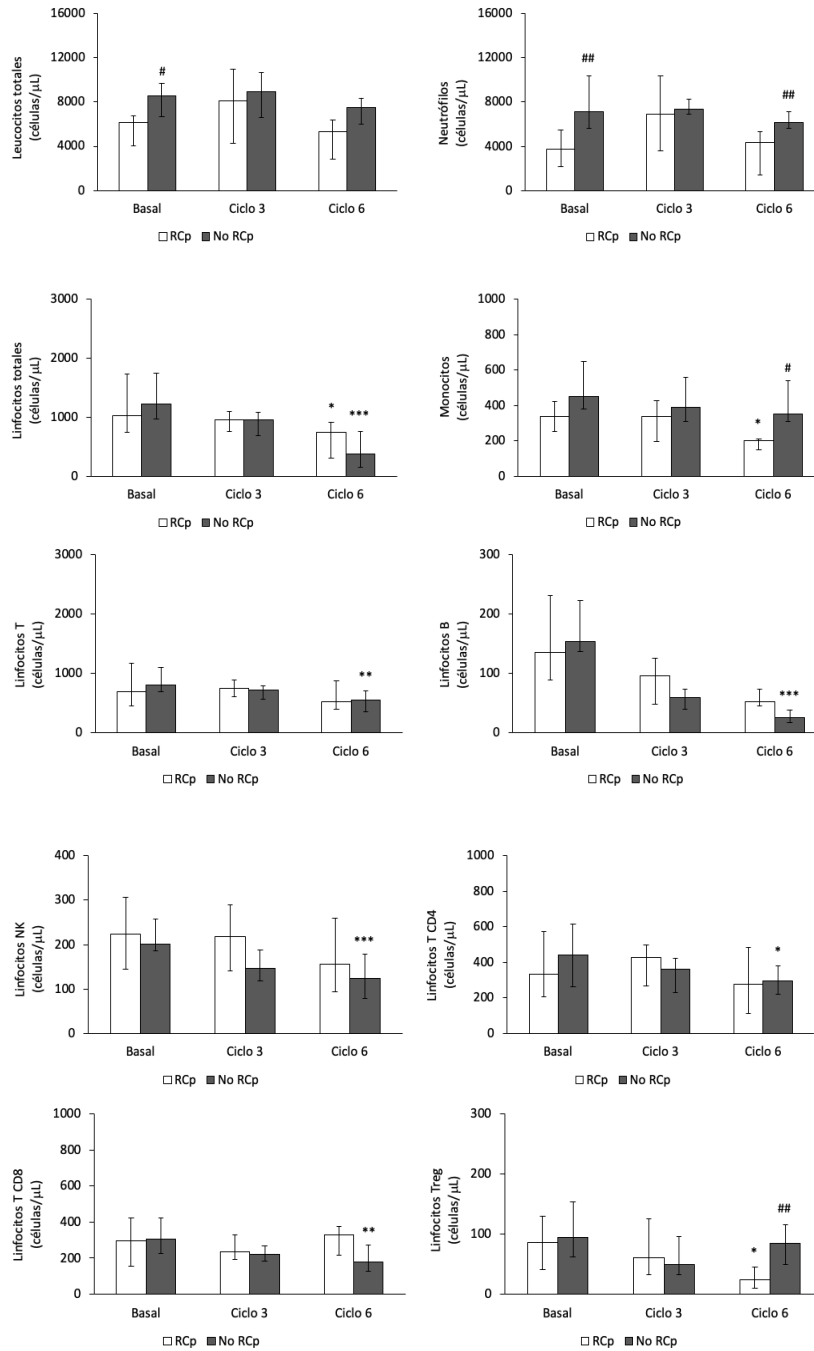
**El ratio neutrófilos/linfocitos** aumenta a lo largo del tratamiento en no RCp, con diferencias estadísticamente significativas entre basal 3.46 (IC 95% 1.97-6.71) vs C6 8.35 (IC 95% 5.96-10.79),  $p = 0.006$ . Sin embargo, en RCp se mantiene estable con diferencias no estadísticamente significativas entre basal 3.68 (IC 95% 1.65-6.24) vs C6 4.57 (IC 95% 1.34-5.87).

**El ratio linfocitos/monocitos** disminuye a lo largo del tratamiento en no RCp (estadísticamente significativo), mientras que aumenta en RCp. Los valores fueron en basal 3.20 (IC 95% 2.17-4.04) vs C6 1.48 (IC 95% 1.08-1.80) en no RCp,  $p = 0.006$ . Además, tras tratamiento (C6), los pacientes con no RCp tienen menor ratio que los que alcanzan RCp. Los valores en C6 fueron 5.25 (IC 95% 3.52-6.13) en RCp vs 1.48 (IC 95% 1.08-1.80) en no RCp,  $p = 0.0001$ .

**El ratio CD8/Treg** aumenta en RCp a lo largo del tratamiento, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

**El ratio CD4/CD8** se mantiene constante en no RCp a lo largo del tratamiento, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.





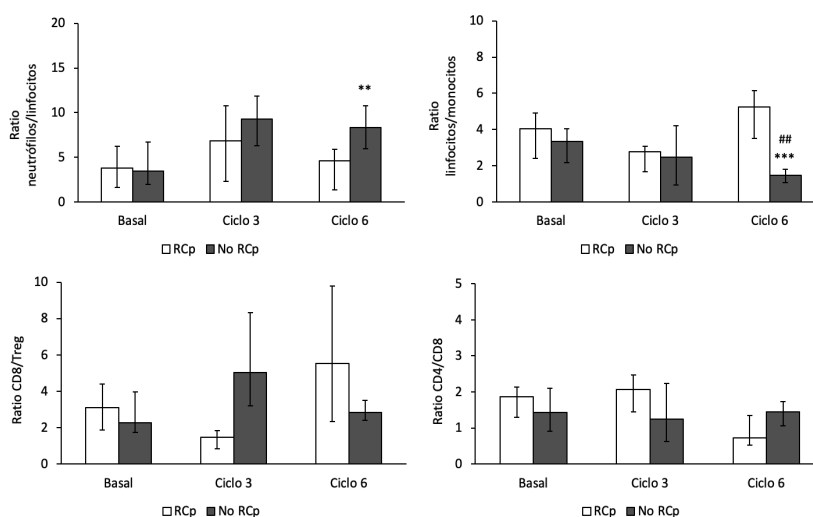


Figura 19. Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama y ganglionar (estadio TNM patológico). \*, \*\* y \*\*\*,  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente, comparativa con basal. #, ## y ###,  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente, comparativa con RCp. Se han empleado diferentes escalas.

- Sistema de Miller & Payne. Tablas 20 y 22.

- a. Respuesta patológica en mama (G5). Figura 20.

Hay mayores niveles basales de **leucocitos totales** en no RCp vs RCp con medianas de 6740 (IC 95% 5700-10080) vs 9680 (IC 95% 8690-11700) cels/ul en RCp vs no RCp, respectivamente ( $p = 0.032$ ). Se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de leucocitos totales en no RCp con medianas de 9680 (IC 95% 8690-11700) vs 5840 (IC 95% 2340-7900) cels/ul en basal y C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ).

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la variación de los niveles de **neutrófilos o monocitos** en sangre periférica antes, durante o tras el tratamiento. Los valores de estas poblaciones celulares suelen ser mayores en aquellos pacientes con no RCp vs RCp con significación estadística en los niveles basales de monocitos. Así, los valores basales de monocitos son 460 (IC 95% 360-660) vs 335 (IC 95% 230-400) cels/ul en no RCp vs RCp, respectivamente ( $p = 0.012$ ).

Sin embargo, se produce descenso estadísticamente significativo de los niveles de **linfocitos totales** en no RCp con medianas de 1182 (IC 95% 1020-1760) vs 380 (IC 95% 168-760) cels/ul en basal y C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ).

En los **linfocitos B y linfocitos NK** se produce un descenso estadísticamente significativo tanto en RCp como en no RCp. Así, las medianas de los niveles de linfocitos B en no RCp fueron 160 (IC 95% 136-222) vs 27 (IC 95% 17-38) cels/ul



en basal vs C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ); y los niveles de linfocitos B en RCp fueron 158 (IC 95% 105-241) vs 52 (IC 95% 17-85) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.043$ ). Mientras que las medianas de los niveles de linfocitos NK en no RCp fueron 212 (IC 95% 186-259) vs 127 (IC 95% 97-183) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ); y los niveles de linfocitos NK en RCp fueron 196 (IC 95% 154-251) vs 124 (IC 95% 80-183) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.017$ ).

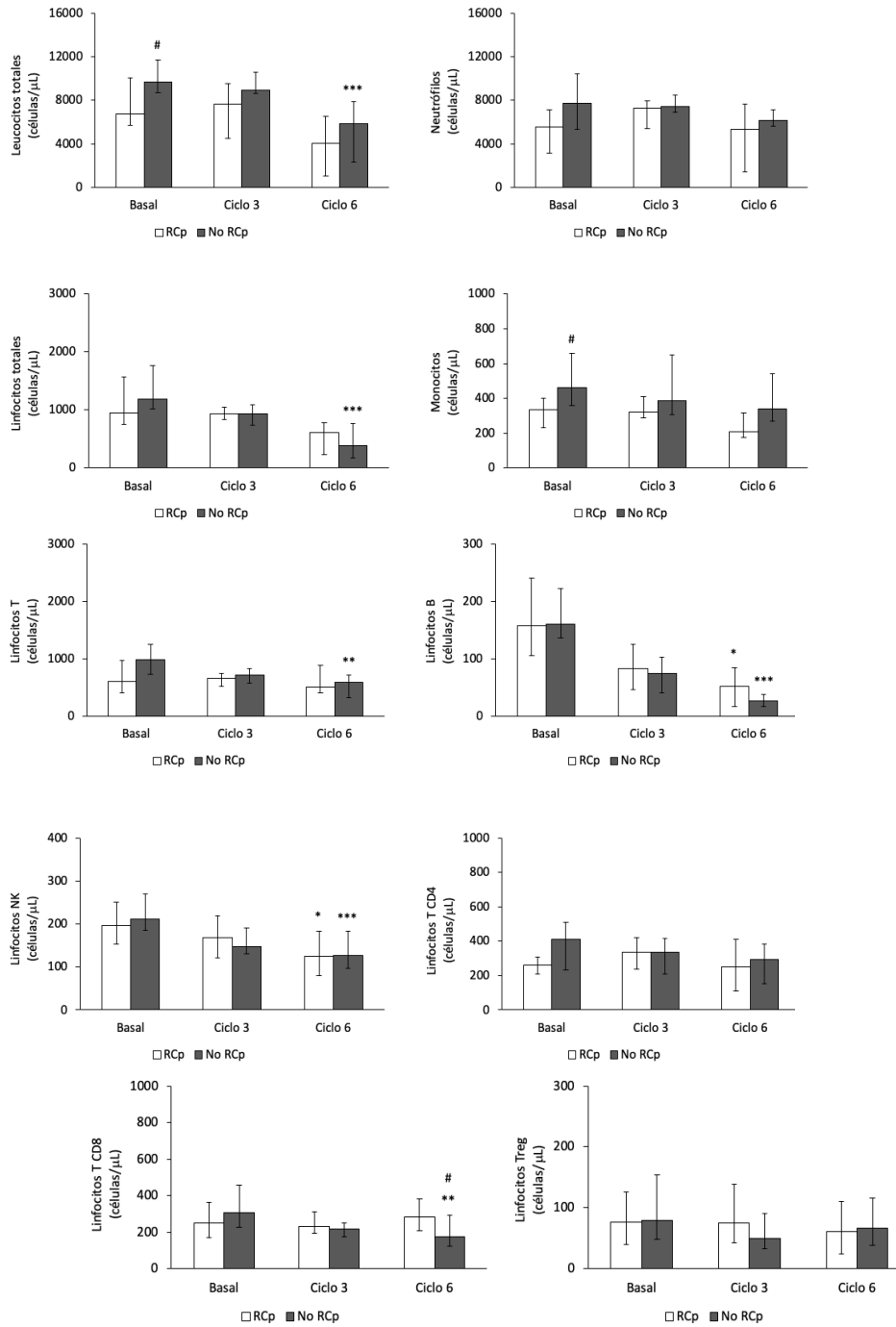
En cuanto a los **linfocitos T**, hay un descenso significativo en no RCp con medianas de 988 (IC 95% 728-1249) vs 583 (IC 95% 319-710) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.003$ ); mientras prácticamente no hay modificación de los niveles de linfocitos T en RCp con medianas de 606 (IC 95% 403-968) vs 501 (IC 95% 400-882) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). Estas variaciones observadas en los linfocitos T con el tratamiento aplicado podría estar en relación al descenso estadísticamente de las subpoblaciones de **linfocitos T CD8+** y **T CD4+** en no RCp vs no modificación de los niveles de los mismos en RCp. Los niveles de linfocitos T CD8+ en no RCp fueron 308 (IC 95% 228-458) vs 176 (IC 95% 122-295) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.005$ ); mientras que en RCp fueron 249 (IC 95% 172-361) vs 286 (IC 95% 209-384) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). Así, hay menores niveles estadísticamente significativos en C6 de linfocitos T CD8+ en no RCp vs RCp. Los niveles de linfocitos T CD8 en C6 fueron 286 (IC 95% 209-384) vs 176 (IC 95% 122-295) cels/ul en RCp vs no RCp, respectivamente ( $p = 0.049$ ). Los niveles de linfocitos T CD4+ en no RCp fueron 410 (IC 95% 231-508) vs 296 (IC 95% 151-382) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo); mientras que en RCp fueron 260 (IC 95% 207-308) vs 253 (IC 95% 111-413) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). Sin embargo, los niveles de **linfocitos Tregs** se mantienen prácticamente constantes independientemente de la respuesta.

**El ratio neutrófilos/linfocitos** se mantiene constante a lo largo del tratamiento en noRCp, sin diferencias estadísticamente significativas.

**El ratio linfocitos/monocitos** disminuye a lo largo del tratamiento en no RCp (estadísticamente significativo), mientras que aumenta en RCp. Los valores fueron en basal 2.85 (IC 95% 1.46-4.72) vs C6 1.55 (IC 95% 1.05-2.55) en no RCp,  $p < 0.0001$ . Además, tras tratamiento (C6), los pacientes con no RCp tienen menor ratio que los que alcanzan RCp. Los valores en C6 fueron 4.39 (IC 95% 2.14-6.03) en RCp vs 1.55 (IC 95% 1.05-2.55) en no RCp,  $p = 0.008$ .

**Ni en el ratio CD8/Treg ni en CD4/CD8** se encontraron diferencias destacables.





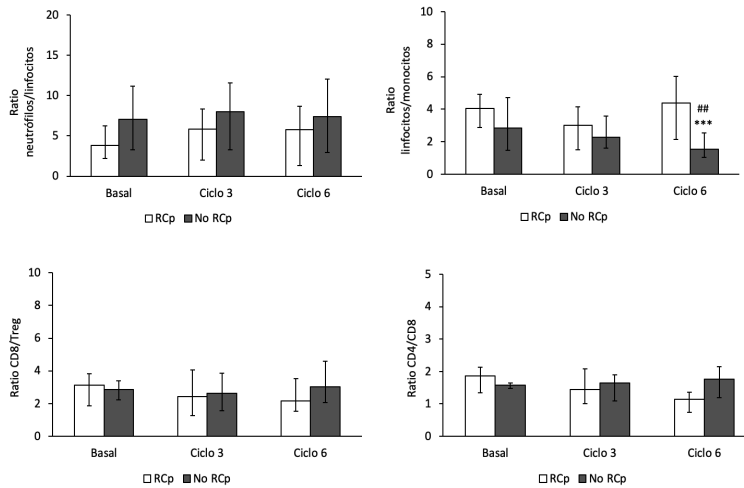


Figura 20. Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama (Sistema de gradación de Miller & Payne). \*, \*\* y \*\*\*,  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente, comparativa con basal. # y ##,  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ , comparativa con RCp. Se han empleado diferentes escalas.

#### b. Respuesta patológica ganglionar (D). Figura 21.

Hay mayores niveles basales de **leucocitos totales** en no RCp vs RCp con medianas de 6235 (IC 95% 5430-7950) vs 9415 (IC 95% 6590-12080) cels/ul en RCp vs no RCp, respectivamente ( $p = 0.021$ ). Se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de leucocitos totales en no RCp con medianas de 9415 (IC 95% 6590-12080) vs 7760 (IC 95% 6098-8400) cels/ul en basal y C6, respectivamente ( $p = 0.005$ ). Hay mayores niveles en C6 de leucocitos totales en no RCp vs RCp con medianas de 2820 (IC 95% 1180-5300) vs 7760 (IC 95% 6098-8400) cels/ul en RCp vs no RCp, respectivamente ( $p = 0.003$ ).

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la variación de los niveles de **neutrófilos o monocitos** en sangre periférica antes, durante o tras el tratamiento. Los valores de estas poblaciones celulares suelen ser mayores en aquellos pacientes con no RCp vs RCp con significación estadística tanto a nivel basal como en C6. Así, los valores basales de monocitos son 550 (IC 95% 330-710) vs 320 (IC 95% 270-450) cels/ul en no RCp vs RCp, respectivamente ( $p = 0.012$ ). Los valores en C6 de monocitos son 510 (IC 95% 370-720) vs 210 (IC 95% 150-320) cels/ul en no RCp vs RCp, respectivamente ( $p = 0.012$ ). Mientras que los valores basales de neutrófilos son 7150 (IC 95% 4970-10350) vs 4370 (IC 95% 3180-5560) cels/ul en no RCp vs RCp, respectivamente ( $p = 0.012$ ). En C6, los valores de neutrófilos son 6060 (IC 95% 5633-7035) vs 4160 (IC 95% 1354-5310) cels/ul en no RCp vs RCp, respectivamente ( $p = 0.012$ ).



Sin embargo, se produce descenso estadísticamente significativo de los niveles de **linfocitos totales** en no RCp con medianas de 1545 (IC 95% 1270-1820) vs 240 (IC 95% 100-380) cels/ul en basal y C6, respectivamente ( $p = 0.003$ ).

En los **linfocitos B** se produce un descenso estadísticamente significativo tanto en RCp como en no RCp. Así, las medianas de los niveles de linfocitos B en no RCp fueron 157 (IC 95% 134-236) vs 25 (IC 95% 17-42) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ); y los niveles de linfocitos B en RCp fueron 156 (IC 95% 97-231) vs 31 (IC 95% 6-46) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.028$ ).

En los **linfocitos NK** se produce un descenso estadísticamente significativo sólo en no RCp, mientras que se mantienen constantes en RCp. Así, los niveles en C6 de linfocitos NK son estadísticamente superiores en RCp vs no RCp ( $p = 0.016$ ). Las medianas de los niveles de linfocitos NK en no RCp fueron 217 (IC 95% 188-267) vs 110 (87-132) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.005$ ).

En cuanto a los **linfocitos T**, hay un descenso significativo en no RCp con medianas de 889 (IC 95% 528-1178) vs 517 (IC 95% 247-774) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.028$ ); mientras prácticamente no hay modificación de los niveles de linfocitos T en RCp con medianas de 649 (IC 95% 428-943) vs 631 (IC 95% 393-800) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). Estas variaciones observadas en los linfocitos T con el tratamiento aplicado podría estar en relación al ligero descenso de las subpoblaciones de **linfocitos T CD8+** en no RCp vs no modificación de los niveles de los mismos en RCp. Los niveles de linfocitos T CD8+ en no RCp fueron 255 (IC 95% 216-493) vs 230 (IC 95% 133-348) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.015$ ); mientras que en RCp fueron 235 (IC 95% 147-308) vs 207 (IC 95% 108-357) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). Los niveles de **linfocitos T CD4+** prácticamente se mantienen constantes a lo largo del tratamiento independientemente de las respuestas, sin significación estadística. Los niveles de **linfocitos Tregs** descienden ligeramente en RCp vs no modificación de los mismos en no RCp. Los niveles de linfocitos **Tregs** en RCp fueron 80 (IC 95% 40-125) vs 35 (IC 95% 24-52) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo); mientras que en no RCp fueron 102 (IC 95% 63-161) vs 100 (IC 95% 83-125) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo).

**El ratio neutrófilos/linfocitos** aumenta a lo largo del tratamiento independientemente del tipo de respuesta, sin diferencias estadísticamente significativas.

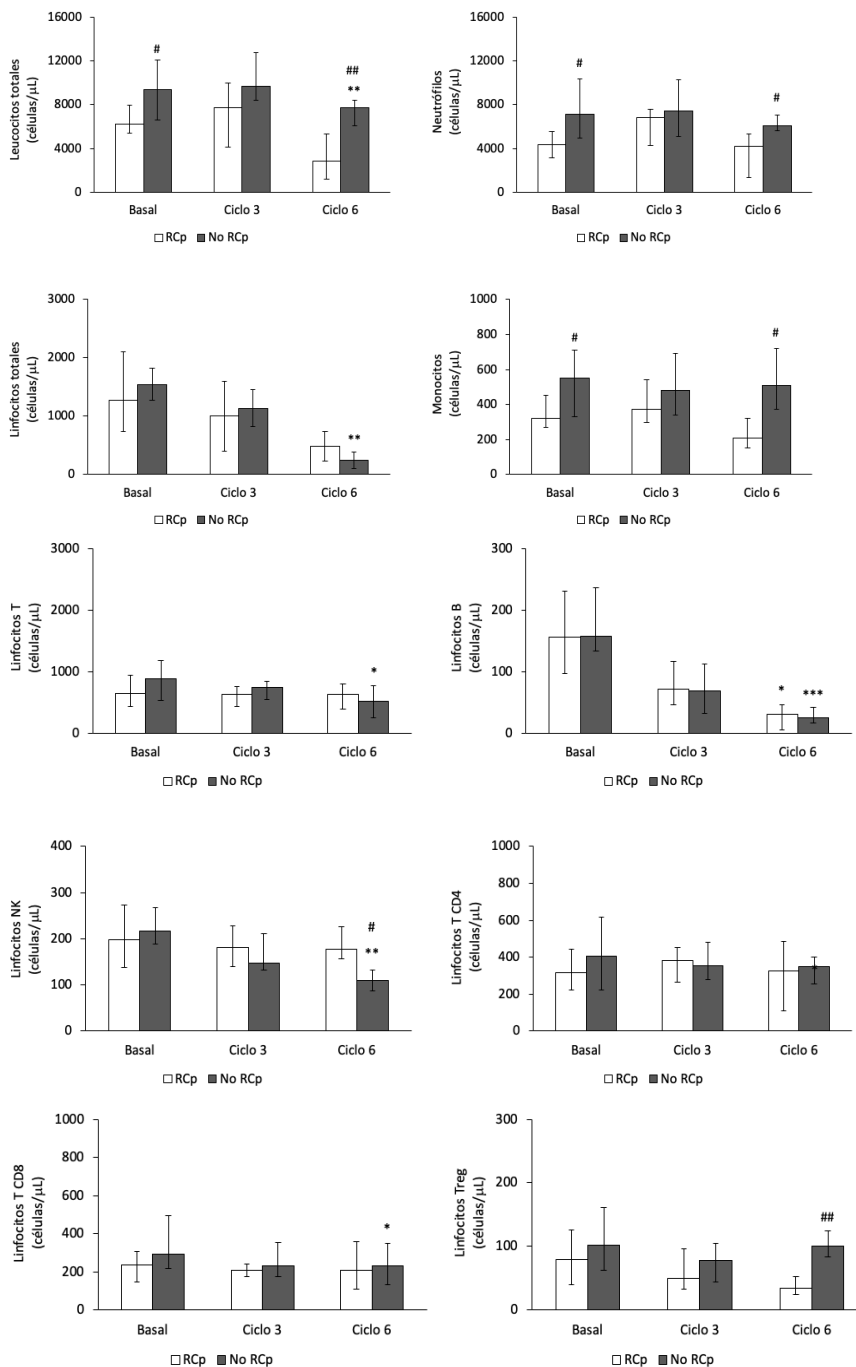
**El ratio linfocitos/monocitos** disminuye a lo largo del tratamiento en no RCp (estadísticamente significativo), mientras que aumenta en RCp. Los valores fueron en basal 2.69 (IC 95% 1.57-4.10) vs C6 1.35 (IC 95% 1.10-1.56) en no RCp,  $p = 0.013$ . Además, tras tratamiento (C6), los pacientes con no RCp tienen menor ratio que los que alcanzan RCp. Los valores en C6 fueron 5.25 (IC 95% 3.52-6.13) en RCp vs 1.35 (IC 95% 1.10-1.56) en no RCp,  $p = 0.027$ .

**El ratio CD8/Treg** disminuye a lo largo del tratamiento en no RCp, mientras que aumenta en RCp, pero sin diferencias estadísticamente significativas.





**El ratio CD4/CD8 disminuye a lo largo del tratamiento en no RCp, mientras que se mantiene constante en RCp. Los valores en C6 fueron 1.72 (IC 95% 1.21-2.32) en RCp vs 0.57 (IC 95% 0.94-0.91) en no RCp, p = 0.035.**



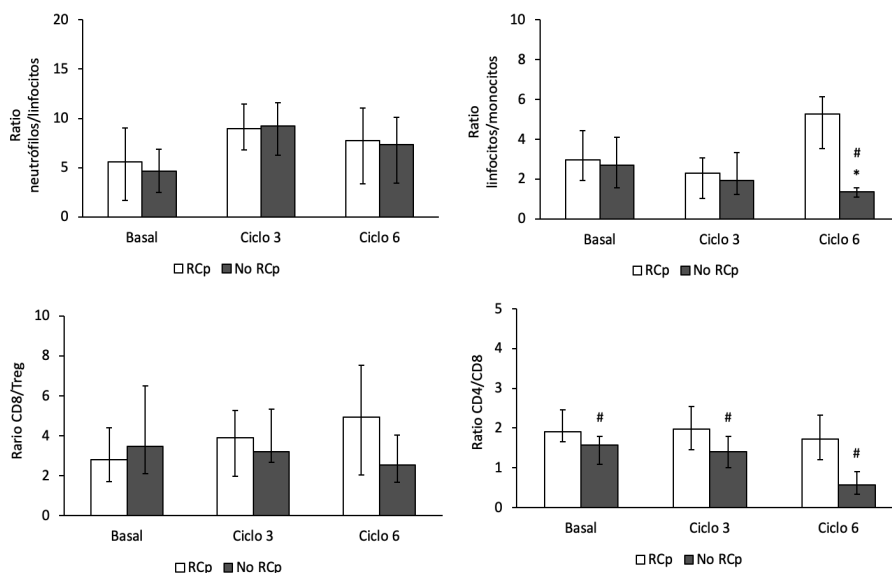


Figura 21. Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica ganglionar (Sistema de gradación de Miller & Payne). \*, \*\* y \*\*\*,  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente, comparativa con basal. # y ##,  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ , respectivamente, comparativa con RCp. *Se han empleado diferentes escalas.*

### c. Respuesta patológica en mama y ganglionar (G5D).

Figura 22.

Hay menores niveles basales de **leucocitos totales** en RCp vs no RCp con medianas de 6135 (IC 95% 4050-7340) vs 9505 (IC 95% 8781-11846) cels/ul en RCp vs no RCp, respectivamente ( $p = 0.003$ ). Se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de leucocitos totales en no RCp con medianas de 9505 (IC 95% 8781-11846) vs 5740 (IC 95% 3021-7620) cels/ul en basal y C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ).

Los valores de **neutrófilos o monocitos** suelen ser mayores en aquellos pacientes con no RCp vs RCp con significación estadística en los niveles basales de neutrófilos y en los niveles en C6 de monocitos. Así, los valores basales de neutrófilos son 7335 (IC 95% 5235-10470) vs 3775 (IC 95% 2150-5515) cels/ul en no RCp vs RCp, respectivamente ( $p = 0.011$ ); mientras que los valores en C6 de monocitos son 370 (IC 95% 310-570) vs 200 (IC 95% 150-220) cels/ul en no RCp vs RCp, respectivamente ( $p = 0.019$ ). Además, hay descenso estadísticamente significativo de los niveles de neutrófilos en no RCp a lo largo del tratamiento con medianas de 7335 (IC 95% 5245-10470) vs 6060 (IC 95% 5475-7185) cels/ul en no basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.048$ ). Sin embargo, el descenso estadísticamente significativo de los niveles de monocitos es en RCp con medianas



de 335 (250-420) vs 200 (150-220) cels/ul en no basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.043$ ).

También se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de **linfocitos totales** en ambos tipos de respuesta patológica. Las medianas de los niveles de linfocitos totales en no RCp fueron 1220 (IC 95% 970-1775) vs 470 (IC 95% 168-760) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.001$ ); y los niveles de linfocitos totales en RCp fueron 1030 (IC 95% 750-1730) vs 640 (IC 95% 820-105) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.046$ ).

En los niveles de **linfocitos B y linfocitos NK** se produce un descenso tanto en RCp como en no RCp, pero con significación estadística sólo en no RCp. Así, las medianas de los niveles de linfocitos B en no RCp fueron 147 (IC 95% 136-212) vs 25 (IC 95% 16-38) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ); y los niveles de linfocitos B en RCp fueron 146 (IC 95% 99-232) vs 52 (IC 95% 46-74) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). Mientras, las medianas de los niveles de linfocitos NK en no RCp fueron 212 (IC 95% 186-262) vs 125 (IC 95% 99-168) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.001$ ); y los niveles de linfocitos NK en RCp fueron 193 (IC 95% 135-267) vs 156 (IC 95% 95-219) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo).

En cuanto a los **linfocitos T**, hay un descenso significativo en no RCp con medianas de 807 (IC 95% 690-1096) vs 517 (IC 95% 319-691) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.005$ ); mientras que hay un ligero ascenso de los niveles de linfocitos T en RCp con medianas de 628 (IC 95% 456-1086) vs 662 (IC 95% 404-882) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). Estas variaciones observadas en los linfocitos T con el tratamiento aplicado podría estar en relación al descenso estadísticamente significativo de las subpoblaciones de **linfocitos T CD8+ y T CD4+** en no RCp vs ligero aumento de los niveles de linfocitos T CD8+ y no modificación de T CD4+ en RCp. Los niveles de linfocitos T CD8+ en no RCp fueron 300 (IC 95% 226-400) vs 183 (IC 95% 133-295) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.004$ ); mientras que en RCp fueron 298 (IC 95% 154-425) vs 327 (IC 95% 215-377) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo). Los niveles de linfocitos T CD4+ en no RCp fueron 414 (IC 95% 228-534) vs 296 (IC 95% 222-382) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.041$ ); mientras que en RCp fueron 360 (IC 95% 207-575) vs 276 (IC 95% 111-483) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo).

Se observa un descenso estadísticamente significativo de los niveles de **linfocitos Tregs** a lo largo del tratamiento en RCp, mientras que se mantienen constantes en no RCp. Los niveles de linfocitos Tregs en no RCp fueron 103 (IC 95% 70-161) vs 99 (IC 95% 67-122) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (no estadísticamente significativo); mientras que en RCp fueron 79 (IC 95% 40-107) vs 25 (IC 95% 12-43) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.044$ ). Incluso, hay diferencias estadísticas al inicio ( $p = 0.042$ ) y al final ( $p = 0.001$ ) de tratamiento con los niveles de linfocitos Tregs entre RCp vs no RCp.

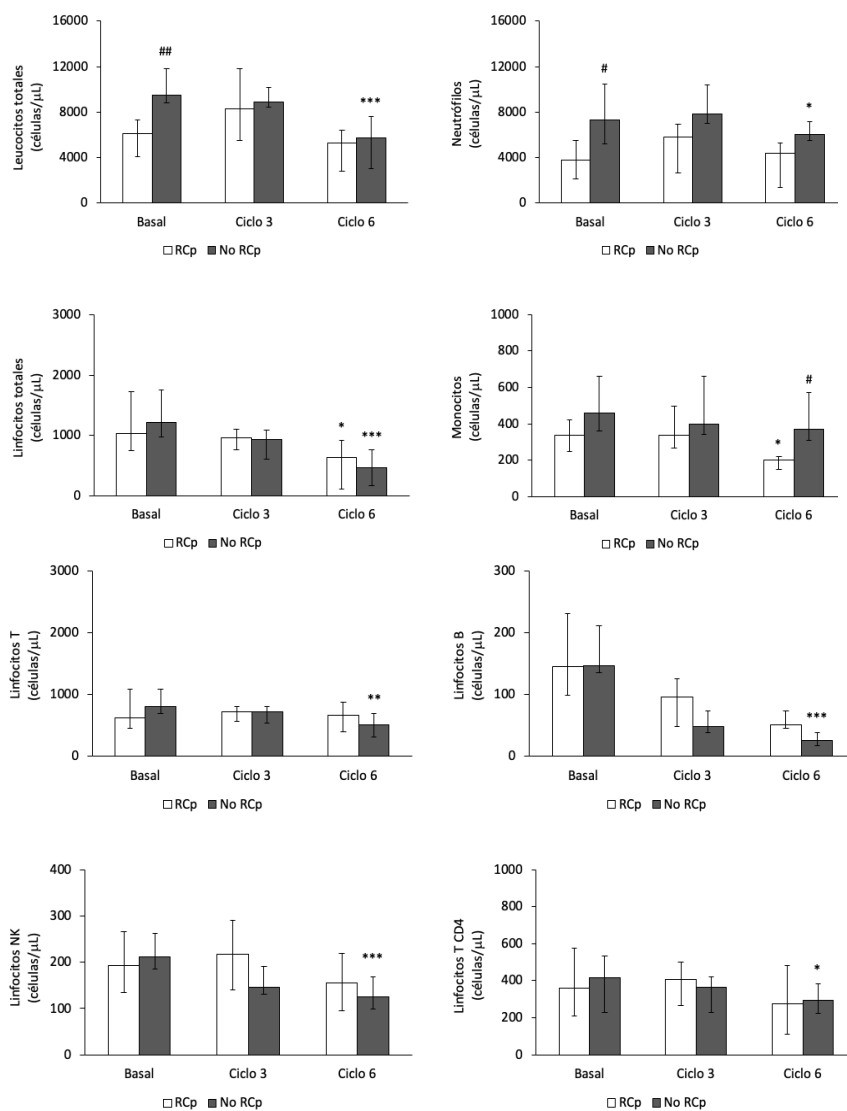


**El ratio neutrófilos/linfocitos** aumenta en no RCp a lo largo del tratamiento, sin diferencias estadísticamente significativas.

**El ratio linfocitos/monocitos** disminuye a lo largo del tratamiento en no RCp (estadísticamente significativo), mientras que aumenta en RCp. Los valores fueron en basal 3.14 (IC 95% 2.38-4.10) vs C6 1.38 (IC 95% 0.95-1.71) en no RCp,  $p < 0.001$ . Además, tras tratamiento (C6), los pacientes con no RCp tienen menor ratio que los que alcanzan RCp. Los valores en C6 fueron 5.25 (IC 95% 3.52-6.13) en RCp vs 1.38 (IC 95% 0.95-1.71) en no RCp,  $p = 0.006$ .

**El ratio CD8/Treg** aumenta a lo largo del tratamiento en RCp, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

**El ratio CD4/CD8** disminuye ligeramente a lo largo del tratamiento en no RCp. Los valores fueron en basal 1.57 (IC 95% 1.40-1.82) vs C6 1.41 (IC 95% 1.01-1.66) en no RCp,  $p = 0.039$ .



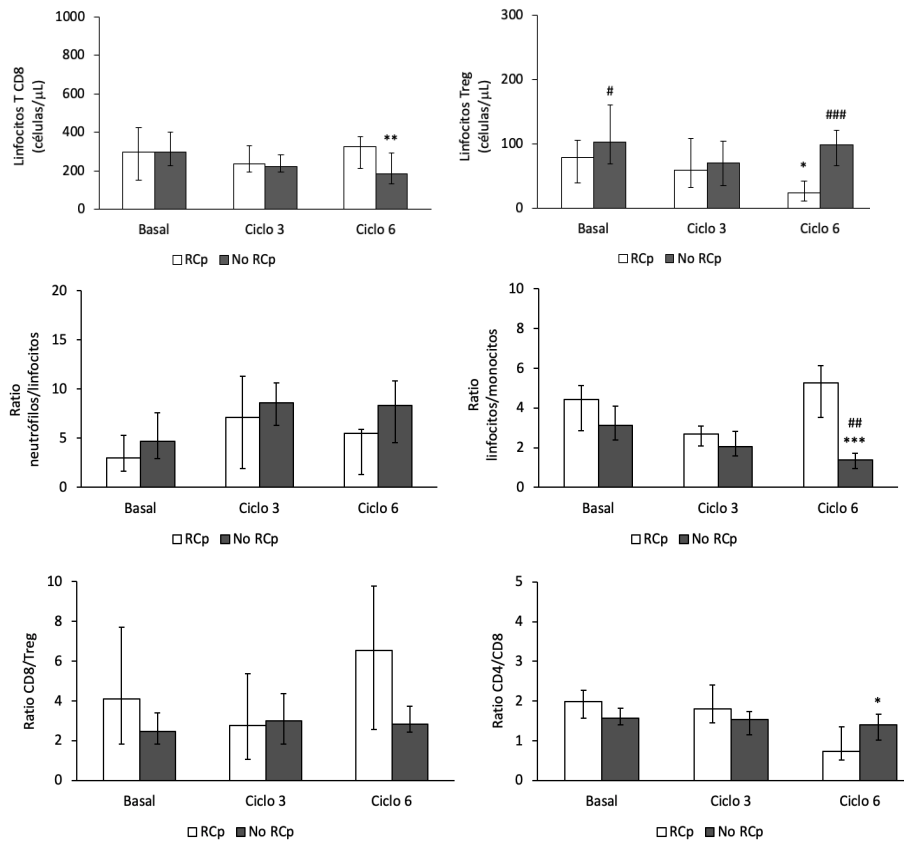


Figura 22. Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama y ganglionar (Sistema de gradación de Miller & Payne). \*, \*\*, \*\*\*,  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente, comparativa con basal. #, ##, ###,  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente, comparativa con RCp. Se han empleado diferentes escalas.

### ¿Los pacientes que alcanzan RCp tienen valores de las poblaciones celulares post-QTNA en sangre similares a la cohorte de sanas? Tablas 23-25.

La hipótesis para este análisis es que los valores post-tratamiento de las poblaciones celulares en la cohorte de pacientes que han alcanzado RCp es similar a los valores basales de la cohorte de sanas. En este caso, la hipótesis nula sería que NO hay diferencias en los niveles celulares entre los pacientes con RCp tras neoadyuvancia y la cohorte sana (es decir,  $p > 0.05$ ), mientras que la hipótesis alternativa sería que SÍ hay diferencias ( $p < 0.05$ ). Para ello, empleamos U de Mann-Whitney para dos muestras independientes, pero buscando los  $p > 0.05$ , ya que no queremos que existan diferencias entre los grupos sanas vs enfermas.

Los valores de leucocitos totales, neutrófilos, NK, linfocitos T CD8+ y Treg en C6 de aquellos pacientes que alcanzan RCp (medida por TNM patológico y por sistema de Miller & Payne) son similares a los valores basales de leucocitos totales, neutrófilos,



NK, linfocitos T CD8+ y Treg de la cohorte sana, con  $p > 0.05$  excepto para linfocitos T CD8+ ( $p = 0.044$ ). Lo que podría estar en relación al probable potencial papel del tratamiento oncológico neoadyuvante para reestablecer un sistema inmunocompetente de lucha antitumoral similar a cohorte sana.

Los valores en C6 de **leucocitos totales en RCp** (mama y ganglionar) medida por estadio TNM patológico (similares datos en sistema Miller & Payne) fueron 5300 (IC 95% 2820-6400) cels/ul, mientras que en cohorte sana fueron de 6825 (IC 95% 5700-7489) cels/ul ( $p = 0.451$ ).

Los valores en C6 de **neutrófilos en RCp** (mama y ganglionar) medida por estadio TNM patológico (similares datos en sistema Miller & Payne) fueron 4350 (IC 95% 1410-5310) cels/ul, mientras que en cohorte sana fueron de 3625 (IC 95% 3180-3860) cels/ul ( $p = 0.502$ ).

Los valores en C6 de **NK en RCp** (mama y ganglionar) medida por estadio TNM patológico (similares datos en sistema Miller & Payne) fueron 156 (IC 95% 95-258) cels/ul, mientras que en cohorte sana fueron de 246 (IC 95% 170-286) cels/ul ( $p = 0.371$ ).

Los valores en C6 de **linfocitos T CD8+ en RCp** (mama y axila) medida por estadio TNM patológico (similares datos en sistema Miller & Payne) fueron 327 (IC 95% 215-377) cels/ul, mientras que en cohorte sana fueron de 467 (IC 95% 446-503) cels/ul ( $p = 0.044$ ).

Los valores en C6 de **linfocitos Treg en RCp** (mama y axila) medida por estadio TNM patológico (similares datos en sistema Miller & Payne) fueron 25 (IC 95% 10-45) cels/ul, mientras que en cohorte sana fueron de 65 (IC 95% 49-83) cels/ul ( $p = 0.247$ ). [Tablas 23 y 24.](#)

		MAMA	AXILA	MAMA + AXILA
Leucocitos totales	C6 pacientes	4060 (1057-6525)	4700 (1411-7082)	5300 (2820-6400)
	Cohorte sana		6825 (5700-7480)	
Neutrófilos	C6 pacientes	5310 (1410-7660)	4350 (1354-6330)	4350 (1410-5310)
	Cohorte sana		3625 (3180-3860)	
Linfocitos totales	C6 pacientes	610 (228-730)	740 (560-880)	740 (305-920)
	Cohorte sana		2090 (1740-2410)	
Monocitos	C6 pacientes	210 (150-420)	205 (109-315)	200 (150-210)
	Cohorte sana		530 (440-570)	
Linfocitos T	C6 pacientes	500 (439-718)	516 (400-664)	518 (400-882)
	Cohorte sana		1610 (1245-1709)	
Linfocitos B	C6 pacientes	51 (32-79)	31 (6-46)	52 (46-74)
	Cohorte sana		199 (175-263)	
Linfocitos NK	C6 pacientes	114 (80-173)	158 (94-198)	156 (95-258)
	Cohorte sana		246 (170-286)	
Linfocitos T CD4	C6 pacientes	264 (111-483)	276 (230-382)	276 (111-483)
	Cohorte sana		968 (824-1138)	
Linfocitos T CD8	C6 pacientes	286 (211-384)	188 (115-295)	327 (215-377)
	Cohorte sana		467 (446-503)	
Linfocitos Treg	C6 pacientes	49 (24-73)	38 (28-63)	25 (10-45)
	Cohorte sana		65 (49-83)	

		MAMA	AXILA	MAMA + AXILA
Leucocitos totales	C6 pacientes	0.012	0.317	0.451
	Cohorte sana			
Neutrófilos	C6 pacientes	0.002	0.258	0.502
	Cohorte sana			
Linfocitos totales	C6 pacientes	<0.001	<0.001	0.006
	Cohorte sana			
Monocitos	C6 pacientes	0.005	0.005	0.006
	Cohorte sana			
Linfocitos T	C6 pacientes	0.001	0.005	0.007
	Cohorte sana			
Linfocitos B	C6 pacientes	0.002	<0.001	0.007
	Cohorte sana			
Linfocitos NK	C6 pacientes	0.025	0.057	0.371
	Cohorte sana			
Linfocitos T CD4	C6 pacientes	0.001	<0.001	<0.001
	Cohorte sana			
Linfocitos T CD8	C6 pacientes	0.032	<0.001	0.044
	Cohorte sana			
Linfocitos Treg	C6 pacientes	0.641	0.528	0.247
	Cohorte sana			

Tabla 23. Comparativa de los valores basales (medianas e IC 95%) de las poblaciones celulares (cels/ul) en sangre periférica de cohorte sana con los valores post-tratamiento (C6) de los pacientes en RCp medida por sistema TNM patológico (izda) y valores p (dcha). C6, ciclo 6.



		MAMA	AXILA	MAMA + AXILA
Leucocitos totales	C6 pacientes	4060 (1057-6525)	2820 (1180-5300)	5300 (2820-6400)
	Cohorte sana		6825 (5700-7480)	
Neutrófilos	C6 pacientes	5310 (1410-7660)	4160 (1354-5310)	4350 (1410-5310)
	Cohorte sana		3625 (3180-3860)	
Linfocitos totales	C6 pacientes	610 (227-785)	485 (230-740)	640 (820-1050)
	Cohorte sana		2090 (1740-2410)	
Monocitos	C6 pacientes	210 (175-315)	210 (150-320)	200 (150-220)
	Cohorte sana		530 (440-570)	
Linfocitos T	C6 pacientes	501 (400-882)	631 (393-800)	662 (404-882)
	Cohorte sana		1610 (1245-1709)	
Linfocitos B	C6 pacientes	52 (17-85)	31 (6-46)	52 (46-74)
	Cohorte sana		199 (175-263)	
Linfocitos NK	C6 pacientes	124 (80-183)	178 (156-226)	156 (95-219)
	Cohorte sana		246 (170-286)	
Linfocitos T CD4	C6 pacientes	253 (111-413)	327 (111-483)	276 (111-483)
	Cohorte sana		968 (824-1138)	
Linfocitos T CD8	C6 pacientes	286 (209-384)	207 (108-357)	327 (215-377)
	Cohorte sana		467 (446-503)	
Linfocitos Treg	C6 pacientes	61 (24-111)	35 (24-52)	25 (12-43)
	Cohorte sana		65 (49-83)	

Tabla 24. Comparativa de los valores basales (medianas e IC 95%) de las poblaciones celulares (cels/ul) en sangre periférica de cohorte sana con los valores post-tratamiento (C6) de los pacientes en RCp medida por sistema de Miller & Payne (izda) y valores p (dcha). C6, ciclo 6.

**El ratio en C6 de neutrófilos/linfocitos, linfocitos/monocitos, CD8/Treg, y CD4/CD8 en RCp (mama y axila) medido por estadio TNM y por M&P son similares a los del grupo de sanas. [Tabla 22.](#)**

		MAMA		AXILA		MAMA+AXILA	
		RCp	Valor p vs. control	RCp	Valor p vs. control	RCp	Valor p vs. control
Ratio Neutr/linfoc	TNM	5.77 (2.23-8.65)	0.017	6.88 (4.77-10.05)	0.001	4.57 (1.34-5.87)	0.165
	M&P	5.77 (1.34-8.65)	0.024	7.74 (3.34-11.05)	<0.001	5.47 (1.34-5.88)	0.102
	Cohorte sanas					1.76 (1.36-2.14)	
Ratio linfoc/monoc	TNM	3.72 (1.74-6.13)	0.257	3.25 (1.95-5.13)	0.130	5.25 (3.52-6.13)	0.315
	M&P	4.39 (2.14-6.03)	0.551	5.25 (3.52-6.13)	0.315	5.25 (3.52-6.13)	0.315
	Cohorte sanas					4.38 (3.71-4.95)	
Ratio CD8/Treg	TNM	3.52 (1.87-5.77)	0.087	3.94 (2.04-6.53)	0.061	5.53 (2.34-9.77)	0.534
	M&P	2.18 (1.55-3.53)	0.03	4.94 (2.04-7.52)	0.111	6.53 (2.55-9.77)	0.534
	Cohorte sanas					5.13 (3.86-7.33)	
Ratio CD4/CD8	TNM	1.22 (0.73-1.58)	0.002	1.87 (1.08-2.63)	0.142	0.73 (0.32-1.35)	<0.001
	M&P	1.14 (0.73-1.35)	0.002	1.72 (1.21-2.32)	0.063	0.73 (0.52-1.35)	<0.001
	Cohorte sanas					2.15 (1.98-2.44)	

Tabla 25. Comparativa de los valores basales de las poblaciones celulares (ratio) en sangre periférica de cohorte sana con los valores post-tratamiento (C6) de los pacientes en RCp medida por sistema de Miller & Payne (M&P) y TNM patológico, valores p.

## POBLACIONES CELULARES EN TEJIDO

- Sistema TNM patológico. [Tablas 19 y 21.](#)

### a. Respuesta patológica en mama (ypT0/Tis). [Figura 23.](#)

Hay un mayor porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ pre-tratamiento** de grado 3 (Clasificación de Ladoire, Black grading system) en RCp respecto a no RCp. Así, en el total de los pacientes que alcanzaron RCp, el 70% (IC



95% 40-99.7) tenía grado 3 y el 30% (IC 95% 0.3-60) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento. Sin embargo, en los pacientes con no RCp, el 27.6% (IC 95% 10.4-44.8) tenía grado 3 y el 72.4% (IC 95% 55.2-89.6) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento.

En RCp el porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ post-tratamiento** de grado 3 disminuye y el porcentaje con grado 0-2 aumenta en RCp, mientras que en no RCp ocurre la tendencia contraria con mínima disminución del porcentaje de pacientes con grado 0-2 y ascenso del porcentaje con grado 3. En cualquier caso, se sigue manteniendo un mayor porcentaje de pacientes con grado 3 de linfocitos T CD8+ post-tratamiento en RCp vs no RCp. Así en RCp, el 40% (IC 95% 10-70) tenía grado 3 y el 60% (IC 95% 30-90) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento. Mientras que en no RCp, el 32.3% (IC 95% 16.2-48.4) de los pacientes tenía grado 3 y el 67.7% (IC 95% 51.6-83.8) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos Tregs (FOXP3+) pre-tratamiento** con grado 0-2 es el mayoritario en ambas respuestas. Y, aunque, el porcentaje con grado 3 pre-tratamiento es superior en RCp vs no RCp, se consigue disminuir al 0% el porcentaje con grado 3 post-tratamiento en RCp con el tratamiento aplicado. Así, en RCp, el 20 % (IC 95% 0-50) tenía grado 3 de infiltrado de linfocitos Tregs (FOXP3+) pre-tratamiento y el 80% (IC 95% 50-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento. Mientras que en no RCp, el 3.4% (IC 95% 0-10.3) de los pacientes tenía grado 3 y el 96.6% (IC 95% 89.7-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento. **Post-tratamiento**, todos los pacientes (100%) tienen grado 2 de este infiltrado celular y ninguno (0%) presenta grado 3, independientemente de la respuesta alcanzada.

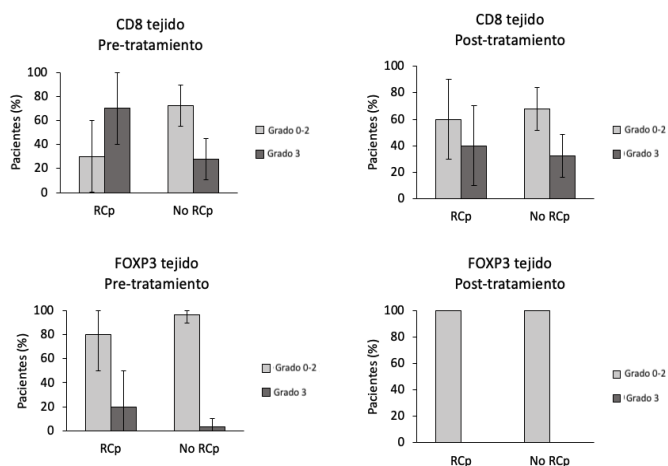




Figura 23. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama (estadio TNM patológico).

**b. Respuesta patológica ganglionar (ypN0). Figura 24.**

Hay un mayor porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ pre-tratamiento** de grado 3 en RCp respecto a no RCp. Así, en el total de los pacientes que alcanzaron RCp, el 57.1% (IC 95% 28.6-78.6) tenía grado 3 y el 49.2% (IC 95% 21.4-71.4) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento. Sin embargo, en los pacientes con no RCp, el 35.7% (IC 95% 14.3-57.1) tenía grado 3 y el 64.3% (IC 95% 42.9-85.7) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ post-tratamiento** de grado 3 aumenta ligeramente al disminuir el porcentaje de pacientes con grado 0-2 en RCp mientras que en no RCp ocurre la tendencia contraria con aumento ligero del porcentaje de pacientes con grado 0-2 y disminución del porcentaje con grado 3, haciendo que se mantenga el mayor porcentaje de pacientes con grado 3 de linfocitos T CD8+ post-tratamiento en RCp vs no RCp. Así en RCp, el 57.1% (IC 95% 28.6-78.6) tenía grado 3 y el 42.9% (IC 95% 21.4-71.4) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento. Mientras que en no RCp, el 33.3% (IC 95% 6.8-60) de los pacientes tenía grado 3 y el 66.7% (IC 95% 40-93.2) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos Tregs (FOXP3+) pre-tratamiento** con grado 0-2 es muy similar en ambas respuestas, si bien, el porcentaje de grado 3 es ligeramente superior en no RCp vs RCp. Así, en RCp, el 7.1% (IC 95% 0-21.4) tenía grado 3 y el 92.9% (IC 95% 78.6-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento. Mientras que en no RCp, el 12.5% (IC 95% 0-31) de los pacientes tenía grado 3 y el 87.5% (IC 95% 68.8-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento.

**Post-tratamiento**, todos los pacientes (100%) tienen grado 2 de este infiltrado celular y ninguno (0%) presenta grado 3, independientemente de la respuesta alcanzada.



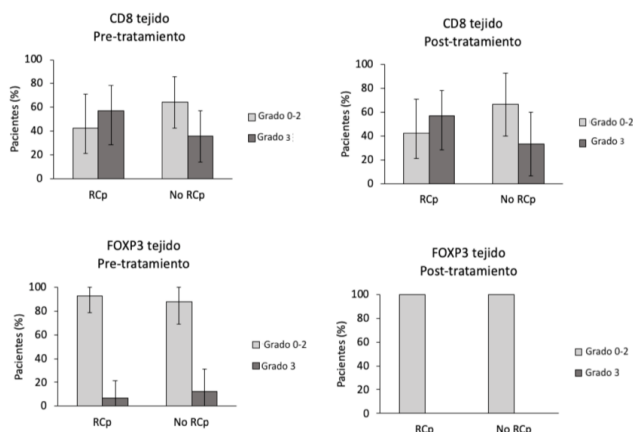


Figura 24. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica ganglionar (estadio TNM patológico).

### c. Respuesta patológica en mama y ganglionar (ypT0/Tis ypN0).

Figura 25.

Hay un mayor porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ pre-tratamiento** de grado 3 (Clasificación de Ladoire, Black grading system) en RCp respecto a no RCp. Así, en el total de los pacientes que alcanzaron RCp, el 66.7% (IC 95% 33.3-100) tenía grado 3 y el 33.3% (IC 95% 0-66.7) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento. Sin embargo, en los pacientes con no RCp, el 32.3% (IC 95% 16.1-48.4) tenía grado 3 y el 67.7% (IC 95% 51.6-83.9) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ post-tratamiento** de grado 3 y de grado 2 se mantiene constante en RCp mientras que en no RCp se produce un ligero descenso del porcentaje de pacientes con grado 3 y aumenta el grado 0-2, haciendo que se mantenga el mayor porcentaje de pacientes con grado 3 de linfocitos T CD8+ post-tratamiento en RCp vs no RCp. Así en RCp, el 66.7% (IC 95% 33.3-100) tenía grado 3 y el 33.3% (IC 95% 0-66.7) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento. Mientras que en no RCp, el 30.3% (IC 95% 15.2-45.5) de los pacientes tenía grado 3 y el 69.7% (IC 95% 54.5-84.8) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos Tregs (FOXP3+) pre-tratamiento** grado 0-2 y grado 3 es muy similar en RCp y no RCp. Así, en RCp, el 7.1% (IC 95% 0-21.4) tenía grado 3 y el 92.9% (IC 95% 78.6-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento. Mientras que en no RCp,



el 4.3% (IC 95% 0-13) de los pacientes tenía grado 3 y el 95.7% (IC 95% 87-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento.

**Post-tratamiento**, todos los pacientes (100%) tienen grado 2 de este infiltrado celular y ninguno (0%) presenta grado 3, independientemente de la respuesta alcanzada.

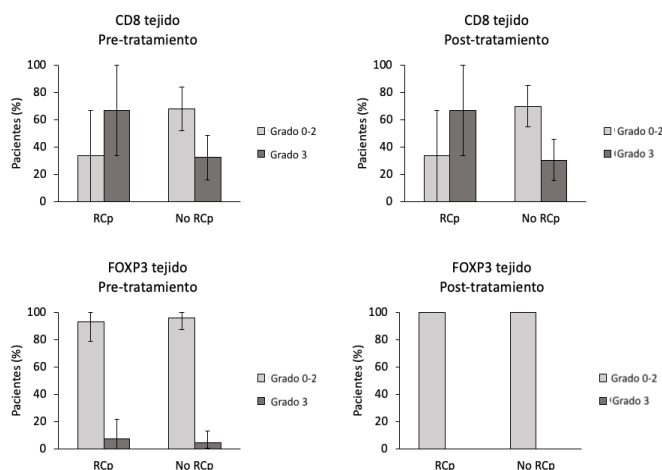


Figura 25. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama y ganglionar (estadio TNM patológico).

- **Sistema de Miller & Payne.** [Tablas 20 y 22.](#)

**a. Respuesta patológica en mama (G5).** [Figura 26.](#)

Hay un mayor porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ pre-tratamiento** de grado 3 en RCp respecto a no RCp. Así, en el total de los pacientes que alcanzaron RCp, el 66.7% (IC 95% 33.3-100) tenía grado 3 y el 33.3% (IC 95% 0-66.7) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento. Sin embargo, en los pacientes con no RCp, el 30% (IC 95% 13.3-46.7) tenía grado 3 y el 70% (IC 95% 53.3-86.7) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ post-tratamiento** de grado 3 desciende ligeramente en RCp mientras que en no RCp se mantiene constante, pero aún así se mantiene el mayor porcentaje de pacientes con grado 3 de linfocitos T CD8+ post-tratamiento en RCp vs no RCp. Así en RCp, el 55.6% (IC 95% 22.2-88.9) tenía grado 3 y el 44.4% (IC 95% 11.1-77.8) tenía grado 0-2 de



infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento. Mientras que en no RCp, el 31.3% (IC 95% 15.6-46.9) de los pacientes tenía grado 3 y el 68.8% (IC 95% 53.1-84.4) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos Tregs (FOXP3+) pre-tratamiento** con grado 0-2 es el mayoritario en ambas respuestas. Asimismo, aunque el porcentaje con grado 3 pre-tratamiento es superior en RCp vs No RCp, se consigue disminuir al 0% el porcentaje con grado 3 post-tratamiento en RCp con el tratamiento aplicado. Así, en RCp, el 22.2 % (IC 95% 0-55.6) tenía grado 3 de infiltrado de linfocitos Tregs (FOXP3+) pre-tratamiento y el 77.8% (IC 95% 44.4-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento. Mientras que en no RCp, el 3.3% (IC 95% 0-10) de los pacientes tenía grado 3 y el 96.7% (IC 95% 90-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento.

**Post-tratamiento**, todos los pacientes (100%) tienen grado 2 de este infiltrado celular y ninguno (0%) presenta grado 3, independientemente de la respuesta alcanzada.

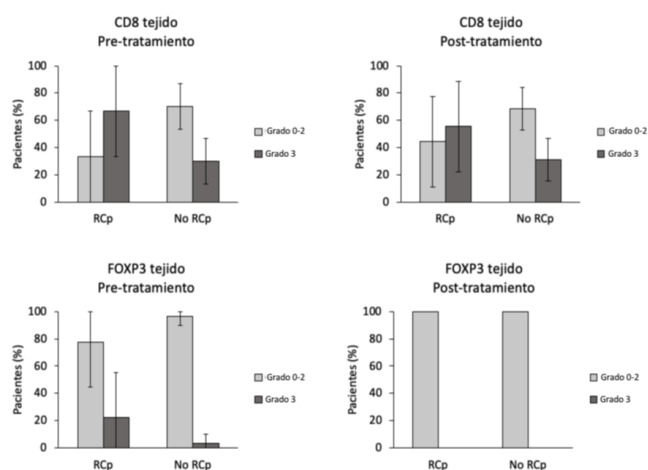


Figura 26. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama (sistema de Miller & Payne).

**b. Respuesta patológica ganglionar (D). Figura 27.**

Hay un mayor porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ pre-tratamiento** de grado 3 en RCp respecto a no RCp. Así, en el total de los pacientes que alcanzaron RCp, el 61.5% (IC 95% 38.5-84.6) tenía grado 3 y el 38.5% (IC 95% 15.4-61.5) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento. Sin



embargo, en los pacientes con no RCp, el 33.3% (IC 95% 13.3-40) tenía grado 3 y el 66.7% (IC 95% 12.1-40) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ post-tratamiento** de grado 3 desciende ligeramente en RCp mientras que en no RCp se mantiene constante, pero aún así se mantenga el mayor porcentaje de pacientes con grado 3 de linfocitos T CD8+ post-tratamiento en RCp vs no RCp. Así en RCp, el 53.8% (IC 95% 30.8-76.9) tenía grado 3 y el 46.2% (IC 95% 23.1-69.2) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento. Mientras que en no RCp, el 35.3% (IC 95% 11.8-58.8) de los pacientes tenía grado 3 y el 64.7% (IC 95% 41.2-88.2) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos Tregs (FOXP3+) pre-tratamiento** con grado 0-2 y grado 3 es muy similar en ambas respuestas, siendo el grado 0-2 el mayoritario. Así, en RCp, el 7.7 % (IC 95% 0-23.1) tenía grado 3 de infiltrado de linfocitos Tregs (FOXP3+) pre-tratamiento y el 92.3% (IC 95% 76.9-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento. Mientras que en no RCp, el 6.7% (IC 95% 9-20) de los pacientes tenía grado 3 y el 93.3% (IC 95% 80-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento.

**Post-tratamiento**, todos los pacientes (100%) tienen grado 2 de este infiltrado celular y ninguno (0%) presenta grado 3, independientemente de la respuesta alcanzada.

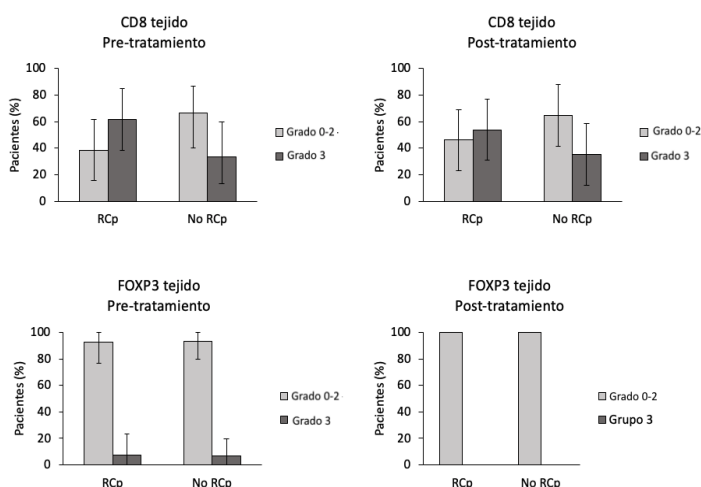


Figura 27. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en axila (sistema de Miller & Payne).



**c. Respuesta patológica en mama y ganglionar (G5D).**

**Figura 28.**

Hay un mayor porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ pre-tratamiento** de grado 3 en RCp respecto a no RCp. Así, en el total de los pacientes que alcanzaron RCp, el 66.7% (IC 95% 33.3-100) tenía grado 3 y el 33.3% (IC 95% 0-66.7) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento. Sin embargo, en los pacientes con no RCp, el 32.3% (IC 95% 16.1-48.4) tenía grado 3 y el 67.7% (IC 95% 51.6-83.9) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ post-tratamiento** de grado 3 y de grado 2 se mantiene constante en RCp mientras que en no RCp se produce un ligero descenso del porcentaje de pacientes con grado 3 y aumenta el grado 0-2, haciendo que se mantenga el mayor porcentaje de pacientes con grado 3 de linfocitos T CD8+ post-tratamiento en RCp vs no RCp. Así en RCp, el 66.7% (IC 95% 33.3-100) tenía grado 3 y el 33.3% (IC 95% 0-66.7) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento. Mientras que en no RCp, el 30.3% (IC 95% 15.2-45.5) de los pacientes tenía grado 3 y el 69.7% (IC 95% 54.5-84.8) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento. Se observan los mismos datos que cuando la respuesta patológica se mide según estadio patológico TNM.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos Tregs (FOXP3+) pre-tratamiento** con grado 0-2 es el mayoritario en ambas respuestas. Y, aunque, el porcentaje con grado 3 pre-tratamiento es superior en RCp vs no RCp, se consigue disminuir al 0% el porcentaje con grado 3 post-tratamiento en RCp con el tratamiento aplicado. Así, en RCp, el 16.7% (IC 95% 0-50) tenía grado 3 de infiltrado de linfocitos Tregs (FOXP3+) pre-tratamiento y el 83.3% (IC 95% 50-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento. Mientras que en no RCp, el 3.2% (IC 95% 0-9.7) de los pacientes tenía grado 3 y el 96.8% (IC 95% 90.3-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento. **Post-tratamiento**, todos los pacientes (100%) tienen grado 2 de este infiltrado celular y ninguno (0%) presenta grado 3, independientemente de la respuesta alcanzada.



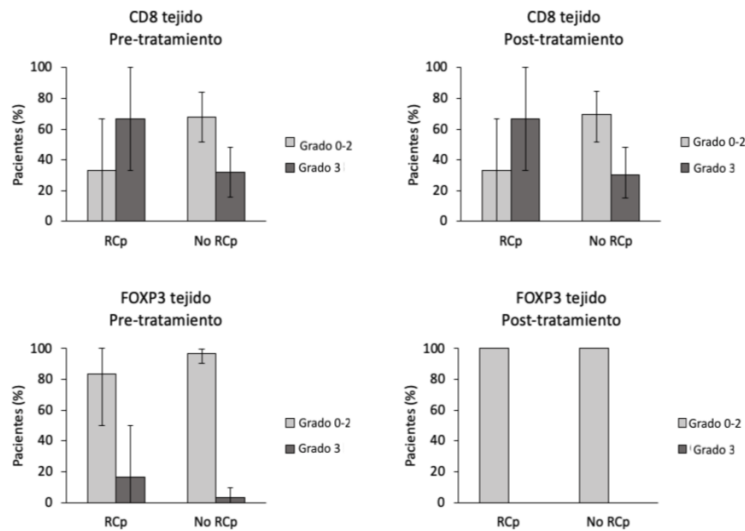


Figura 28. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8 y FOXP3 en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama y ganglionar (sistema de Miller & Payne).



		MAMA		AXILA		MAMA+AXILA	
		RCp	No RCp	RCp	No RCp	RCp	No RCp
Leucocitos totales	Basal	8360 (6570-12000)	9505 (7899-11560)	6625 (5700-8895)	11350 (7845-11440)	6135 (4050-6740)	8600 (6710-9720)
	C3	9300 (8340-11710)	8900 (8430-10650)	7750 (4940-10065)	10205 (8900-13699)	8100 (4280-10965)	8950 (6600-10700)
	C6	4060 (1057-6525)	6240 (3173-7820)	4700 (1411-7082)	7760 (5865-8900)	5300 (2820-6400)	7490 (6030-8355)
Neutrófilos	Basal	6780 (3180-10470)	7150 (4970-9940)	5325 (3350-7150)	8330 (5310-10480)	3775 (2150-5513)	7150 (5630-10340)
	C3	7845 (5420-8510)	7280 (6350-8115)	6910 (5780-9430)	7150 (5890-8510)	6910 (3580-10360)	7355 (6910-8250)
	C6	5310 (1410-7660)	6140 (5672-7130)	4350 (1354-6330)	6070 (5475-7660)	4350 (1410-5310)	6140 (5620-7130)
Linfocitos totales	Basal	830 (705-1240)	1182 (1020-1750)	980 (690-1570)	1270 (880-1820)	1030 (750-1730)	1220 (970-1750)
	C3	920 (725-1140)	930 (730-1100)	920 (645-1045)	1080 (732-1330)	955 (760-1100)	955 (695-1090)
	C6	610 (228-730)	360 (155-590)	740 (560-880)	480 (105-860)	740 (305-920)	380 (155-760)
Monocitos	Basal	350 (230-440)	450 (350-645)	320 (190-450)	570 (360-710)	335 (250-420)	450 (380-650)
	C3	315 (275-370)	425 (340-680)	350 (190-540)	520 (380-790)	335 (195-425)	390 (310-560)
	C6	210 (150-420)	340 (270-540)	205 (109-315)	510 (380-780)	200 (150-210)	350 (310-540)
Linfocitos T	Basal	610 (403-968)	972 (728-1128)	649 (414-925)	889 (528-1260)	687 (456-1170)	807 (690-1096)
	C3	644 (540-752)	717 (572-823)	636 (480-759)	746 (599-942)	750 (614-885)	717 (570-797)
	C6	500 (439-718)	583 (319-710)	516 (400-664)	701 (347-893)	518 (400-882)	550 (353-701)
Linfocitos B	Basal	146 (89-243)	164 (136-224)	164 (105-251)	154 (123-246)	136 (89-232)	154 (137-223)
	C3	79 (42-125)	69 (45-103)	72 (47-109)	79 (32-132)	97 (48-126)	59 (40-74)
	C6	51 (32-79)	33 (17-46)	31 (6-46)	22 (17-38)	52 (46-74)	25 (17-38)
Linfocitos NK	Basal	195 (154-214)	213 (183-270)	228 (167-294)	200 (188-253)	223 (155-307)	202 (186-258)
	C3	156 (121-207)	145 (107-172)	179 (140-218)	156 (131-198)	218 (140-290)	147 (119-188)
	C6	114 (80-173)	127 (97-163)	158 (94-198)	100 (75-129)	156 (95-258)	125 (79-178)
Linfocitos T CD4	Basal	305 (222-476)	508 (406-637)	314 (225-505)	410 (241-616)	334 (207-575)	441 (262-616)
	C3	345 (274-428)	362 (211-435)	423 (322-477)	346 (279-479)	428 (266-499)	362 (228-422)
	C6	264 (111-483)	296 (151-381)	276 (230-382)	327 (222-414)	276 (111-483)	296 (222-382)
Linfocitos T CD8	Basal	252 (189-380)	308 (230-459)	201 (140-308)	401 (221-511)	298 (154-425)	304 (226-421)
	C3	208 (182-281)	220 (177-268)	202 (161-232)	316 (208-405)	237 (195-331)	220 (186-268)
	C6	286 (211-384)	179 (122-317)	188 (115-295)	283 (144-378)	327 (215-377)	180 (127-272)
Linfocitos Treg	Basal	74 (40-97)	98 (49-154)	80 (40-126)	96 (54-160)	87 (41-130)	95 (62-154)
	C3	78 (43-119)	60 (33-96)	64 (33-117)	78 (45-108)	60 (32-125)	50 (33-96)
	C6	49 (24-73)	75 (43-118)	38 (28-63)	105 (85-128)	25 (10-45)	84 (50-116)
CD8 tejido	Antes	G 0-2: 30 (0.3-60) G 3: 70 (40-99.7)	G 0-2: 72.4 (55.2-89.6) G 3: 27.6 (10.4-44.8)	G 0-2: 49.2 (21.4-71.4) G 3: 57.1 (28.6-78.6)	G 0-2: 64.3 (42.9-85.7) G 3: 35.7 (14.3-57.1)	G 0-2: 33.3 (0-66.7) G 3: 66.7 (33.3-100)	G 0-2: 67.7 (51.6-83.9) G 3: 32.3 (16.1-48.4)
	Después	G 0-2: 60 (30-90) G 3: 40 (10-70)	G 0-2: 67.7 (51.6-83.8) G 3: 32.3 (16.2-48.4)	G 0-2: 42.9 (21.4-71.4) G 3: 57.1 (28.6-78.6)	G 0-2: 66.7 (40-93.2) G 3: 33.3 (6.8-60)	G 0-2: 33.3 (0-66.7) G 3: 66.7 (33.3-100)	G 0-2: 69.7 (54.5-84.8) Grupo 3: 30.3 (15.2-45.5)
	FOXP3 tejido	Antes	G 0-2: 80 (50-100) G 3: 20 (0-50)	G 0-2: 96.6 (89.7-100) G 3: 3.4 (0-10.3)	G 0-2: 92.9 (78.6-100) G 3: 7.1 (0-21.4)	G 0-2: 87.5 (68.8-100) G 3: 12.5 (0-31.3)	G 0-2: 92.9 (78.6-100) G 3: 7.1 (0-21.4)
Después	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	

Tabla 19. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica y en tejido según respuesta patológica evaluada por **estadio TNM patológico**.

Los valores de T CD8+ y FOXP3+ en tejido representa el porcentaje e IC 95% de pacientes con una determinada gradación (G) según sistema Ladoire (0-3). El resto de las poblaciones linfocitarias medidas en sangre periférica están representadas con valores de mediana(células/ul) e IC 95%.

RCp, respuesta completa patológica; C3, ciclo 3; C6, ciclo 6; G, grado según sistema de Ladoire.





		MAMA		AXILA		MAMA+AXILA	
		RCp	No RCp	RCp	No RCp	RCp	No RCp
Leucoc. totales	Basal	6740 (5700-10080)	9680 (8690-11700)	6235 (5430-7950)	9415 (6590-12080)	6135 (4050-7340)	9505 (8781-11846)
	C3	7620 (4500-9500)	8900 (8600-10600)	7750 (4100-10000)	9710 (8389-12800)	8300 (5500-11800)	8900 (8470-10155)
	C6	4060 (1057-6525)	5840 (2340-7900)	2820 (1180-5300)	7760 (6098-8400)	5300 (2820-6400)	5740 (3021-7620)
Neutróf.	Basal	5515 (3180-7150)	7710 (5310-10415)	4370 (3180-5560)	7150 (4970-10350)	3775 (2150-5515)	7335 (5245-10470)
	C3	7280 (5420-7930)	7410 (6910-8510)	6850 (4235-7545)	7410 (5110-10290)	5780 (2620-6930)	7850 (7050-10430)
	C6	5310 (1410-7660)	6140 (5633-7130)	4160 (1354-5310)	6060 (5633-7035)	4350 (1410-5310)	6060 (5475-7185)
Linfocitos totales	Basal	950 (750-1570)	1182 (1020-1760)	1270 (740-2100)	1545 (1270-1820)	1030 (750-1730)	1220 (970-1755)
	C3	930 (830-1050)	930 (730-1090)	1000 (400-1600)	1135 (820-1450)	955 (760-1100)	930 (600-1090)
	C6	610 (227-785)	380 (168-760)	485 (230-740)	240 (100-380)	640 (820-105)	470 (168-760)
Monocitos	Basal	335 (230-400)	460 (360-660)	320 (270-450)	550 (330-710)	335 (250-420)	460 (360-660)
	C3	320 (290-410)	385 (305-650)	370 (295-540)	480 (340-690)	335 (265-495)	400 (340-660)
	C6	210 (175-315)	340 (270-540)	210 (150-320)	510 (370-720)	200 (150-220)	370 (310-570)
Linfocitos T	Basal	606 (403-968)	988 (728-1249)	649 (428-943)	889 (528-1178)	628 (456-1086)	807 (690-1096)
	C3	655 (525-746)	717 (570-823)	636 (437-759)	746 (545-836)	721 (574-810)	717 (546-810)
	C6	501 (400-882)	583 (319-710)	631 (393-800)	517 (247-774)	662 (404-882)	517 (319-691)
Linfocitos B	Basal	158 (105-241)	160 (136-222)	156 (97-231)	157 (134-236)	146 (99-232)	147 (136-212)
	C3	83 (46-125)	75 (40-103)	72 (46-117)	69 (32-112)	97 (48-127)	49 (53-94)
	C6	52 (17-85)	27 (17-38)	31 (6-46)	25 (17-42)	52 (46-74)	25 (16-38)
Linfocitos NK	Basal	196 (154-251)	212 (186-259)	197 (139-274)	217 (188-267)	193 (135-267)	212 (186-262)
	C3	168 (121-218)	147 (132-191)	181 (140-228)	147 (132-211)	218 (140-290)	147 (132-192)
	C6	124 (80-183)	127 (97-183)	178 (156-226)	110 (87-132)	156 (95-219)	125 (99-168)
Linfocitos T CD4	Basal	260 (207-308)	410 (231-508)	315 (222-442)	406 (220-616)	360 (207-575)	414 (228-534)
	C3	338 (236-420)	337 (211-414)	384 (262-450)	354 (279-479)	408 (266-499)	362 (228-422)
	C6	253 (111-413)	296 (151-382)	327 (111-483)	351 (255-402)	276 (111-483)	296 (222-382)
Linfocitos T CD8	Basal	249 (172-361)	308 (228-458)	235 (147-308)	255 (216-493)	298 (154-425)	300 (226-400)
	C3	232 (195-310)	217 (177-252)	208 (176-241)	233 (177-355)	237 (195-331)	222 (195-283)
	C6	286 (209-384)	176 (122-295)	207 (108-357)	230 (133-348)	327 (215-377)	183 (133-295)
Linfocitos Treg	Basal	77 (40-126)	80 (49-154)	80 (40-125)	102 (63-161)	79 (40-107)	103 (70-161)
	C3	75 (43-139)	50 (33-91)	50 (33-97)	78 (44-105)	60 (33-109)	72 (36-105)
	C6	61 (24-111)	67 (38-116)	35 (24-52)	100 (83-125)	25 (12-43)	99 (67-122)
CD8 tejido	Antes	G 0-2: 33.3 (0-66.7) G 3: 66.7 (33.3-100)	G 0-2: 70 (53.3-86.7) G 3: 30 (13.3-46.7)	G 0-2: 38.5 (15.4-61.5) G 3: 61.5 (38.5-84.6)	G 0-2: 66.7 (12.1-40) G 3: 33.3 (13.3-40)	G 0-2: 33.3 (0-66.7) G 3: 66.7 (33.3-100)	G 0-2: 67.7 (51.6-83.9) G 3: 32.3 (16.1-48.4)
	Después	G 0-2: 44.4 (11.1-77.8) G 3: 55.6 (22.2-88.9)	G 0-2: 68.8 (53.1-84.4) G 3: 31.3 (15.6-46.9)	G 0-2: 46.2 (23.1-69.2) G 3: 53.8 (30.8-76.9)	G 0-2: 64.7 (41.2-88.2) G 3: 35.3 (11.8-58.8)	G 0-2: 33.3 (0-66.7) G 3: 66.7 (33.3-100)	G 0-2: 69.7 (51.6-84.8) G 3: 30.3 (15.1-48.4)
	FOXP3 tejido	Antes	G 0-2: 77.8 (44.4-100) G 3: 22.2 (0-55.6)	G 0-2: 96.7 (90-100) G 3: 3.3 (0-10)	G 0-2: 92.3 (76.9-100) G 3: 7.7 (0-23.1)	G 0-2: 93.3 (80-100) G 3: 6.7 (9-20)	G 0-2: 83.3 (50-100) G 3: 16.7 (0-50)
Después	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	

Tabla 20. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica y en tejido según respuesta patológica evaluada por sistema de Miller & Payne. Los valores de T CD8+ y FOXP3+ en tejido representa el porcentaje e IC 95% de pacientes con una determinada gradación (G) según sistema Ladoire (0-3). El resto de las poblaciones linfocitarias medidas en sangre periférica están representadas con valores de mediana(células/ul) e IC 95%. RCp, respuesta completa patológica; C3, ciclo 3; C6, ciclo 6; G, grado según sistema de Ladoire.

		MAMA		AXILA		MAMA+AXILA	
		RCp	No RCp	RCp	No RCp	RCp	No RCp
Ratio Neutrófilos/linfocitos	Basal	6.33 (2.18-9.89)	5.24 (2.80-7.50)	4.97 (2.23-9.01)	5.62 (2.46-9.94)	3.68 (1.65-6.24)	3.46 (1.97-6.71)
	C3	8.90 (6.65-11.28)	8.22 (5.93-9.45)	8.49 (6.38-11.28)	8.27 (5.22-10.25)	6.82 (2.28-10.78)	9.25 (6.28-11.82)
	C6	5.77 (2.23-8.65)	8.74 (6.32-10.86)	6.88 (4.77-10.05)	10.13 (8.21-13.41)	4.57 (1.34-5.87)	8.35 (5.96-10.79)
Ratio linfocitos/monocitos	Basal	3.99 (1.92-4.91)	3.06 (2.44-3.78)	4.05 (2.75-4.90)	3.12 (1.72-3.91)	4.05 (2.40-4.90)	3.20 (2.17-4.04)
	C3	2.70 (1.68-3.14)	1.91 (1.50-2.66)	2.68 (1.63-3.43)	1.88 (1.13-2.81)	2.77 (1.68-3.06)	2.47 (0.93-4.21)
	C6	3.72 (1.74-6.13)	1.54 (1.12-1.87)	3.25 (1.95-5.13)	1.12 (0.36-2.39)	5.25 (3.52-6.13)	1.48 (1.08-1.80)
Ratio CD8/Treg	Basal	2.51 (2.09-3.74)	2.43 (1.75-3.40)	1.73 (0.73-2.60)	2.43 (1.91-3.67)	3.10 (1.88-4.40)	2.29 (1.75-3.98)
	C3	2.66 (1.67-3.78)	2.93 (2.13-4.88)	2.43 (1.16-4.46)	3.19 (2.16-4.38)	1.46 (0.85-1.85)	5.02 (3.19-8.33)
	C6	3.52 (1.87-5.77)	2.66 (1.40-4.09)	3.94 (2.04-6.53)	3.32 (2.01-4.85)	5.53 (2.34-9.77)	2.84 (2.42-3.51)
Ratio CD4/CD8	Basal	1.82 (1.42-2.09)	1.67 (1.41-1.86)	1.78 (1.45-2.09)	1.37 (0.86-1.78)	1.87 (1.29-2.14)	1.42 (0.91-2.11)
	C3	1.45 (1.10-1.80)	1.64 (1.27-1.79)	2.28 (1.88-2.53)	1.41 (0.93-1.73)	2.07 (1.45-2.47)	1.25 (0.62-2.24)
	C6	1.22 (0.73-1.58)	1.25 (1.06-1.46)	1.87 (1.08-2.63)	0.88 (0.34-1.28)	0.73 (0.32-1.35)	1.45 (1.05-1.74)

Tabla 21. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares (ratios) medidas en sangre periférica según respuesta patológica evaluada por estadio TNM patológico. RCp, respuesta completa patológica; C3, ciclo 3; C6, ciclo 6.



		MAMA		AXILA		MAMA+AXILA	
		RCp	No RCp	RCp	No RCp	RCp	No RCp
Ratio Neutrófilos/linfocitos	Basal	3.78 (2.18-6.25)	7.05 (3.26-11.15)	5.61 (1.65-9.01)	4.62 (2.46-6.88)	3.00 (1.68-5.31)	4.67 (2.97-7.57)
	C3	5.82 (2.00-8.34)	8.01 (3.29-11.57)	8.93 (6.82-11.45)	9.25 (6.28-11.58)	7.15 (1.89-11.28)	8.58 (6.28-10.64)
	C6	5.77 (1.34-8.65)	7.37 (2.91-12.05)	7.74 (3.34-11.05)	7.37 (3.45-10.12)	5.47 (1.34-8.88)	8.35 (4.55-10.85)
Ratio linfocitos/monocitos	Basal	4.05 (2.87-4.91)	2.85 (1.46-4.72)	2.98 (1.92-4.42)	2.69 (1.57-4.10)	4.42 (2.87-5.14)	3.14 (2.38-4.10)
	C3	3.00 (1.50-4.14)	2.29 (1.61-3.57)	2.30 (1.03-3.06)	1.93 (1.22-3.32)	2.70 (2.09-3.09)	2.06 (1.59-2.81)
	C6	4.39 (2.14-6.03)	1.55 (1.05-2.55)	5.25 (3.52-6.13)	1.35 (1.10-1.56)	5.25 (3.52-6.13)	1.38 (0.95-1.71)
Ratio CD8/Treg	Basal	3.14 (1.88-3.82)	2.87 (2.23-3.40)	2.82 (1.70-4.40)	3.46 (2.11-6.50)	4.10 (1.84-7.70)	2.46 (1.82-3.40)
	C3	2.45 (1.26-4.06)	2.63 (1.58-3.88)	3.89 (1.97-5.25)	3.19 (2.66-5.33)	2.76 (1.06-5.38)	3.00 (1.83-4.38)
	C6	2.18 (1.55-3.53)	3.02 (2.07-4.60)	4.94 (2.04-7.52)	2.52 (1.68-4.04)	6.53 (2.55-9.77)	2.84 (2.42-3.73)
Ratio CD4/CD8	Basal	1.87 (1.34-2.14)	1.58 (1.47-1.65)	1.91 (1.65-2.46)	1.57 (1.09-1.79)	1.98 (1.56-2.26)	1.57 (1.40-1.82)
	C3	1.45 (1.00-2.08)	1.64 (1.09-1.89)	1.98 (1.45-2.53)	1.41 (1.00-1.79)	1.80 (1.45-2.40)	1.52 (1.14-1.74)
	C6	1.14 (0.73-1.35)	1.76 (1.19-2.15)	1.72 (1.21-2.32)	0.57 (0.94-0.91)	0.73 (0.52-1.35)	1.41 (1.01-1.66)

Tabla 22. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares (ratios) medidas en sangre periférica según respuesta patológica evaluada por sistema de Miller & Payne. RCp, respuesta completa patológica; C3, ciclo 3; C6, ciclo 6.

#### 4.4.3 Correlación con la supervivencia.

Para el estudio del valor pronóstico de las poblaciones celulares, hemos considerado como pacientes con “mejor pronóstico” aquellas con datos de supervivencia mayor a la media, mientras que las pacientes con supervivencia menor a la media son consideradas de “peor pronóstico”. Se ha realizado el análisis de las poblaciones celulares en relación a la variable supervivencia tras 9 años de seguimiento.

- **Supervivencia libre de enfermedad.** Tablas 26 y 27, Figuras 29 y 30.

Hay mayores niveles basales estadísticamente significativos de **leucocitos totales** en aquellos pacientes con SLE > media respecto a SLE < media. Por otro lado, se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles en C6 en SLE > media. Así, los niveles basales de leucocitos totales son 9330 (IC 95% 7100-11700) vs 6760 (IC 95% 5700-9100) cels/ul en los pacientes con SLE > media vs SLE < media, respectivamente (p = 0.039). Los niveles de leucocitos totales en pacientes con SLE > media son 9330 (IC 95% 7100-11700) vs 4400 (IC 95% 1232-6875) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (p= 0.001).

Hay mayores niveles estadísticamente significativo de **neutrófilos** tanto en determinación basal como en C6 en aquellos pacientes con SLE > media respecto a SLE < media. Así, los valores basales de neutrófilos son 7520 (IC 95% 5470-10470) vs 5540 (IC 95% 3510-6115) cels/ul en los pacientes con SLE > media vs SLE < media, respectivamente (p = 0.049). Los valores en C6 de neutrófilos son 6630 (IC 95% 5475-7740) vs 4985 (IC 95% 3205-5970) cels/ul en los pacientes con SLE > media vs SLE < media, respectivamente (p = 0.020).

Se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de **linfocitos totales** tanto en aquellos pacientes con SLE > media como en SLE < media. Además, hay mayores niveles estadísticamente significativos en C6 en aquellos pacientes con SLE > media vs SLE < media. Los valores en C6 son 1390 (IC 95%



1170-1890) vs 142 (IC 95% 106-274) cels/ul en los pacientes con SLE > media vs SLE < media, respectivamente ( $p = 0.011$ ).

Hay mayores niveles en C6 de **monocitos** en aquellos pacientes con SLE < media vs SLE > media con medianas de 620 (IC 95% 445-865) vs 550 (IC 95% 340-705) cels/ul, respectivamente ( $p = 0.006$ ).

Se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de **linfocitos B** en aquellos pacientes con SLE > media con medianas de 146 (IC 95% 122-168) vs 24 (IC 95% 10-46) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ).

Se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de **NK** en aquellos pacientes con SLE > media con medianas de 201 (IC 95% 158-257) vs 120 (IC 95% 85-168) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p < 0.001$ ).

Aunque los niveles basales como en C6 de **linfocitos T** son estadísticamente mayores en aquellos pacientes con SLE < media vs SLE > media, se produce un descenso estadísticamente significativo en aquellos pacientes con SLE < media en probable relación al descenso de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8 en el subgrupo de pacientes de “peor pronóstico”.

Los valores basales son 712 (IC 95% 493-1024) vs 1100 (IC 95% 728-1275) cels/ul en los pacientes con SLE > media vs SLE < media, respectivamente ( $p = 0.046$ ).

Los valores en C6 son 500 (IC 95% 386-664) vs 806 (IC 95% 691-1045) cels/ul en los pacientes con SLE > media vs SLE < media, respectivamente ( $p = 0.021$ ).

Los valores en SLE < media son 1100 (IC 95% 728-1275) vs 806 (IC 95% 691-1045) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.043$ ).

Se produce un descenso estadísticamente significativo de **linfocitos T CD4+ y T CD8+** en aquellos pacientes con SLE < media. Los valores de linfocitos T CD4 en SLE < media son 575 (IC 95% 406-763) vs 431 (IC 95% 339-695) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.043$ ). Los valores de linfocitos T CD8 en SLE < media son 380 (IC 95% 222-511) vs 327 (IC 95% 232-389) cels/ul en basal vs C6, respectivamente ( $p = 0.028$ ).

Hay mayores niveles estadísticamente significativos de **linfocitos Treg** en SLE < media vs SLE > media en C6. Además, se produce un descenso de los niveles de linfocitos Treg en aquellas pacientes con SLE > media, mientras que se mantienen constantes en SLE < media. Los valores en C6 de linfocitos Treg son 43 (IC 95% 28-69) vs 108 (IC 95% 76-135) cels/ul en SLE > media vs SLE < media, respectivamente ( $p = 0.028$ ).



Los valores de linfocitos Treg en SLE > media son 77 (IC 95% 54-126) vs 43 (IC 95% 28-69) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (p = 0.033). [Tabla 26, Figura 29.](#)

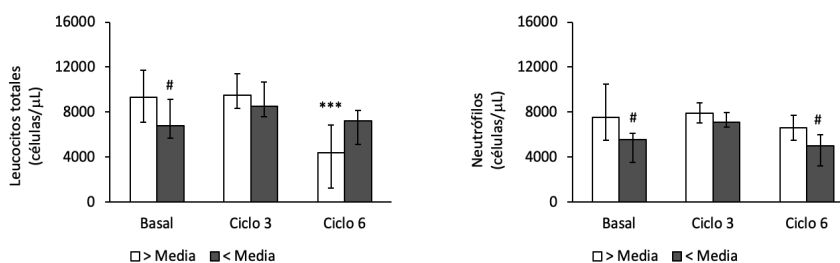
**El ratio neutrófilos/linfocitos** aumenta a lo largo del tratamiento en SLE< media con diferencias estadísticamente significativas en C6 7.38 (IC 95% 4.45-11.44) vs basal 4.84 (IC 95% 3.34-7.00), p = 0.038. En C6 el ratio es mayor en SLE< media vs SLE > media, aunque no p significativa.

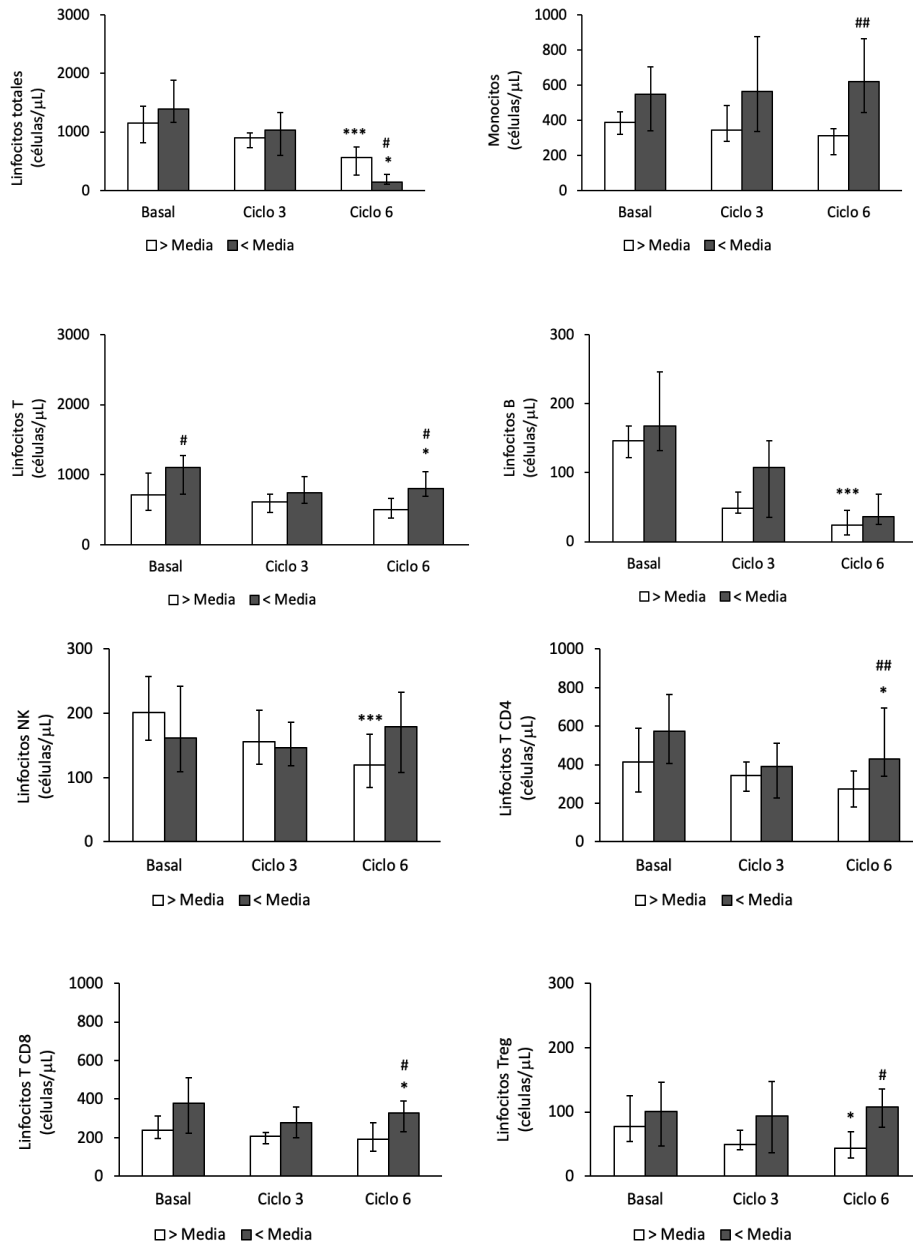
**El ratio linfocitos/monocitos** disminuye a lo largo del tratamiento en SLE< media con diferencias estadísticamente significativas en C6 1.97 (IC 95% 1.12-2.63) vs basal 3.77 (IC 95% 2.76-5.02), p = 0.012. En C6 el ratio es menor en SLE< media vs SLE > media, aunque no p significativa.

**El ratio CD8/Treg** disminuye a lo largo del tratamiento en SLE< media, mientras se mantiene constante en SLE > media, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

**El ratio CD4/CD8** disminuye a lo largo del tratamiento en SLE< media, mientras se mantiene constante en SLE > media, con diferencias estadísticamente significativas. El ratio en SLE < media fue en basal 1.39 (IC 95% 1.29-1.59) vs 1.06 (IC 95% 0.90-1.28) en C6, p = 0.008.

El ratio en C6 fue en 1.06 (IC 95% 0.90-1.28) SLE < media vs 1.35 (IC 95% 0.91-2.00) en SLE > media, p = 0.049. [Tabla 27, Figura 29.](#)





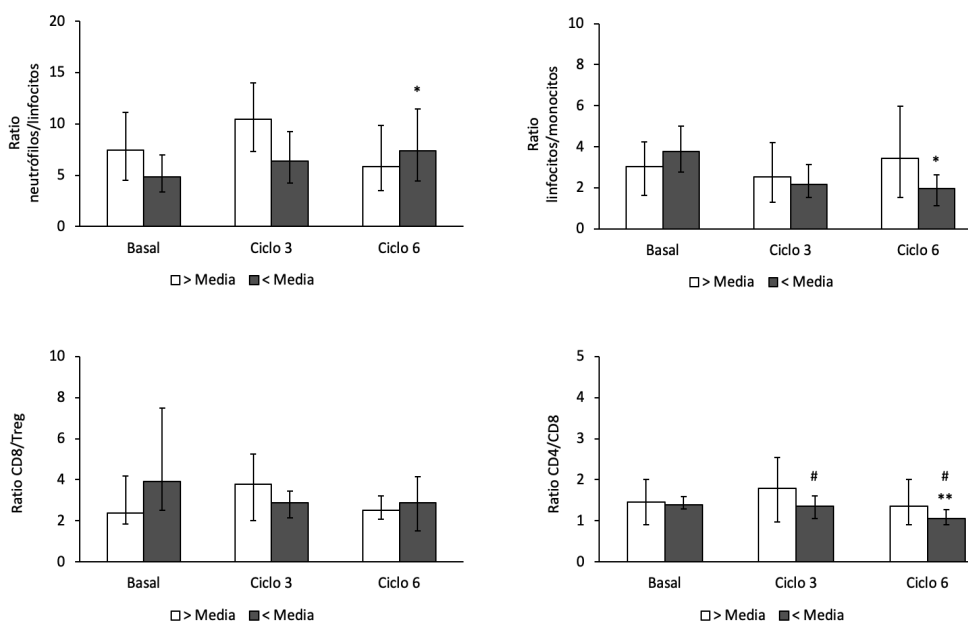


Figura 29. Niveles de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) y ratios antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según supervivencia libre de enfermedad (SLE). \*, \*\* y \*\*\*,  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente, comparativa con basal. # y ##,  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ , comparativa con > media. Se han empleado diferentes escalas.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos Tregs (FOXP3+) en tejido pre-tratamiento** con grado 0-2 es el mayoritario en ambas variables de SLE. Y, aunque, el porcentaje con grado 3 pre-tratamiento es superior en SLE > media vs SLE < media, se consigue disminuir al 0% el porcentaje con grado 3 post-tratamiento en SLE > media con el tratamiento aplicado. Así, en SLE > media, el 10.7% (IC 95% 0-25.0) tenía grado 3 de infiltrado de linfocitos T regs (FOXP3+) pre-tratamiento y el 89.3% (IC 95% 75.0-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T regs FOXP3+ pre-tratamiento. Mientras que en SLE < media, ningún (0%) paciente tenía grado 3 ya que el 100% tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T regs FOXP3+ pre-tratamiento.

**Post-tratamiento**, todos los pacientes (100%) tienen grado 2 de este infiltrado celular y ninguno (0%) presenta grado 3, independientemente de la SLE. [Tabla 26](#), [Figura 30](#).

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ en tejido pre-tratamiento** con grado 0-2 es el mayoritario en ambas variables de SLE y se mantiene prácticamente constante **post-tratamiento**. [Tabla 26](#), [Figura 30](#).



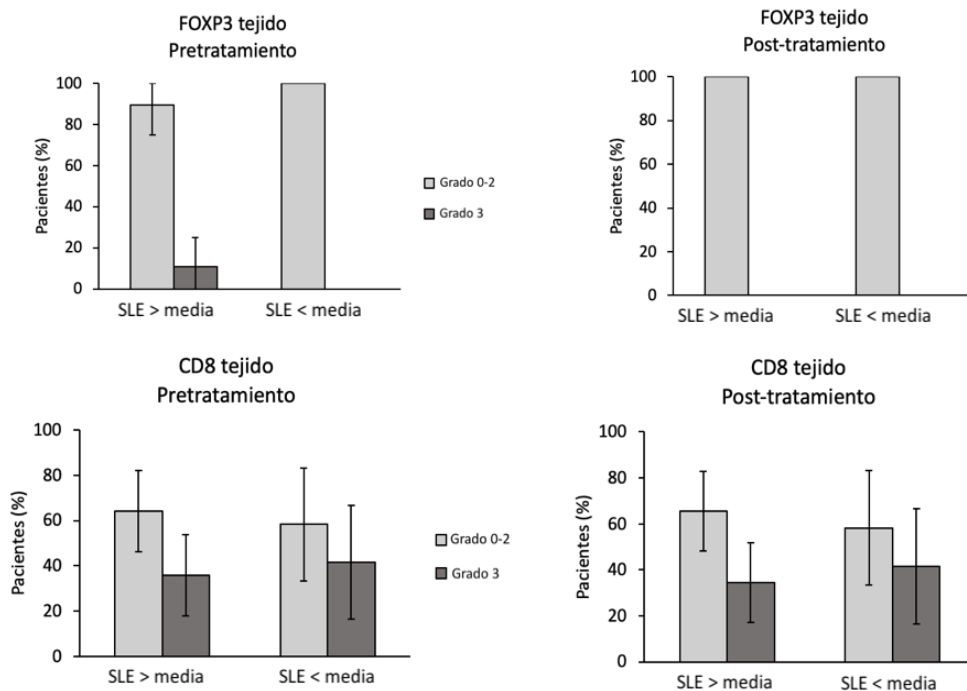


Figura 30. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según supervivencia libre de enfermedad (SLE).

- **Supervivencia global. Tablas 26 y 27. Figuras 31-33.**

Hay mayores niveles basales estadísticamente significativos de **leucocitos totales** en aquellos pacientes con SG > media respecto a SG < media. Sin embargo, se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles en C6 en SG > media, por lo que finalmente hay mayores niveles en C6 estadísticamente significativos en SG < media vs SG > media. Así, los niveles basales de leucocitos totales son 9505 (IC 95% 7730-11750) vs 6675 (IC 95% 5695-9100) cels/ul en los pacientes con SG > media vs SG < media, respectivamente (p = 0.024). Los niveles en C6 de leucocitos totales son 4700 (IC 95% 1270-6650) vs 7490 (IC 95% 6830-8400) cels/ul en los pacientes con SG > media vs SG < media, respectivamente (p = 0.045). Los niveles de leucocitos totales en pacientes con SG > media son 9505 (IC 95% 7730-11750) vs 4700 (IC 95% 1270-6650) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (p = 0.001).

Hay mayores niveles basales estadísticamente significativos de **neutrófilos** en aquellos pacientes con SG > media respecto a SG < media. Así, los valores basales



de neutrófilos son 7250 (IC 95% 5515-10475) vs 4970 (IC 95% 3510-7450) cels/ul en los pacientes con SG > media vs SG < media, respectivamente (p = 0.043).

Se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de **linfocitos totales** tanto en aquellos pacientes con SG > media como en SG < media. Además, hay mayores niveles estadísticamente significativos en C6 en aquellos pacientes con SG > media vs SG < media. Los valores en C6 son 425 (IC 95% 245-695) vs 142 (IC 95% 112-368) cels/ul en los pacientes con SG > media vs SG < media, respectivamente (p = 0.047).

Los valores de **monocitos** son similares a lo largo del tratamiento tanto en SG > media como en SG < media. Si bien, hay un discreto aumento de los niveles en C6 de monocitos en aquellos pacientes con SG < media vs SG > media, pero no estadísticamente significativo.

Se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de **linfocitos B** en aquellos pacientes con SG > media con medianas de 149 (IC 95% 103-205) vs 34 (IC 95% 17-46) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (p < 0.001).

Se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de **NK** en aquellos pacientes con SG > media con medianas de 195 (IC 95% 179-225) vs 136 (IC 95% 94-189) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (p < 0.001).

Los niveles en C6 de **linfocitos T** son estadísticamente mayores en aquellos pacientes con SG < media vs SG > media, con medianas de 1008 (IC 95% 472-1546) vs 517 (IC 95% 386-691) cels/ul en basal vs C6, respectivamente (p < 0.012).

Al contrario de lo que ocurría en SLE, los niveles de **linfocitos T CD4+ y T CD8+** se mantienen prácticamente constantes a lo largo del tratamiento tanto en aquellos pacientes con SG < media como con SG > media, aunque se muestra un ligero descenso en C6 de los niveles de linfocitos T CD4 en pacientes con SG < media (no estadísticamente significativo).

Se mantienen prácticamente constantes los niveles de **linfocitos Treg** a lo largo de tratamiento en ambos grupos de pacientes. Además, destacan mayores niveles tanto basales como en C6 estadísticamente significativos de linfocitos Treg en SG < media vs SG > media en C6. Los valores basales de linfocitos Treg son 155 (IC 95% 121-224) vs 70 (IC 95% 40-92) cels/ul en SG < media vs SG > media, respectivamente (p < 0.001).

Los valores en C6 de linfocitos Treg son 127 (IC 95% 116-143) vs 48 (IC 95% 21-83) cels/ul en SG < media vs SG > media, respectivamente (p = 0.012). [Tabla 26](#), [Figura 31](#).



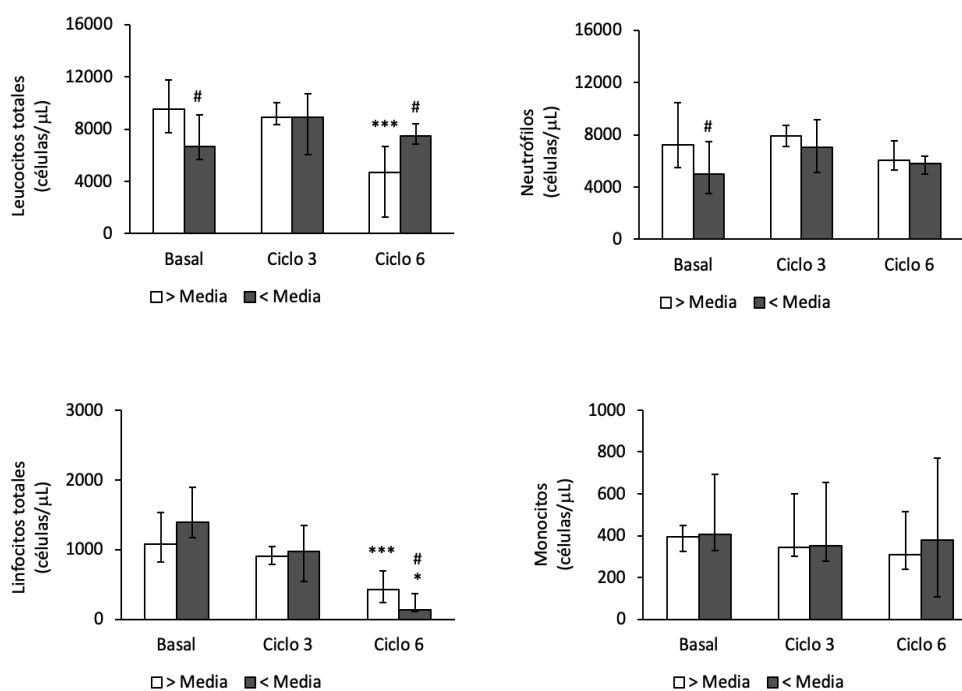


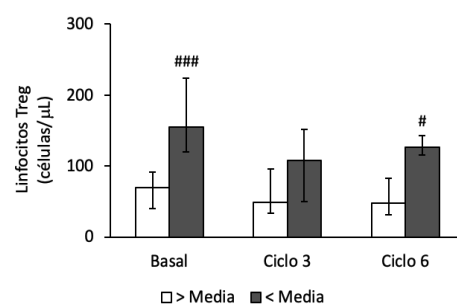
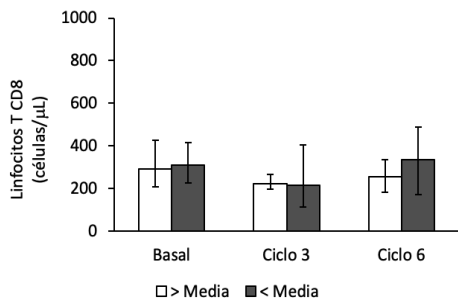
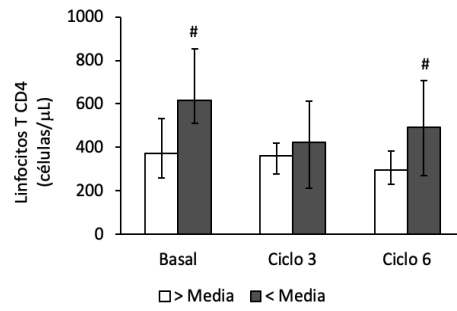
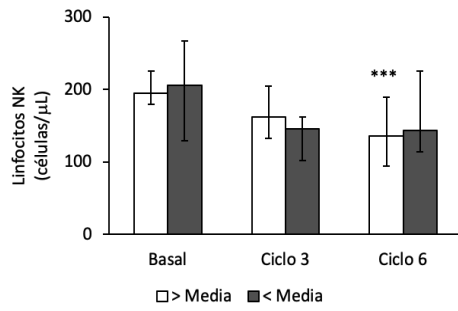
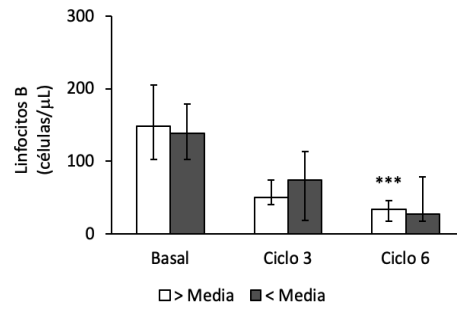
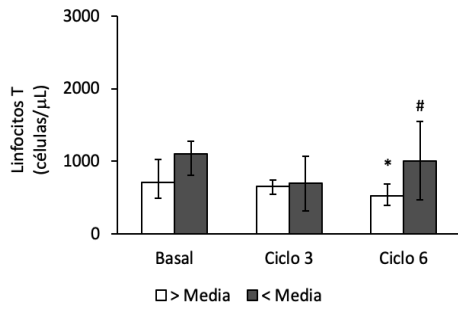
**El ratio neutrófilos/linfocitos** aumenta a lo largo del tratamiento en SG < media pero sin diferencias estadísticamente significativas.

**El ratio linfocitos/monocitos** disminuye a lo largo del tratamiento en SG < media y aumenta en SG > media, pero sin diferencias estadísticamente significativas. El ratio en C6 fue 1.83 (IC 95% 0.45-3.31) en SG < media vs 3.94 (IC 95% 1.54-6.96) en SG > media, (p no significativa).

**El ratio CD8/Treg** se mantiene constante independientemente de la SG.

**El ratio CD4/CD8** disminuye a lo largo del tratamiento en SG < media, mientras que aumenta en SG > media, con diferencias estadísticamente significativas. El ratio en SG < media fue 1.59 (IC 95% 1.26-1.91) en basal vs 1.22 (IC 95% 0.90-1.58) en C6, p = 0.028. El ratio en SG > media fue 1.28 (IC 95% 0.89-2.06) en basal vs 1.92 (IC 95% 1.11-2.35) en C6, p = 0.028. [Tabla 27](#), [Figura 31](#).





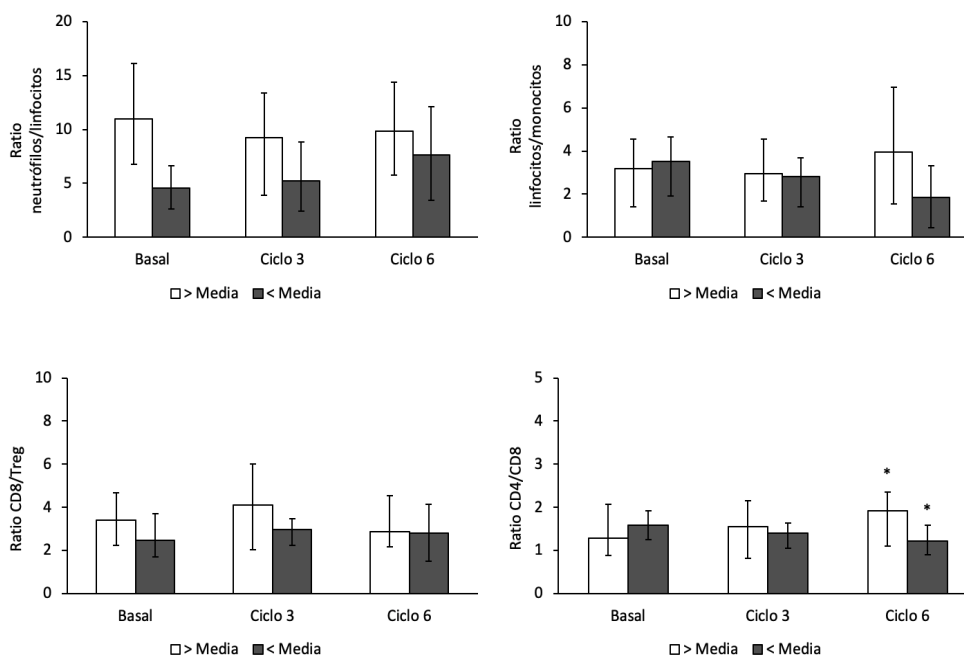


Figura 31. Niveles de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) y ratios antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según supervivencia global (SG). \* y \*\*\*,  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente, comparativa con basal. # y ###,  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.001$ , comparativa con > media. Se han empleado diferentes escalas.

El porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos Tregs (FOXP3+) en tejido pre-tratamiento** con grado 0-2 es el mayoritario en ambas variables de SG. Y, aunque, el porcentaje con grado 3 pre-tratamiento es superior en SG > media vs SG < media, se consigue disminuir al 0% el porcentaje con grado 3 post-tratamiento en SG > media con el tratamiento aplicado. Así, en SG > media, el 9.4% (IC 95% 0-21.9) tenía grado 3 de infiltrado de linfocitos Tregs (FOXP3+) pre-tratamiento y el 90.6% (IC 95% 78.1-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento. Mientras que en SG < media, ningún (0%) paciente tenía grado 3 ya que el 100% tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento.

**Post-tratamiento**, todos los pacientes (100%) tienen grado 0-2 de este infiltrado celular y ninguno (0%) presenta grado 3, independientemente de la SG. [Tabla 26](#), [Figura 32](#).

Aunque el porcentaje de pacientes con infiltrado de **linfocitos T CD8+ en tejido pre-tratamiento** con grado 0-2 es el mayoritario en ambas variables de SG, es mayor el porcentaje de pacientes con grado 3 en SG > media vs SG < media. Así,



en SG > media, el 9.4% (IC 95% 24.2-57.6) tenía grado 3 de infiltrado de linfocitos Tregs (FOXP3+) pre-tratamiento y el 60.6% (IC 95% 42.4-75.8) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento. Mientras que en SG < media, el 28.6% (IC 95% 0-57.1) de pacientes tenían grado 3 y el 71.4% (IC 95% 42.9-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+ pre-tratamiento. Prácticamente no hay grandes modificaciones en los niveles **post-tratamiento**.  
 Tabla 26, Figura 32.

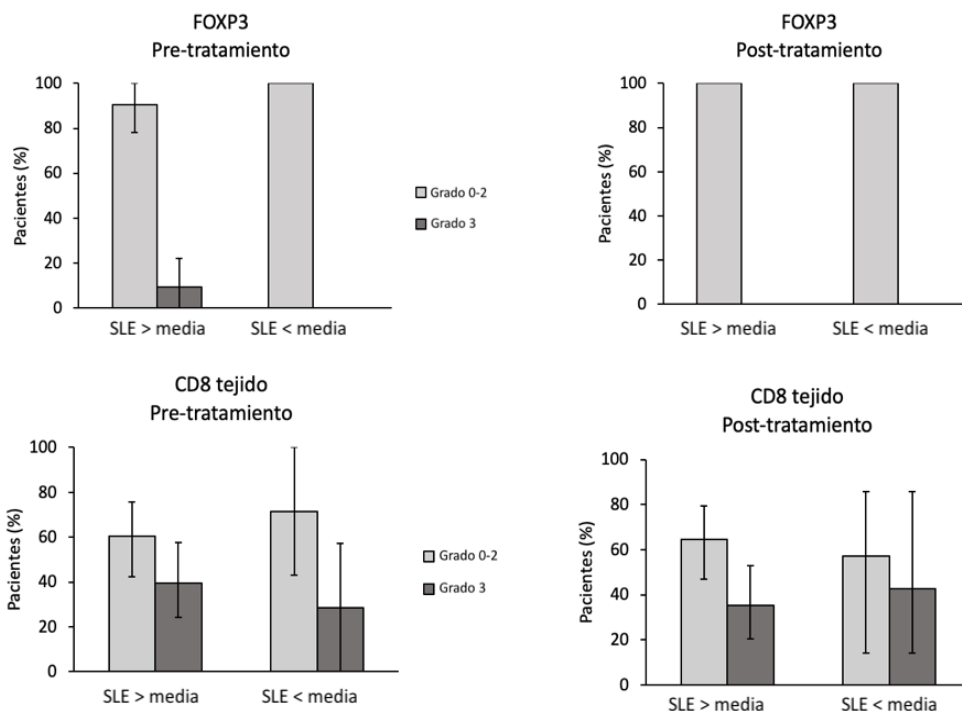


Figura 32. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según supervivencia global (SG).



		SLE y SLED		SG	
		>Media	<Media	>Media	<Media
Leucocitos totales	Basal	9330 (7100-11700)	6760 (5700-9100)	9505 (7730-11750)	6675 (5695-9100)
	C3	9500 (8340-11380)	8500 (7570-10650)	8900 (8340-10000)	8900 (6050-10700)
	C6	4400 (1232-6875)	7225 (5115-8150)	4700 (1270-6650)	7490 (6830-8400)
Neutrófilos	Basal	7520 (5470-10470)	5540 (3510-6115)	7250 (5515-10475)	4970 (3510-7450)
	C3	7910 (7030-8840)	7090 (6650-7930)	7910 (7090-8690)	7050 (5110-9160)
	C6	6630 (5475-7740)	4985 (3205-5970)	6070 (5310-7560)	5830 (4980-6330)
Linfocitos totales	Basal	1150 (820-1435)	1390 (1170-1890)	1080 (820-1530)	1390 (1170-1890)
	C3	900 (730-980)	1030 (600-1330)	910 (790-1040)	980 (540-1350)
	C6	560 (259-740)	142 (106-274)	425 (245-695)	142 (112-368)
Monocitos	Basal	390 (320-450)	550 (340-705)	395 (325-450)	495 (330-635)
	C3	345 (280-485)	565 (335-875)	345 (300-600)	350 (280-655)
	C6	310 (205-350)	620 (445-865)	310 (240-515)	380 (109-770)
Linfocitos T	Basal	712 (493-1024)	1100 (728-1275)	712 (485-1025)	1096 (807-1275)
	C3	610 (459-726)	745 (590-979)	651 (545-742)	700 (318-1066)
	C6	500 (386-664)	806 (691-1045)	517 (386-691)	1008 (472-1546)
Linfocitos B	Basal	146 (122-168)	168 (132-246)	149 (103-205)	139 (103-178)
	C3	49 (41-72)	108 (35-146)	50 (40-74)	74 (18-113)
	C6	24 (10-46)	36 (26-69)	34 (17-46)	28 (17-78)
Linfocitos NK	Basal	201 (158-257)	162 (109-242)	195 (179-225)	206 (129-267)
	C3	156 (121-205)	147 (119-186)	162 (133-205)	146 (102-142)
	C6	120 (85-168)	180 (109-233)	136 (94-189)	144 (34-205)
Linfocitos T CD4	Basal	414 (260-590)	575 (406-763)	373 (261-534)	616 (511-853)
	C3	346 (262-414)	422 (228-513)	363 (279-418)	422 (212-614)
	C6	274 (180-366)	431 (339-695)	296 (230-382)	494 (271-707)
Linfocitos T CD8	Basal	239 (195-312)	380 (222-511)	290 (206-425)	308 (226-416)
	C3	208 (170-226)	279 (200-361)	222 (195-267)	216 (113-405)
	C6	191 (128-276)	327 (232-389)	255 (183-336)	336 (171-487)
Linfocitos Treg	Basal	77 (54-126)	100 (47-146)	70 (40-92)	155 (121-224)
	C3	49 (41-72)	94 (36-147)	49 (33-96)	108 (50-152)
	C6	43 (28-69)	108 (76-135)	48 (21-83)	127 (116-143)
CD8 tejido	Antes	G 0-2: 64.3 (46.4-82.1) G 3: 35.7 (17.9-53.6)	G 0-2: 58.3 (33.3-83.3) G 3: 41.7 (16.7-66.7)	G 0-2: 60.6 (42.4-75.8) G 3: 39.4 (24.2-57.6)	G 0-2: 71.4 (42.9-100) G 3: 28.6 (0-57.1)
	Después	G 0-2: 65.5 (48.3-82.8) G 3: 34.5 (17.2-51.7)	G 0-2: 58.3 (33.3-83.3) G 3: 41.7 (16.7-66.7)	G 0-2: 64.7 (47.1-79.4) G 3: 35.3 (20.6-52.9)	G 0-2: 57.1 (14.3-85.7) G 3: 42.9 (14.3-85.7)
	FOXP3 tejido	Antes G 0-2: 89.3 (75.0-100) G 3: 10.7 (0-25.0)	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 90.6 (78.1-100) G 3: 9.4 (0-21.9)	G 0-2: 100 G 3: 0
Después	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	

Tabla 26. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica y en tejido según supervivencia (SLE y SG). Los valores de T CD8+ y FOXP3+ en tejido representa el porcentaje e IC 95% de pacientes con una determinada gradación (G) según sistema Ladoire (0-3). El resto de las poblaciones linfocitarias medidas en sangre periférica están representadas con valores de mediana (células/ul) e IC 95%. SLE, supervivencia libre de enfermedad; SLED, supervivencia libre de enfermedad a distancia; SG, supervivencia global; C3, ciclo 3; C6, ciclo 6; G, grado según sistema de Ladoire. \*La SLE y SLED son similares, a diferencia de un paciente, por lo que se ha realizado en análisis de las poblaciones celulares en conjunto para SLE y SLED.



		SLE y SLED		SG	
		> Media	< Media	> Media	< Media
Ratio Neutrófilos/linfocitos	Basal	7.44 (4.52-11.15)	4.84 (3.34-7.00)	10.97 (7.78-16.14)	4.55 (2.64-6.61)
	C3	10.42 (7.34-13.98)	6.37 (4.23-9.26)	9.25 (3.91-13.40)	5.23 (2.41-8.86)
	C6	5.83 (3.53-9.86)	7.38 (4.45-11.44)	9.86 (5.77-14.41)	7.65 (3.45-12.14)
Ratio linfocitos/monocitos	Basal	3.02 (1.65-4.23)	3.77 (2.76-5.02)	3.18 (1.43-4.55)	3.52 (1.91-4.67)
	C3	2.54 (1.31-4.19)	2.16 (1.52-3.14)	2.94 (1.68-4.56)	2.81 (1.41-3.70)
	C6	3.43 (1.54-5.96)	1.97 (1.12-2.63)	3.94 (1.54-6.96)	1.83 (0.45-3.31)
Ratio CD8/Treg	Basal	2.36 (1.75-4.19)	3.90 (2.50-7.50)	3.39 (2.23-4.66)	2.46 (1.68-3.71)
	C3	3.78 (2.02-5.25)	2.87 (2.15-3.46)	4.12 (2.02-6.00)	2.97 (2.23-3.47)
	C6	2.52 (2.07-3.20)	2.88 (1.50-4.15)	2.88 (2.18-4.54)	2.79 (1.50-4.15)
Ratio CD4/CD8	Basal	1.46 (0.91-2.01)	1.39 (1.29-1.59)	1.28 (0.89-2.06)	1.59 (1.26-1.91)
	C3	1.79 (0.97-2.53)	1.36 (1.05-1.61)	1.55 (0.82-2.15)	1.41 (1.05-1.64)
	C6	1.35 (0.91-2.00)	1.06 (0.90-1.28)	1.92 (1.11-2.35)	1.22 (0.90-1.58)

Tabla 27. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares (ratio) medidas en sangre periférica según supervivencia (SLE y SG). *SLE, supervivencia libre de enfermedad; SLED, supervivencia libre de enfermedad a distancia; SG, supervivencia global; C3, ciclo 3; C6, ciclo 6.*

*\*La SLE y SLED son similares, a diferencia de un paciente, por lo que se ha realizado en análisis de las poblaciones celulares en conjunto para SLE y SLED.*

**¿Aquellos pacientes que tienen mejor supervivencia (SLE y SG > media) tienen valores de las poblaciones celulares post-QTNA en sangre similares a la cohorte de sanas? Tablas 28 y 29.**

La hipótesis para este análisis es que los valores post-tratamiento de las poblaciones celulares en la cohorte de pacientes con mejor pronóstico (SLE/SLED ó SG > media) es similar a los valores basales de la cohorte de sanas. En este caso, la hipótesis nula sería que NO hay diferencias en los niveles celulares entre los pacientes con mejor pronóstico (SLE/SLED ó SG > media) tras neoadyuvancia y la cohorte sana (es decir,  $p > 0.05$ ), mientras que la hipótesis alternativa sería que SÍ hay diferencias ( $p < 0.05$ ). Para ello, empleamos U de Mann-Whitney para dos muestras independientes, pero buscando los  $p > 0.05$ , ya que no queremos que existan diferencias entre los grupos sanas vs enfermas.

Destaca que los valores de **linfocitos Treg** en C6 de aquellos pacientes con mejor pronóstico (SLE/SLED ó SG > media) son similares a los valores basales de la cohorte sana, con  $p > 0.05$ . Lo que podría estar en relación al probable potencial papel del tratamiento oncológico neoadyuvante para reestablecer un sistema inmunocompetente de lucha antitumoral similar a cohorte sana. [Tabla 28.](#)



		SLE y SLED		SG	
		>Media	<Media	>Media	<Media
Leucocitos	C6	4400 (1232-6875)	7225 (5115-8150)	4700 (1270-6650)	7490 (6830-8400)
	Cohorte sana	6825 (5700-7480)			
Neutrófilos	C6	6630 (5475-7740)	4985 (3205-5970)	6070 (5310-7560)	5830 (4980-6330)
	Cohorte sana	3625 (3180-3860)			
Linfocitos	C6	560 (259-740)	142 (106-274)	425 (245-695)	142 (112-368)
	Cohorte sana	2090 (1740-2410)			
Monocitos	C6	310 (205-350)	620 (445-865)	310 (240-515)	380 (109-770)
	Cohorte sana	530 (440-570)			
Linfocitos T	C6	500 (386-664)	806 (691-1045)	517 (386-691)	1008 (472-1546)
	Cohorte sana	1610 (1245-1709)			
Linfocitos B	C6	24 (10-46)	36 (26-69)	34 (17-46)	28 (17-78)
	Cohorte sana	199 (175-263)			
Linfocitos NK	C6	120 (85-168)	180 (109-233)	136 (94-189)	144 (34-205)
	Cohorte sana	246 (170-286)			
Linfocitos T CD4	C6	274 (180-366)	431 (339-695)	296 (230-382)	494 (271-707)
	Cohorte sana	968 (824-1138)			
Linfocitos T CD8	C6	191 (128-276)	327 (232-389)	255 (183-336)	336 (171-487)
	Cohorte sana	467 (446-503)			
Linfocitos Treg	C6	43 (28-69)	108 (76-135)	48 (21-83)	127 (116-143)
	Cohorte sana	65 (49-83)			

	SLE y SLED > media	SG > media
Leucocitos totales	0.01	0.03
Neutrófilos	<0.001	<0.001
Linfocitos totales	<0.001	<0.001
Monocitos	0.043	<b>0.734</b>
Linfocitos T	<0.001	<0.001
Linfocitos B	<0.001	<0.001
Linfocitos NK	0.063	<b>0.055</b>
Linfocitos T CD4	<0.001	<0.001
Linfocitos T CD8	<0.001	<0.001
Linfocitos Treg	<b>0.209</b>	<b>0.183</b>

Tabla 28. Comparativa de los valores basales (medianas e IC 95%) de las poblaciones celulares (cels/ul) en sangre periférica de cohorte sana con los valores post-tratamiento (C6) de los pacientes con SLE/SLED y SG > media (izda) y valores p (dcha). C6, ciclo 6; SLE, supervivencia libre de enfermedad; SLED, supervivencia libre de enfermedad a distancia; SG, supervivencia global.

Ratio neut/linf	SLE y SLED > media	SG > media
Pacientes	5.83 (3.53-9.86)	9.86 (5.77-14.41)
Control	1.76 (1.36-2.14)	
Valor p	<0.001	<0.001

Ratio linf/mon	SLE y SLED > media	SG > media
Pacientes	3.43 (1.54-5.96)	3.94 (1.54-6.96)
Control	4.38 (3.71-4.95)	
Valor p	<0.001	0.001

Ratio CD4/CD8	SLE y SLED > media	SG > media
Pacientes	1.35 (0.91-2.00)	1.92 (1.11-2.35)
Control	2.15 (1.98-2.44)	
Valor p	0.002	0.071

Ratio CD8/Treg	SLE y SLED > media	SG > media
Pacientes	2.52 (2.07-3.20)	2.88 (2.18-4.54)
Control	5.13 (3.86-7.33)	
Valor p	<0.001	0.002

Tabla 29. Comparativa de los ratios basales de las poblaciones celulares en sangre periférica de cohorte sana con los valores post-tratamiento (C6) de los pacientes con SLE/SLED y SG > media y valores p. SLE, supervivencia libre de enfermedad; SLED, supervivencia libre de enfermedad a distancia; SG, supervivencia global.

#### 4.4.4 Correlación con estadio TNM al diagnóstico.

Tablas 30 y 31, Figuras 33 y 34.

Se objetivan mayores niveles basales estadísticamente significativos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos B y linfocitos NK en estadio II vs estadio III al diagnóstico. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en el resto de poblaciones celulares estudiadas ni en los valores post-tratamiento.

Los niveles basales de **leucocitos totales** son 9680 (IC 95% 8460-12000) vs 7220 (IC 95% 6030-9100) cels/ul en estadio II vs III, respectivamente (p = 0.017).



Los niveles basales de **neutrófilos** son 8115 (IC 95% 6295-10505) vs 5310 (IC 95% 4060-7450) cels/ul en estadio II vs III, respectivamente (p = 0.03).

Los niveles basales de **linfocitos B** son 189 (IC 95% 137-243) vs 134 (IC 95% 119-161) cels/ul en estadio II vs III, respectivamente (p = 0.047).

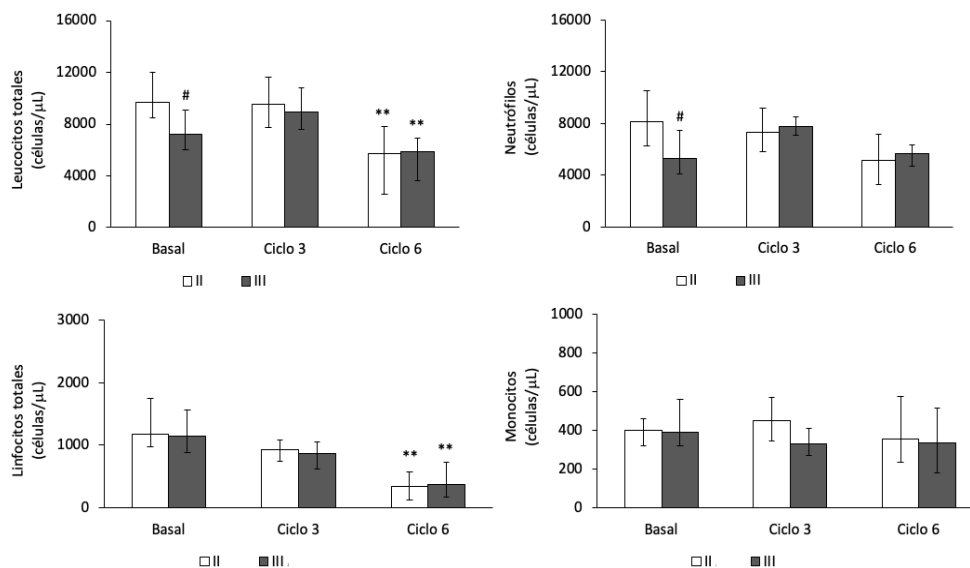
Los niveles basales de **linfocitos NK** son 250 (IC 95% 184-298) vs 168 (IC 95% 143-201) cels/ul en estadio II vs III, respectivamente (p = 0.012). [Tabla 30, Figura 33.](#)

**El ratio de neutrófilos/linfocitos** aumenta ligeramente a lo largo del tratamiento en estadio III, sin diferencias estadísticamente significativas.

**El ratio linfocitos/monocitos** disminuye a lo largo del tratamiento independientemente del estadio.

**El ratio CD4/CD8** disminuye a lo largo del tratamiento en estadio III, mientras se mantiene constante en estadio II. El ratio en estadio III fue 1.63 (IC 95% 1.34-2.09) en basal vs 0.91 (IC 95% 0.64-1.56) en C6, p= 0.019. El ratio CD4/CD8 en C6 es menor en estadio III 0.91 (IC 95% 0.64-1.56) vs estadio II 1.62 (IC 95% 1.49-2.15), p = 0.002.

**El ratio CD8/Treg** aumenta ligeramente en estadio II, mientras se mantiene constante en estadio III. El ratio en estadio II fue 2.33 (IC 95% 1.71-3.67) en basal vs 2.42 (IC 95% 1.71-4.18) en C6, p = 0.023. [Tabla 31, Figura 33.](#)





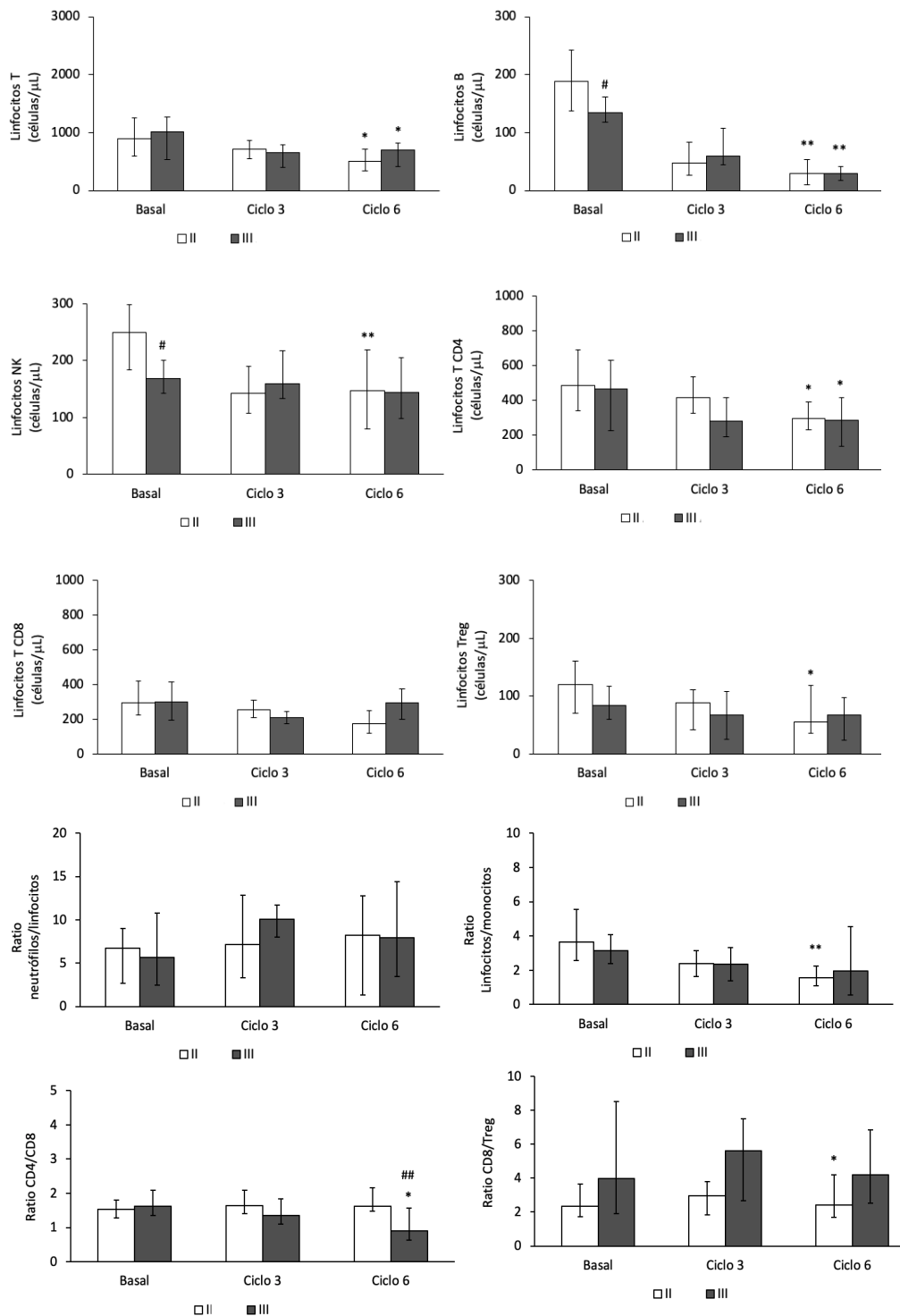


Figura 33. Niveles de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según estadio pre-QTNA. \* y \*\*,  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ , respectivamente,



comparativa con basal. # y ##,  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ , comparativa con estadio II. Se han empleado diferentes escalas.

En tejido, es mayor el porcentaje de pacientes con grado 3 de T CD8+ en estadio III (38.6%) vs estadio II (21.4%) pre-QTNA. Estos porcentajes se igualan post-QTNA, independientemente del estadio TNM pre-QTNA.

Un 7% de pacientes expresan grado 3 de linfocitos FOXP3+ en tejido pre-tratamiento en estadio II vs 0% en estadio III, sin embargo, ningún paciente tiene grado 3 post-tratamiento independientemente del estadio TNM al diagnóstico. [Tabla 30](#), [Figura 34](#).

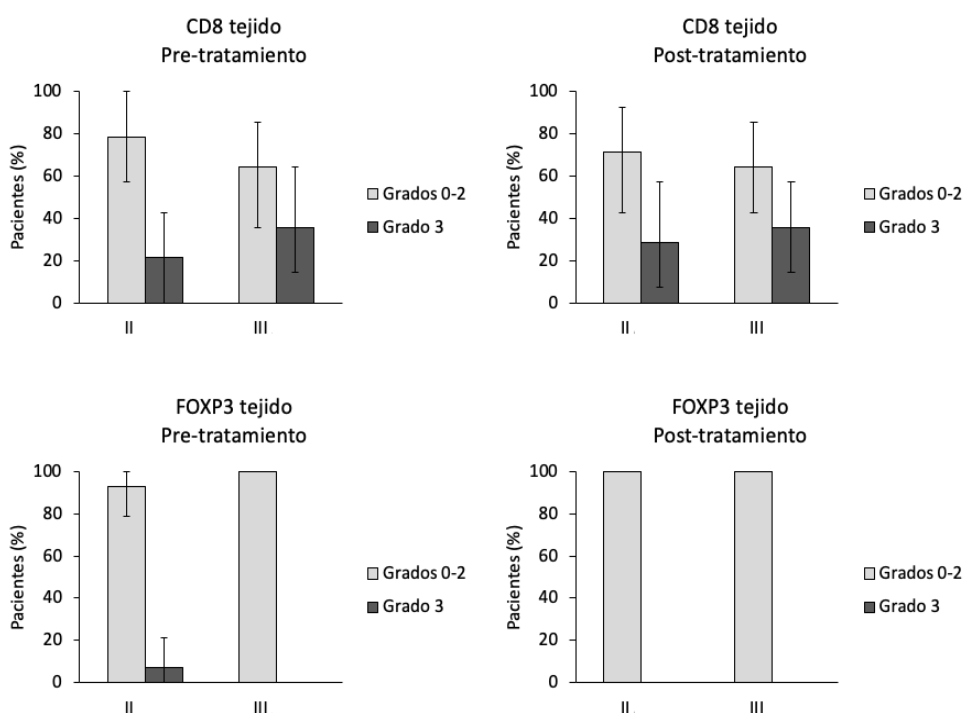


Figura 34. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según estadio TNM pre-QTNA.



		TNM	
		II	III
Leucocitos totales	Basal	9680 (8460-12000)	7220 (6030-9100)
	C3	9500 (7705-11625)	8900 (7600-10000)
	C6	5740 (2568-7826)	5850 (3651-7400)
Neutrófilos	Basal	8115 (6295-10505)	5310 (4060-7450)
	C3	7300 (5840-9160)	7785 (7070-8510)
	C6	5130 (3305-7130)	5633 (4665-6350)
Linfocitos totales	Basal	1170 (980-1750)	1145 (880-1570)
	C3	930 (740-1090)	870 (615-1050)
	C6	340 (123-575)	380 (172-730)
Monocitos	Basal	400 (320-460)	390 (320-560)
	C3	450 (345-570)	330 (270-410)
	C6	355 (235-575)	335 (180-515)
Linfocitos T	Basal	890 (600-1249)	1011 (528-1125)
	C3	711 (545-865)	655 (403-786)
	C6	509 (337-710)	691 (410-816)
Linfocitos B	Basal	189 (137-243)	134 (119-161)
	C3	48 (27-83)	60 (44-108)
	C6	30 (19-53)	29 (17-42)
Linfocitos NK	Basal	250 (184-298)	168 (143-201)
	C3	143 (108-190)	160 (122-218)
	C6	147 (80-220)	144 (101-182)
Linfocitos T CD4	Basal	485 (339-691)	467 (228-633)
	C3	414 (328-536)	282 (191-418)
	C6	296 (230-390)	288 (137-414)
Linfocitos T CD8	Basal	295 (226-421)	300 (195-416)
	C3	254 (211-309)	208 (176-247)
	C6	176 (122-250)	294 (199-377)
Linfocitos Treg	Basal	121 (70-161)	84 (60-117)
	C3	89 (42-111)	67 (25-108)
	C6	56 (36-118)	67 (24-97)

		TNM	
		II	III
CD8 tejido	Pre-Tto	Grados 0-2: 78.6 (57.1-100) Grado 3: 21.4 (0-42.9)	Grados 0-2: 65.4 (57.1-98.7) Grado 3: 38.6 (0-45.9)
	Post-Tto	Grados 0-2: 71.4 (42.9-92.9) Grado 3: 28.6 (7.1-57.1)	Grados 0-2: 68.2 (42.9-82.9) Grado 3: 35.6 (7.1-87.1)
FOXP3 tejido	Pre-Tto	Grados 0-2: 92.9 (78.6-100) Grado 3: 7.1 (0-21.4)	Grados 0-2: 100 (no tiene IC porque supone todos los casos)
	Post-Tto	Grados 0-2: 100 (no tiene IC porque supone todos los casos)	Grados 0-2: 100 (no tiene IC porque supone todos los casos)

**Tabla 30.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica (derecha) y en tejido (izda) según estadio TNM pre-QTNA. Los valores de T CD8+ y FOXP3+ en tejido representa el porcentaje e IC 95% de pacientes con una determinada gradación (G) según sistema Ladoire (0-3). El resto de las poblaciones linfocitarias medidas en sangre periférica están representadas con valores de mediana (células/ul) e IC 95%. C3, ciclo 3; C6, ciclo 6.

		TNM	
		II	III
Ratio Neutrófilos /linfocitos	Basal	6.71 (2.68-9.01)	5.69 (2.49-10.77)
	C3	7.16 (3.31-12.85)	10.08 (8.03-11.70)
	C6	8.22 (1.34-12.77)	7.95 (3.45-14.41)
Ratio linfocitos/ monocitos	Basal	3.66 (2.57-5.55)	3.14 (2.38-4.10)
	C3	2.39 (1.63-3.16)	2.37 (1.36-3.32)
	C6	1.56 (1.10-2.24)	1.96 (0.55-4.55)
Ratio CD8/Treg	Basal	2.33 (1.72-3.67)	3.98 (1.91-8.50)
	C3	2.97 (1.82-3.78)	5.63 (2.66-7.50)
	C6	2.42 (1.71-4.18)	4.18 (2.53-6.84)
Ratio CD4/CD8	Basal	1.53 (1.28-1.80)	1.63 (1.34-2.09)
	C3	1.64 (1.41-2.10)	1.36 (1.10-1.83)
	C6	1.62 (1.49-2.15)	0.91 (0.64-1.56)

**Tabla 31.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares (ratios) medidas en sangre periférica según estadio TNM clínico. C3, ciclo 3; C6, ciclo 6.

#### 4.4.5 Correlación con el inmunofenotipo tumoral. Tablas 32-34, Figuras 35 y 36.

En el **inmunofenotipo luminal B** se observa una disminución estadísticamente significativa con el tratamiento de los valores de leucocitos (p = 0.005), neutrófilos (p = 0.05), monocitos (p = 0.012), linfocitos totales (p = 0.011), linfocitos T (p =



0.013), linfocitos B ( $p = 0.012$ ), linfocitos NK ( $p = 0.015$ ) y linfocitos T CD4+ ( $p = 0.035$ ). [Tabla 32](#), [Figura 35](#).

En el **inmunofenotipo luminal HER2+** se observa una disminución estadísticamente significativa con el tratamiento de los valores de linfocitos totales ( $p = 0.018$ ), linfocitos B ( $p = 0.012$ ) y linfocitos NK ( $p = 0.018$ ). [Tabla 32](#), [Figura 35](#).

También se observan diferencias estadísticamente significativas de los valores en C3 y en C6 de los **linfocitos B entre diferentes inmunofenotipos**: [Tabla 32](#), [Figura 35](#).

Mayores niveles en C6 en **luminal HER2+** vs luminal A ( $p = 0.001$ )  
Mayores niveles en C6 en luminal HER2+ vs luminal B ( $p = 0.003$ )  
Mayores niveles en C6 en luminal HER2+ vs triple negativo ( $p = 0.044$ )

Mayores niveles en C6 en **HER2+ puro** vs luminal A ( $p = 0.01$ )  
Mayores niveles en C6 en HER2+ puro vs luminal B ( $p = 0.007$ )  
Mayores niveles en C6 en HER2+ puro vs triple negativo ( $p = 0.035$ )

En el análisis de ratios de las poblaciones celulares, se observa: [Tabla 33](#), [Figura 35](#).

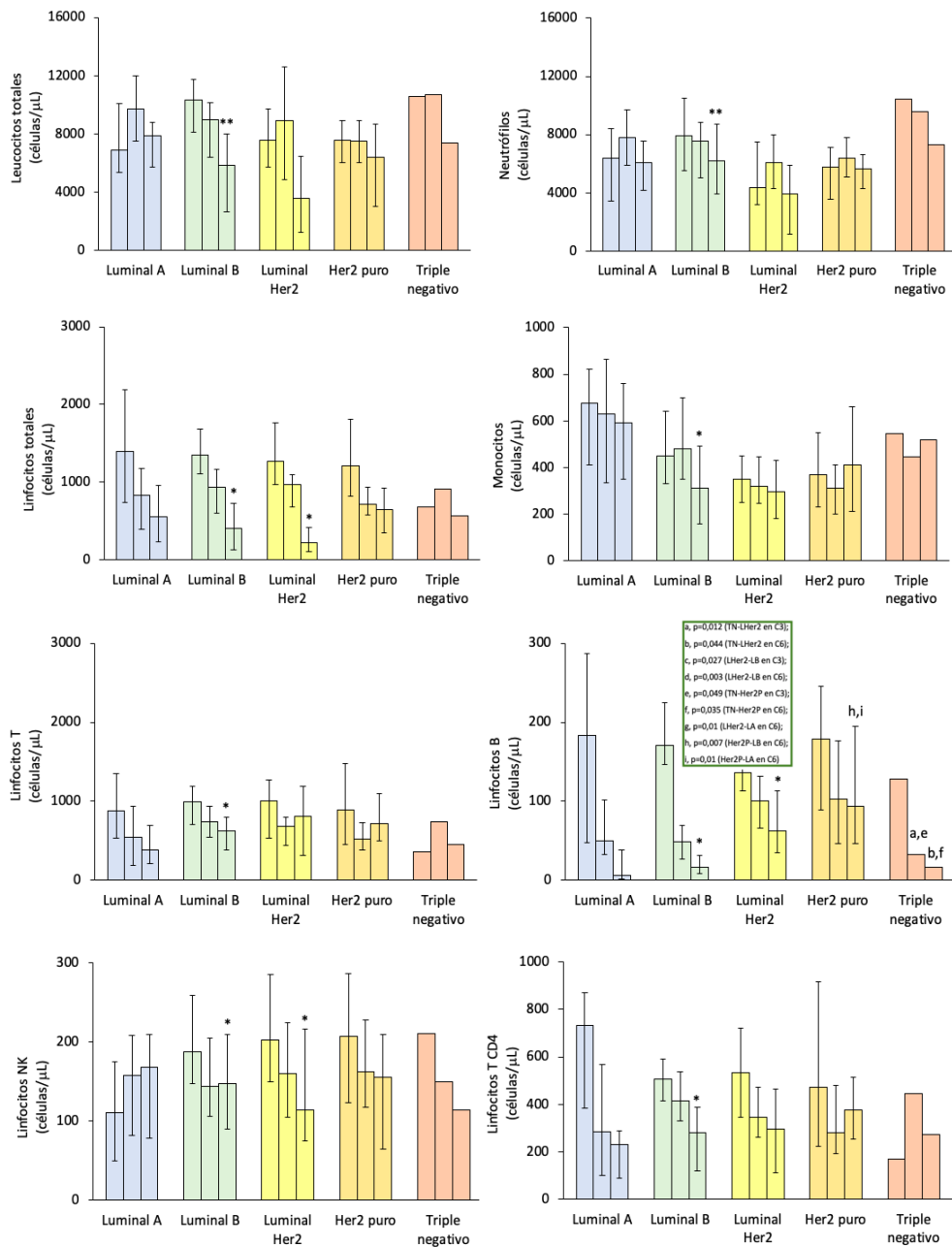
**El ratio neutrófilos/linfocitos** es mayor en el triple negativo respecto al resto de inmunofenotipos, sin significación estadística.

**El ratio linfocitos/monocitos** en C6 es mayor en luminal HER2+ vs luminal A ( $p = 0.01$ ).

**El ratio linfocitos/monocitos** en C6 es mayor en luminal HER2+ vs luminal B ( $p = 0.011$ ).

**El ratio linfocitos/monocitos** en C6 es mayor en HER2+ puro vs luminal A ( $p = 0.029$ ). [Tabla 33](#), [Figura 35](#).





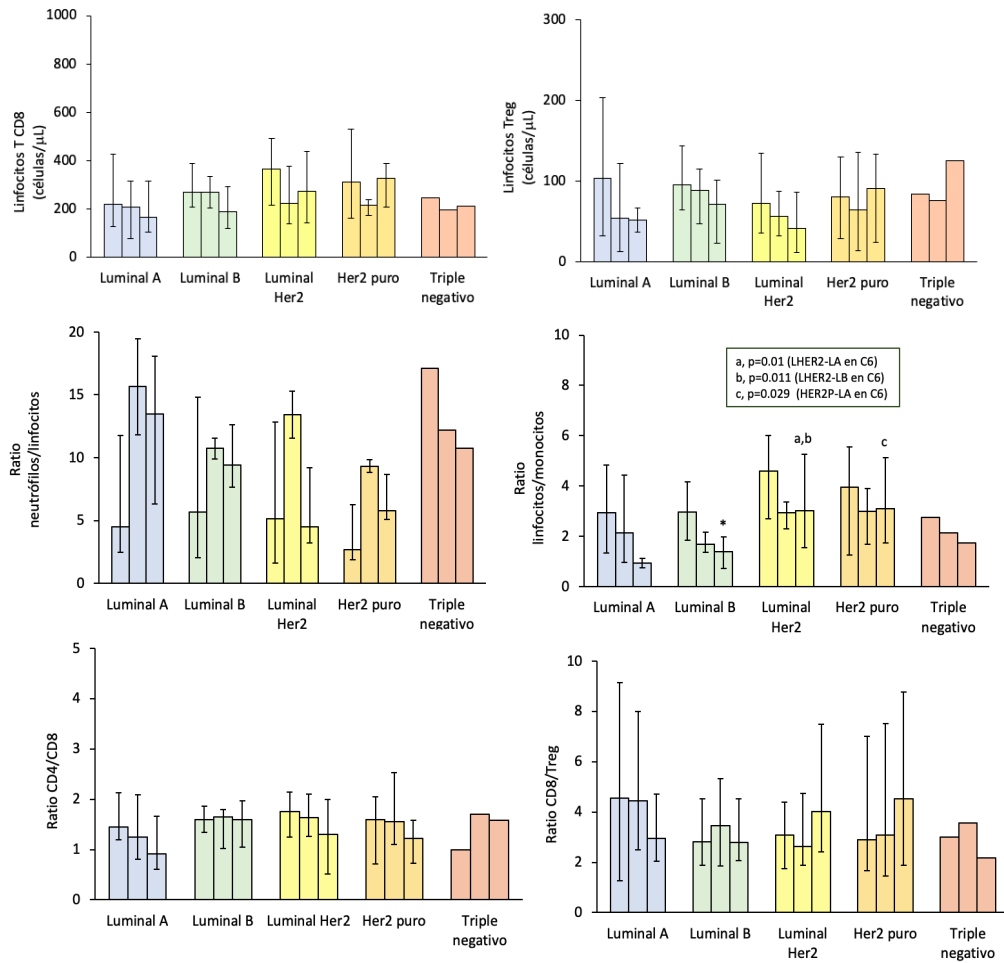


Figura 35. Niveles de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ $\mu$ L) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según inmunofenotipo. \* y \*\*,  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ , respectivamente, comparativa con basal. *Se han empleado diferentes escalas.*

En tejido, observamos un mayor porcentaje de pacientes HER2+ puro con grado 3 de linfocitos T CD8+ pre-tratamiento respecto al resto de inmunofenotipos, manteniéndose similar esa proporción post-tratamiento a excepción del triple negativo donde el 100% de los pacientes tienen grado 2 y el 0% tienen grado 3. [Tabla 34](#), [Figura 36](#).

En los niveles pre-tratamiento de FOXP3+ encontramos que el luminal A y el triple negativo tienen un 0% de pacientes con grado 3, no ocurriendo lo mismo en el resto de fenotipos. En los niveles post-tratamiento de FOXP3+ se observa que el 100% de los pacientes tienen grado 2 independientemente del inmunofenotipo. [Tabla 34](#), [Figura 36](#).



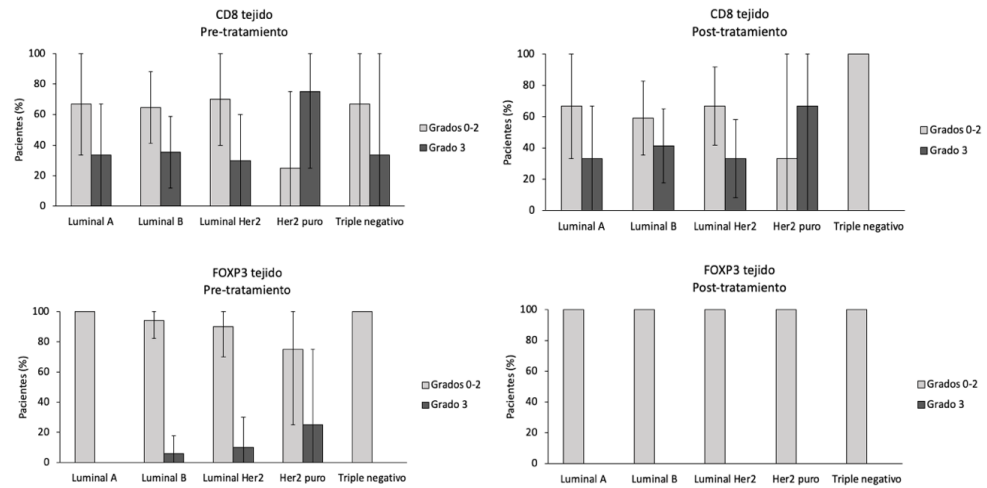


Figura 36. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según inmunofenotipo.

		FENOTIPO				
		Luminal A	Luminal B	Luminal Her2	Her2 puro	Triple negativo
Leucocitos totales	Basal	6900 (5360-10080)	10340 (8100-11750)	7570 (5700-9720)	7580 (6030-8950)	10550
	C3	9710 (7500-12000)	9000 (6380-10130)	8890 (4900-12590)	7525 (6050-8900)	10685
	C6	7900 (5700-8810)	5840 (2642-8020)	3610 (1225-6460)	6400 (3012-8650)	7360
Neutrófilos	Basal	6405 (3430-8410)	7890 (5555-10505)	4370 (3180-7520)	5780 (3570-7150)	10430
	C3	7790 (5910-9670)	7530 (5040-8840)	6070 (4290-7975)	6360 (5110-7780)	9560
	C6	6070 (4160-7560)	6210 (3910-8710)	3925 (1201-5870)	5620 (4310-6660)	7330
Linfocitos totales	Basal	1390 (740-2190)	1346 (1105-1685)	1270 (970-1760)	1210 (820-1810)	683
	C3	830 (390-1180)	930 (600-1160)	970 (680-1095)	715 (580-930)	915
	C6	560 (230-960)	405 (130-730)	224 (112-420)	650 (350-920)	570
Monocitos	Basal	675 (405-706)	450 (330-640)	350 (250-450)	370 (230-550)	545
	C3	630 (335-865)	480 (350-700)	320 (245-445)	310 (200-410)	445
	C6	590 (350-760)	310 (159-490)	295 (180-430)	410 (210-660)	520
Linfocitos T	Basal	884 (539-1351)	999 (712-1194)	1003 (528-1267)	887 (451-1480)	358
	C3	540 (183-932)	742 (545-942)	678 (446-798)	525 (383-732)	746
	C6	386 (209-691)	624 (388-800)	806 (319-1192)	718 (500-1095)	456
Linfocitos B	Basal	184 (48-287)	171 (146-225)	135 (114-141)	179 (89-246)	128
	C3	50 (33-102)	49 (27-70)	101 (66-132)	103 (46-177)	33
	C6	6 (2-38)	17 (8-31)	63 (35-113)	94 (46-195)	17
Linfocitos NK	Basal	111 (50-175)	188 (147-259)	203 (150-285)	207(123-287)	211
	C3	158 (82-209)	144 (106-205)	161 (105-225)	162 (118-228)	150
	C6	168 (78-210)	147 (90-210)	114 (75-216)	156 (65-210)	114
Linfocitos T CD4	Basal	733 (385-869)	508 (414-591)	534 (345-721)	473 (222-917)	169
	C3	282 (100-566)	416 (328-536)	347 (262-471)	281 (191-479)	444
	C6	230 (87-288)	280 (120-386)	296 (111-464)	376 (254-515)	271
Linfocitos T CD8	Basal	222 (128-427)	270 (208-390)	365 (215-493)	312 (164-530)	249
	C3	208 (77-316)	269 (205-334)	225 (139-377)	216 (174-239)	197
	C6	168 (106-317)	191 (122-294)	276 (144-439)	327 (208-390)	211
Linfocitos Treg	Basal	104 (32-204)	96 (64-144)	73 (35-135)	81 (29-130)	84
	C3	54 (13-122)	89 (47-115)	56 (32-88)	65 (14-136)	76
	C6	52 (37-67)	71 (23-101)	42 (11-86)	91 (24-134)	125



Tabla 32. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica según inmunofenotipo. *Las poblaciones linfocitarias medidas en sangre periférica están representadas con valores de mediana (células/ul) e IC 95%. C3, ciclo 3; C6, ciclo 6.*

		FENOTIPO				
		Luminal A	Luminal B	Luminal Her2	Her2 puro	Triple negativo
Ratio Neutrófilos /linfocitos	Basal	4.53 (2.46-11.77)	5.69 (2.06-14.84)	5.12 (1.65-12.83)	2.71 (1.89-6.25)	17.13
	C3	15.65 (11.82-19.48)	10.74 (9.90-11.58)	13.42 (11.57-15.27)	9.34 (8.81-9.86)	12.19
	C6	13.50 (6.32-18.09)	9.43 (7.67-12.63)	4.50 (3.21-9.19)	5.77 (5.11-8.65)	10.73
Ratio linfocitos/ monocitos	Basal	2.94 (1.34-4.83)	2.98 (1.86-4.18)	4.60 (2.69-6.00)	3.96 (1.26-5.56)	2.75
	C3	2.15 (0.97-4.45)	1.68 (1.36-2.17)	2.94 (2.29-3.36)	3.00 (1.68-3.91)	2.15
	C6	0.94 (0.74-1.12)	1.38 (0.74-1.98)	3.01 (1.56-5.25)	3.10 (1.74-5.13)	1.74
Ratio CD8/Treg	Basal	4.54 (1.26-9.14)	2.82 (1.88-4.52)	4.45 (2.42-7.21)	2.90 (1.67-7.00)	3.01
	C3	4.43 (2.49-8.00)	3.46 (1.85-5.33)	2.62 (1.87-4.73)	3.07 (1.44-7.50)	3.57
	C6	2.94 (2.04-4.71)	2.79 (2.07-4.54)	4.02 (2.40-7.49)	4.52 (1.87-8.77)	2.18
Ratio CD4/CD8	Basal	1.45 (1.19-2.13)	1.59 (1.34-1.87)	1.75 (1.25-2.14)	1.60 (0.71-2.05)	1.00
	C3	1.25 (0.81-2.09)	1.64 (1.03-1.80)	1.64 (1.27-2.10)	1.56 (1.10-2.53)	1.70
	C6	0.91 (0.61-1.66)	1.59 (1.05-1.97)	1.30 (0.52-2.00)	1.22 (0.73-1.58)	1.59

Tabla 33. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares (ratios) medidas en sangre periférica según inmunofenotipo. *C3, ciclo 3; C6, ciclo 6.*

		FENOTIPO				
		Luminal A	Luminal B	Luminal Her2	Her2 puro	Triple negativo
CD8 tejido	Pre-Tto	Grados 0-2: 66.7 (33.3-100) Grado 3: 33.3 (0-66.7)	Grados 0-2: 64.7 (41.2-88.2) Grado 3: 35.3 (11.8-58.8)	Grados 0-2: 70 (40-100) Grado 3: 30 (0-60)	Grados 0-2: 25 (0-75) Grado 3: 75 (25-100)	Grados 0-2: 66.7 (0-100) Grado 3: 33.3 (0-100)
	Post-Tto	Grados 0-2: 66.7 (33.3-100) Grado 3: 33.3 (0-66.7)	Grados 0-2: 58.8 (35.3-82.4) Grado 3: 41.2 (16.7-64.7)	Grados 0-2: 66.7 (41.7-91.7) Grado 3: 33.3 (8.3-58.3)	Grados 0-2: 33.3 (0-100) Grado 3: 66.7 (0-100)	100 (no tiene IC porque supone todos los casos)
FOX3 tejido	Pre-Tto	Grados 0-2: 100 (no tiene IC porque supone todos los casos)	Grados 0-2: 94.1 (82.4-100) Grado 3: 5.9 (0-17.6)	Grados 0-2: 90 (70-100) Grado 3: 10 (0-30)	Grados 0-2: 75 (25-100) Grado 3: 25 (0-75)	Grados 0-2: 100 (no tiene IC porque supone todos los casos)
	Post-Tto	Grados 0-2: 100 (no tiene IC porque supone todos los casos)	Grados 0-2: 100 (no tiene IC porque supone todos los casos)	Grados 0-2: 100 (no tiene IC porque supone todos los casos)	Grados 0-2: 100 (no tiene IC porque supone todos los casos)	Grados 0-2: 100 (no tiene IC porque supone todos los casos)





Tabla 34. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en tejido según inmunofenotipo. *Los valores de T CD8+ y FOXP3+ en tejido representa el porcentaje e IC 95% de pacientes con una determinada gradación (G) según sistema Ladoire (0-3).*

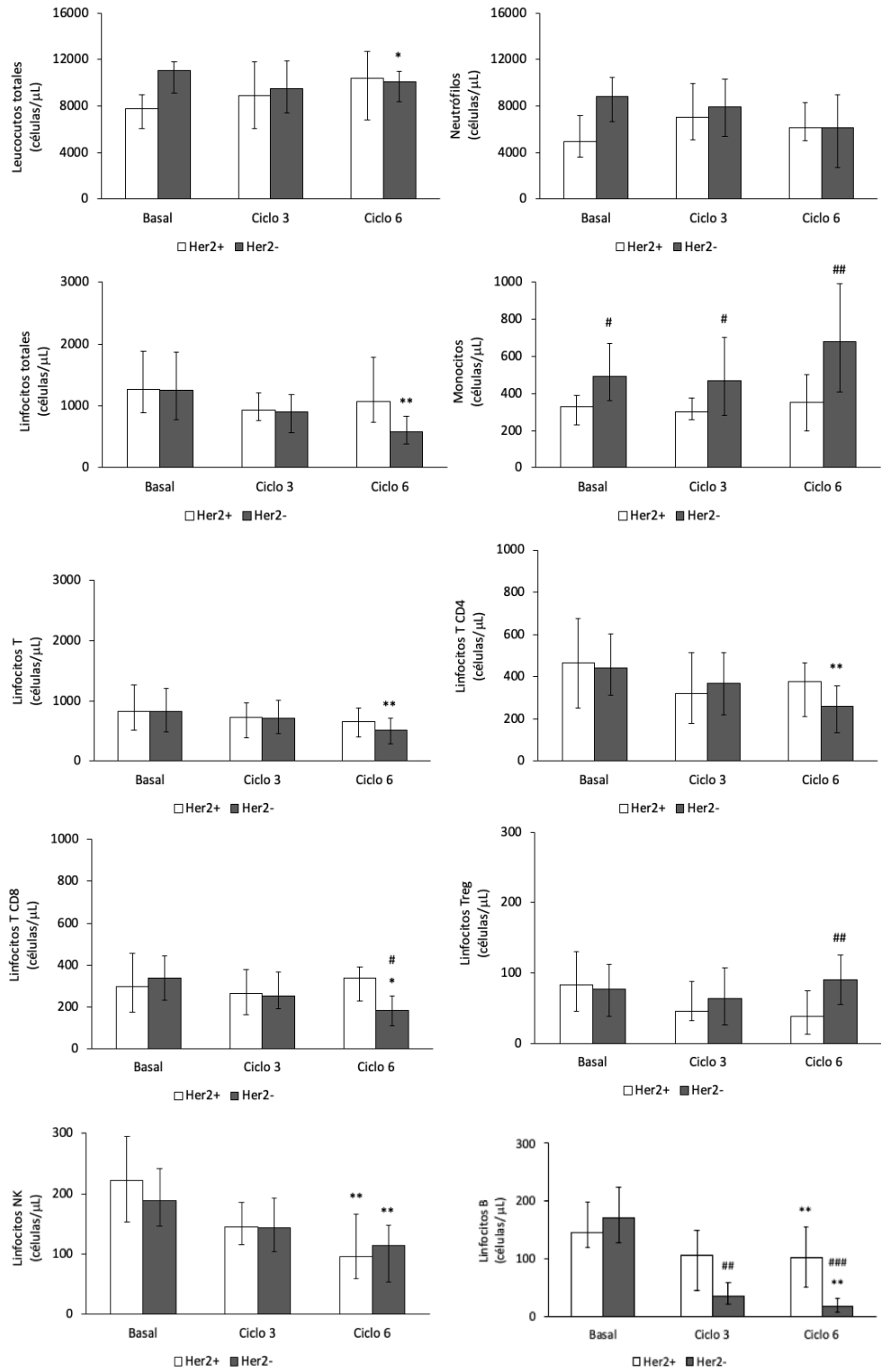
**-Según expresión de HER2. Tablas 35 y 36, Figuras 37 y 38.**

Se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles en sangre en C6 respecto a basales de leucocitos ( $p = 0.023$ ), linfocitos ( $p = 0.002$ ), linfocitos T ( $p = 0.006$ ), linfocitos T CD4+ ( $p = 0.008$ ), linfocitos T CD8+ ( $p = 0.015$ ), NK ( $p = 0.003$ ) y linfocitos B ( $p = 0.002$ ) en pacientes **sin sobreexpresión de HER2**. Sin embargo, en los pacientes **con sobreexpresión de HER2**, solo se produce un descenso estadísticamente significativo tras tratamiento de los niveles de linfocitos NK ( $p = 0.005$ ) y de linfocitos B ( $p = 0.003$ ). [Tabla 35, Figura 37.](#)

Además, hay diferencias estadísticamente significativas de los **niveles** en sangre **en C6** de monocitos ( $p = 0.002$ ), linfocitos T CD8+ ( $p = 0.045$ ), Treg ( $p = 0.006$ ) y linfocitos B ( $p < 0.001$ ) **entre los pacientes HER2+ y HER2-**. Así los niveles de monocitos y Treg son más elevados en HER2- vs HER2+, mientras que los niveles de linfocitos T CD8+ y linfocitos B son más elevados en HER2+ vs HER2-. [Tabla 35, Figura 37.](#)

**El ratio linfocitos/monocitos** disminuye a lo largo del tratamiento en HER2-, con significación estadística. El ratio en HER2- fue 2.53 (IC 95% 1.71-4.04) en basal vs 1.68 (IC 95% 1.35-2.39) en C6,  $p = 0.003$ . El ratio en C6 es menor en HER2- 1.68 (IC 95% 1.35-2.39) vs HER2+ 3.18 (IC 95% 1.75-4.96),  $p = 0.001$ . [Tabla 36, Figura 37.](#)





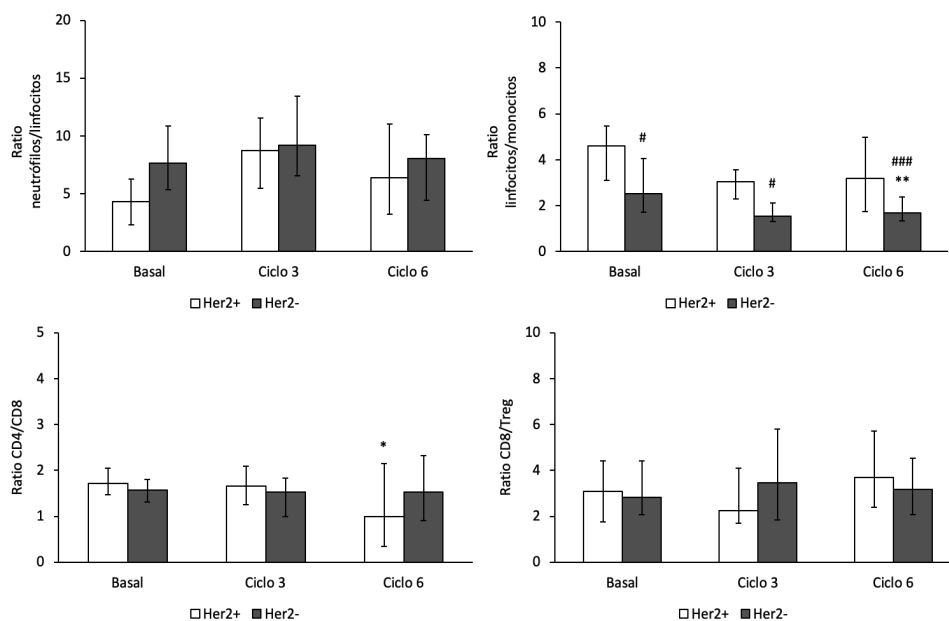


Figura 37. Niveles de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según expresión HER2. \* y \*\*,  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ , respectivamente, comparativa con basal. #, ## y ###,  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ , comparativa con HER2+. Se han empleado diferentes escalas.

En el análisis de las poblaciones celulares en tejido, observamos que no hay modificación pre y post-tratamiento del porcentaje de pacientes con grado 0-2-3 de linfocitos T CD8+, independientemente de la sobreexpresión de HER2.

El porcentaje de pacientes con grado 3 de linfocitos FOXP3+ en tejido pre-tratamiento es mayor en aquellos HER2+. Sin embargo, tras tratamiento, el 100% de los pacientes tienen grado 2 de linfocitos FOXP3+, independientemente de la expresión de HER2. [Tabla 35](#), [Figura 38](#).



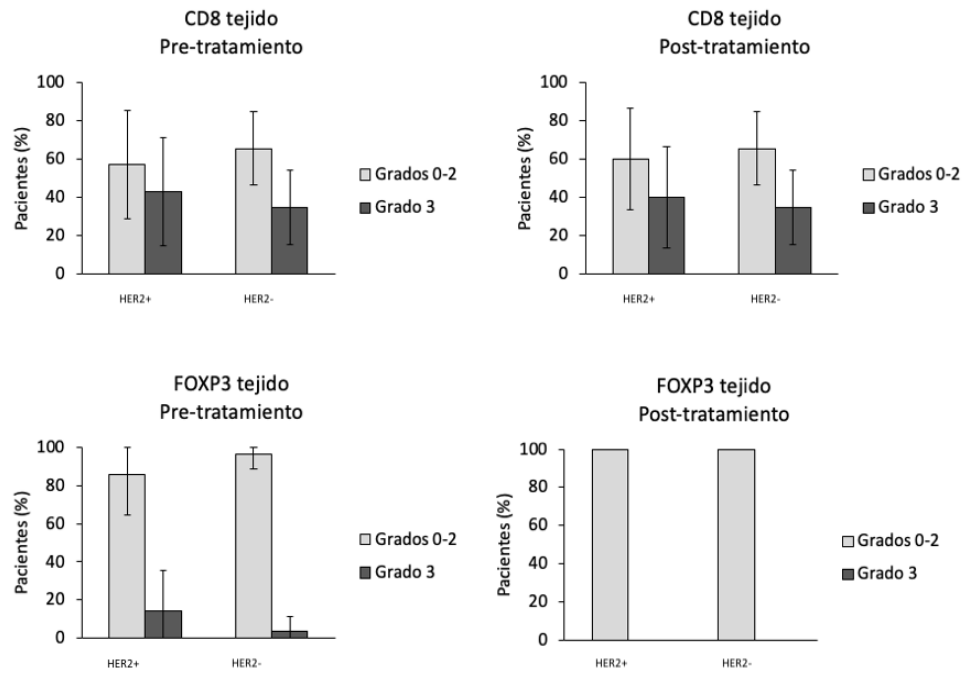


Figura 38. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según expresión HER2.



		Her2+	Her2-
Leucocitos totales	Basal	7780 (6030-8950)	11100 (9100-11800)
	C3	8900 (6050-11800)	9500 (7400-11870)
	C6	10420 (6830-12700)	10100 (8400-11020)
Neutrófilos	Basal	4925 (3570-7150)	8850 (6640-10430)
	C3	7050 (5110-9960)	7910 (5400-10290)
	C6	6125 (4980-8320)	6165 (2700-9010)
Linfocitos totales	Basal	1270 (890-1889)	1250 (770-1873)
	C3	930 (755-1209)	900 (570-1178)
	C6	1065 (740-1780)	580 (380-830)
Monocitos	Basal	330 (230-390)	490 (360-670)
	C3	300 (260-374)	470 (280-700)
	C6	350 (200-500)	680 (410-990)
Linfocitos T	Basal	828 (510-1267)	861 (647-1119)
	C3	722 (383-960)	711 (462-1015)
	C6	658 (499-882)	517 (288-710)
Linfocitos B	Basal	146 (121-199)	170 (128-225)
	C3	107 (46-149)	36 (21-60)
	C6	101 (52-155)	17 (8-31)
Linfocitos NK	Basal	222 (176-294)	188 (147-242)
	C3	145 (115-186)	144 (104-193)
	C6	95 (59-165)	114 (54-147)
Linfocitos T CD4	Basal	466 (254-675)	441 (311-601)
	C3	319 (178-513)	368 (219-514)
	C6	378 (211-464)	260 (137-357)
Linfocitos T CD8	Basal	298 (243-408)	336 (230-442)
	C3	263 (164-377)	252 (189-368)
	C6	336 (226-390)	183 (108-250)
Linfocitos Treg	Basal	83 (46-130)	77 (39-112)
	C3	46 (32-88)	64 (26-107)
	C6	38 (13-75)	90 (56-125)
CD8 tejido	Antes	Grados 0-2: 57.1 (28.6-85.7) Grado 3: 42.9 (14.3-71.4)	Grados 0-2: 65.4 (46.2-84.6) Grado 3: 34.6 (15.4-53.8)
	Después	Grados 0-2: 60 (33.3-86.7) Grado 3: 40 (13.3-66.7)	Grados 0-2: 65.4 (46.2-84.6) Grado 3: 34.6 (15.4-53.8)
FOXP3 tejido	Antes	Grados 0-2: 85.7 (64.3-100) Grado 3: 14.3 (0-35.7)	Grados 0-2: 96.2 (88.5-100) Grado 3: 3.8 (0-11.5)
	Después	Grados 0-2: 100 (No tiene IC porque representan todos los casos)	Grados 0-2: 100 (No tiene IC porque representan todos los casos)

Tabla 35. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica y en tejido según expresión HER2. Los valores de T CD8+ y FOXP3+ en tejido representa el porcentaje e IC 95% de pacientes con una determinada gradación (G) según sistema Ladoire (0-3). El resto de las poblaciones linfocitarias medidas en sangre periférica están representadas con valores de mediana (células/ul) e IC 95%. C3, ciclo 3; C6, ciclo 6.

		Her2+	Her2-
Ratio Neutrófilos /linfocitos	Basal	4.34 (2.30-6.25)	7.67 (5.34-10.84)
	C3	8.73 (5.49-11.57)	9.20 (6.55-13.47)
	C6	6.37 (3.21-11.05)	8.05 (4.45-10.13)
Ratio linfocitos/ monocitos	Basal	4.60 (3.11-5.46)	2.53 (1.71-4.04)
	C3	3.03 (2.29-3.56)	1.54 (1.30-2.12)
	C6	3.18 (1.75-4.96)	1.68 (1.35-2.39)
Ratio CD8/Treg	Basal	3.09 (1.75-4.40)	2.82 (2.07-4.40)
	C3	2.23 (1.70-4.11)	3.46 (1.85-5.79)
	C6	3.70 (2.40-5.71)	3.17 (2.07-4.54)
Ratio CD4/CD8	Basal	1.72 (1.47-2.05)	1.57 (1.31-1.80)
	C3	1.65 (1.25-2.10)	1.53 (1.00-1.83)
	C6	0.99 (0.34-2.15)	1.52 (0.91-2.32)



Tabla 36. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares (ratio) medidas en sangre periférica según expresión HER2. C3, ciclo 3; C6, ciclo 6.

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7

## 5. DISCUSIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



## 5.1 RESPUESTA COMPLETA PATOLÓGICA.

La tasa de respuesta completa patológica (RCp) fue similar en ambos sistemas de evaluación empleados (sistema de Miller & Payne y sistema TNM patológico) y similares a los encontrados en la bibliografía<sup>26</sup>.

En el sistema de Miller & Payne (M&P), 11 (21%) pacientes alcanzaron RCp en mama (G5), 15 (32%) a nivel ganglionar (D) y 7 (15%) pacientes alcanzaron RCp global (mama y ganglios) (G5D). Mientras que en el estadio TNM patológico, 12 (26%) pacientes alcanzaron RCp en mama (ypT0/Tis), 19 (39%) a nivel ganglionar (ypN0) y 7 (15%) pacientes alcanzaron RCp global (mama y ganglios) (ypT0/Tis ypN0).

El sistema de Miller & Payne<sup>61</sup> se basa en la reducción de la celularidad del tumor primario post-neoadyuvancia, mientras que el sistema TNM patológico (8ª edición AJCC)<sup>18</sup> considera el tamaño y la presencia o no de tumor residual por evaluación histopatológica del tumor (T) y de los ganglios (N). Además, en este estudio se ha empleado el sistema de Miller & Payne modificado al incluir la propuesta de evaluación ganglionar de Kuroi et al.<sup>69</sup> con una valoración de A-D según los ganglios sean negativos o positivos y según ese estado sea atribuible o no al tratamiento neoadyuvante.

No hay referencias en la literatura que comparen la variabilidad entre estos dos sistemas de evaluación (M&P y TNM) post-neoadyuvancia. Sin embargo, sí que encontramos referencia con el autor Tesserra et al.<sup>70</sup> que compara la variabilidad entre el sistema de evaluación de M&P<sup>61</sup> y el sistema de Symmans et al. (carga tumoral residual, RCB)<sup>62</sup>, observándose una buena correlación entre ambos sistemas, pero con alguna discrepancia menor debido a la inclusión del estado ganglionar en el sistema RCB y no en el de M&P. En nuestro trabajo, al emplear el sistema de M&P modificado que incorpora el estado ganglionar según la propuesta de Kuroi et al.<sup>69</sup>, encontramos resultados similares en tasas de RCp entre ambos sistemas utilizados (M&P y TNM). En el año 2015, Provenzano et al.<sup>71</sup> en colaboración con el Breast International Group-North American Breast Cancer Group (BIG-NABCG) intenta la estandarización del método para medir la respuesta patológica tras la neoadyuvancia. Este comité concluye que la evaluación de la enfermedad residual en la pieza quirúrgica post-neoadyuvancia debería incluir la presencia o ausencia de enfermedad residual invasiva/in situ, el estado de los ganglios linfáticos regionales, así como la celularidad y las dimensiones finales del tumor residual, entre otros factores. Además, se describe a la RCB, desarrollada por Symmans et al.<sup>62</sup>, como el método preferido para la cuantificación de enfermedad residual al ser más preciso y detallado por basarse en un cálculo matemático que incluye todos los factores previos (tamaño del lecho tumoral, porcentaje de celularidad y del tumor in situ, número de ganglios metastásicos...).





Pero actualmente, no hay todavía un método establecido como el estándar para la evaluación de la RCp.

El empleo de la terapia neoadyuvante cuando está indicado se considera "gold estandar" al conseguir altas tasas de respuesta clínicas (70%) y patológicas (30%), lo que da la oportunidad de detectar y estudiar marcadores subrogados con información pronóstica útil, así como permitir una mayor tasa de cirugías conservadoras sin detrimento en la mortalidad<sup>26</sup>. En nuestro estudio se objetiva un 49% de pacientes en estadio II y un 51% en estadio III antes del tratamiento neoadyuvante. Mientras que post-neoadyuvancia, disminuye claramente el estadio al 32% de los pacientes en estadio II, 13% estadio III y hasta un 56% son ypT0/TispN0cM0 ó estadio I.

## 5.2 SUPERVIVENCIA.

En nuestro trabajo, los datos de SLE, SLED y SG a 5 y a 9 años eran favorables como corresponde a estadio de enfermedad no metastásica<sup>21,22</sup>. Así, el 78.7% y el 72.3% de los pacientes estaban libres de recaída a los 5 y 9 años de seguimiento, respectivamente. Y el 87.2% y el 83.0% de los pacientes estaban vivos a los 5 y 9 años de seguimiento, respectivamente. Estos datos están en concordancia a trabajos como el de Mittendorf EA et al.<sup>21,22</sup> donde se baraja una probabilidad de supervivencia específica de enfermedad a los 5 años según estadio del II-III del 98%-79.5% a 5 años y similar a los 9 años.

### 5.2.1 Supervivencia según inmunofenotipo.

Perou et al.<sup>15,16</sup> identifica los diferentes subtipos moleculares de carcinoma de mama con una historia natural, un patrón de diseminación metastásica y una sensibilidad a tratamiento diferente. Sin embargo, dado que la caracterización molecular no es fácilmente accesible en todos los centros, nosotros hemos empleado una aproximación basada en la IHQ (expresión de RE, RP y HER2), el índice de proliferación celular (Ki-67) o la expresión de citoqueratinas para establecer los subtipos tumorales<sup>16,17</sup>.

En nuestro trabajo encontramos que la SLE, SLED y SG son mayores para las pacientes con sobreexpresión HER2 que han recibido terapia anti-HER2 (trastuzumab) respecto a las pacientes sin sobreexpresión HER2. En concreto, encontramos que la SLE/SLED es mayor para las pacientes con inmunofenotipo HER2 puro, seguido del luminal (A, B, HER2+) y posteriormente del triple negativo. Y la SG, es mayor para las pacientes con inmunofenotipo luminal HER2+, seguido del luminal A, HER2 puro, luminal B y posteriormente, del triple negativo.



La peor supervivencia encontrada en el subtipo triple negativo concuerda con los datos de la literatura<sup>15,16,19</sup>, dado que suele ser el subtipo con mayor tamaño al diagnóstico y más agresivo. El subtipo luminal, y en concreto el luminal A con un Ki67 menor, suelen ser los de mejor pronóstico dado que la expresión de receptores hormonales se asocia con mejores tasas de supervivencia<sup>19,23</sup>. Además, la positividad de RH indica la posibilidad de emplear hormonoterapia en el tratamiento<sup>38,39</sup>. Previo a la introducción de la terapia anti-HER2, la sobreexpresión de HER2 era un marcador de mal pronóstico tanto en tumores con ganglios afectos como no afectos, pero el empleo de la terapia diana anti-HER2 ha conseguido mejorar ese pronóstico, alcanzándose supervivencias similares al grupo HER2-/RH+<sup>40,43</sup>, lo que podría explicar los mejores datos de supervivencia en este subtipo en nuestro trabajo. De todas formas, el pequeño tamaño muestral según fenotipos tumorales, limita los resultados: sólo 4 pacientes HER2 puro y 4 pacientes triple negativo frente a 19 luminal B y 14 pacientes luminal HER2.

En cualquier caso, dada la peor supervivencia del subtipo triple negativo, es en este grupo donde con más insistencia hay que seguir buscando marcadores predictivos y pronósticos que sean potenciales dianas de tratamiento para mejorar su supervivencia como ocurrió con la terapia anti-HER2<sup>40,43</sup>.

## 5.2.2 Supervivencia según respuesta a QTNA.

La SLE y la SG son similares en los dos sistemas de valoración de la respuesta (Miller & Payne; TNM patológico). Así, la SLE y la SG a los 5 y a los 9 años de seguimiento es mayor en aquellos pacientes que alcanzan RCp respecto a los pacientes con no RCp:

La tasa de SLE a los 5 años es del 86% vs 76% para RCp vs no RCp (mama+ganglionar). La tasa de SG a los 5 años es del 100% vs 86% para RCp vs no RCp (mama+ganglionar). Ningún paciente con RCp falleció tras un seguimiento de 5 años.

La tasa de SLE a los 9 años es del 86% vs 68% para RCp vs no RCp (mama+ganglionar). La tasa de SG a los 9 años es del 100% vs 81% para RCp vs no RCp (mama+ganglionar).

De este modo, los datos de nuestro trabajo se relacionan con los datos de la literatura sobre el papel pronóstico de la RCp: Lograr una RCp tras la terapia neoadyuvante se asocia favorablemente con SLE y SG en el carcinoma de mama estadio temprano<sup>51-54,59</sup>. Así, la RCp es un destacado marcador subrogado con valor pronóstico, sobretudo en aquellos subtipos tumorales de mayor agresividad tumoral (triple negativo ó HER2+)<sup>32,54,60</sup>. Sin embargo, y aunque los tumores RH+ tienen



mejores tasas de supervivencia, debido en parte a la naturaleza intrínseca del subtipo y al uso de terapia hormonal en adyuvancia, aquellos que logran RCp también tienen mejores tasas de SG respecto a los tumores RH+ sin RCp (aunque sólo un bajo porcentaje de los pacientes con RH positivo logran RCp tras quimioterapia neoadyuvante)<sup>53,55</sup>. Nosotros no pudimos realizar el análisis de influencia de la RCp en la supervivencia dentro de cada subtipo tumoral dado el limitado tamaño muestral de nuestro estudio.

## 5.3 VITAMINA D.

### 5.3.1 Pacientes vs sanas.

La concentración sérica óptima de 25(OH)D es controvertida al no haber un acuerdo unánime entre los expertos, siendo el rango de común acuerdo el situado entre 30-40 ng/ml. Asimismo, mientras que niveles <20 ng/ml se consideran subóptimos para la salud ósea, la correcta concentración para la salud extraesquelética no ha sido establecida.

En nuestro trabajo, los niveles de vitamina D fueron 18.6 (IC 95% 16.0-22.6) vs 16.6 (IC 95% 14.7-21.3) ng/ml en pacientes vs sanas ( $p = 0.986$ ), siendo los dos valores similares entre ambos grupos independientemente de padecer o no patología oncológica. Ambos grupos presentaban insuficiencia de vitamina D según las guías del Instituto de Medicina (12-20 ng/ml)<sup>76</sup> y de la Sociedad de Endocrinología (12-30 ng/ml)<sup>77</sup>. Estos valores están en relación a los datos de la población mundial, donde las estadísticas reflejan que hasta el 88% de la población tiene concentraciones plasmáticas de 25(OH)D por debajo de 30ng/ml e incluso un 37% tiene valores <20ng/ml<sup>78</sup>. Si tenemos en cuenta que el 60% de nuestra muestra tiene una mediana de edad  $\geq 50$  años, se observa que los valores de 25(OH)D en ambos grupos está más en relación a la edad que a tener o no patología tumoral. Al aumentar la edad, los niveles de 25(OH)D por debajo de 20ng/ml pueden observarse hasta en un 80-90% de las personas<sup>79</sup>.

### 5.3.2 Correlación con el perfil inmunitario.

No se ha encontrado correlación, mediante el coeficiente de correlación de Spearman, entre los valores basales de vitamina D y los valores basales de las poblaciones celulares ni sus ratios ni en el grupo de sanas ni en el grupo de enfermas. Esto contrasta con la bibliografía, donde la vitamina D tiene un papel destacado sobre el sistema inmunitario<sup>91,92</sup> influyendo tanto en enfermedades autoinmunes/trasplante<sup>93,94</sup> como en cáncer<sup>95,96</sup>.

En un primer lugar, se esperaba encontrar mayores niveles de vitamina D (suficiencia) en el grupo de sanas respecto a enfermas, pero esto no ha ocurrido así tal y como se ha explicado en el apartado anterior. Además, nuestra hipótesis se



complementaba con que posiblemente, niveles elevados de vitamina D se correlacionarían con niveles elevados de poblaciones celulares anti-tumor (linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+ cooperadores, NK, ratio CD8/Tregs elevado), mientras que niveles bajos de vitamina D se correlacionarían con niveles bajos de poblaciones celulares pro-tumor (Tregs)<sup>119-122</sup> dado el papel inmunomodulador de la vitamina D con acción madurativa sobre los monocitos/macrófagos y MDSCs<sup>103</sup>, incrementando la citotoxicidad tumoral, fagocitosis y actividad bactericida<sup>104</sup>. El potencial terapéutico de la suplementación con vitamina D en pacientes con cáncer y con déficit de vitamina D, con idea de interrumpir la cascada inmunosupresora asociada a los precursores mieloides y así lograr una disminución de la enfermedad metastásica y de la recurrencia tumoral<sup>99,123</sup> debe ser todavía ampliamente estudiado y probado antes de recomendarse en la práctica clínica habitual. Estudios que desarrollen detalladamente las interrelaciones entre las complejas y múltiples vías de señalización con los diferentes elementos del sistema inmunitario y la vitamina D<sup>114-120</sup>, podrían esclarecer el papel inmunomodulador de la vitamina D en las diferentes patologías extraóseas y en cáncer.

## 5.4 INFILTRADO INMUNITARIO EN TEJIDO.

### 5.4.1 Correlación con la RCp.

- **TILs pre-QTNA.**

Al evaluar la RCp con ambos sistemas de valoración de respuesta (estadio TNM patológico y Sistema de M&P), se observa un **mayor infiltrado basal de T CD8+ respecto a FOXP3+**. De tal manera que, **las pacientes que alcanzan RCp global (mama y ganglionar) tienen mayor infiltrado T CD8+ y similar infiltrado FOXP3+ comparado con no RCp global**. Similares resultados se observan cuando se valora solo la RCp en mama o ganglionar para ambas poblaciones celulares.

Se ha empleado el sistema de Clasificación de Ladoire ó Black grading system para medir el infiltrado inmunitario en el TME con un máximo de 3 y un mínimo de 0:

Infiltrado T CD8+: En RCp el 66.7% (IC 95% 33.3-100) de los pacientes tenía grado 3 y el 33.3% (IC 95% 0-66.7) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+. Mientras que en los pacientes con no RCp, sólo el 32.3% (IC 95% 16.1-48.4) tenía grado 3 y el 67.7% (IC 95% 51.6-83.9) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+.

Infiltrado Tregs (FOXP3+): Cuando se mide la RCp según TNM patológico, el porcentaje de pacientes con infiltrado de linfocitos Tregs (FOXP3+) grado 0-2 y grado 3 es muy similar en RCp y no RCp. Así, en RCp, el 7.1% (IC 95% 0-21.4) de los pacientes tenía grado 3 y el 92.9% (IC 95% 78.6-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+. Mientras que en no RCp, el 4.3% (IC 95% 0-



13) de los pacientes tenía grado 3 y el 95.7% (IC 95% 87-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+.

En cambio, cuando se mide la RCp según M&P, el porcentaje de pacientes con infiltrado de linfocitos Tregs (FOXP3+) grado 3 es superior en RCp vs no RCp. Así, en RCp, el 16.7 % (IC 95% 0-50) tenía grado 3 de infiltrado de linfocitos Tregs (FOXP3+) y el 83.3% (IC 95% 50-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+. Mientras que en no RCp, el 3.2% (IC 95% 0-9.7) de los pacientes tenía grado 3 y el 96.8% (IC 95% 90.3-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+.

Se observa una correlación entre los hallazgos de nuestro trabajo y las referencias publicadas en la literatura. Hay una mayor respuesta a la QTNA, medida por la RCp, en aquellos tumores con predominio linfocitario<sup>177,178</sup> e incluso, relacionados con el subtipo de TILs presentes en el TME<sup>179-183</sup>. De ahí la importancia de medir los TILs en la biopsia del diagnóstico tal y como describe Salgado et al.<sup>186</sup>, y aunque el autor concluye que los TILs intratumorales no aportan información adicional a los estromales, siendo éstos últimos más fáciles de evaluar, nuestros patólogos han evaluado un promedio de ambos, con resultados concordantes a la literatura en cuanto a potencial factor predictivo de respuesta a QTNA<sup>177,178,187,188</sup>.

Los autores Denkert et al.<sup>177,187</sup> e Issa-Nummer<sup>188</sup> evaluaron los TILs pre-QTNA, observándose una mayor tasa de RCp en aquellos tumores con predominio linfocitario, respecto a no RCp. Aunque el análisis de nuestro trabajo se ha basado en el porcentaje de pacientes con RCp que tienen un infiltrado de grado 3 vs grado 0-2, se ven resultados concordantes con estos autores con **mayor infiltrado de TILs grado 3 en aquellos pacientes con RCp vs no RCp**. Y, en concreto, vemos que **un alto infiltrado T CD8+ pre-QTNA beneficia el efecto del tratamiento para conseguir RCp**, en relación a los resultados del autor Ali et al.<sup>192</sup> cuando analiza en la pieza quirúrgica en pacientes no sometidos a neoadyuvancia, el papel de las antraciclinas en relación a la densidad de infiltrado T CD8+ (aunque son pacientes no sometidos a QTNA, habría una similitud en la interpretación de los resultados de TILs pre-QTNA de nuestra muestra de pacientes en neoadyuvancia, al no estar influenciados la evaluación de los TILs del TME por el tratamiento aplicado). Sin embargo, vemos que el **infiltrado FOXP3+ pre-QTNA en nuestro trabajo no tendría tanto impacto en alcanzar RCp vs no RCp**, sugiriendo que otras células del TME, tal vez los T CD8+, pudieran tener un papel más crítico, como ya proponía el autor Mahmoud et al.<sup>196</sup>

- **TILs post-QTNA**

Al evaluar la RCp con ambos sistemas de valoración de respuesta (estadio TNM patológico y Sistema de M&P), se observa un **mayor infiltrado T CD8+ respecto a FOXP3+** en todas las pacientes.



Tras la QTNA, se produce, en general, la **no modificación de la densidad de T CD8+ en RCp global, mientras que disminuyen en no RCp global**. El porcentaje de pacientes con infiltrado de linfocitos T CD8+ de grado 3 y de grado 2 se mantiene constante en RCp mientras que en no RCp se produce un ligero descenso del porcentaje de pacientes con grado 3 y aumenta el grado 0-2, haciendo que se mantenga el mayor porcentaje de pacientes con grado 3 de linfocitos T CD8+ en RCp vs no RCp. Así en RCp, el 66.7% (IC 95% 33.3-100) de los pacientes tenía grado 3 y el 33.3% (IC 95% 0-66.7) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+. Mientras que en no RCp, el 30.3% (IC 95% 15.2-45.5) de los pacientes tenía grado 3 y el 69.7% (IC 95% 54.5-84.8) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento.

Similares resultados se observan cuando se valora solo la RCp en mama o ganglionar para ambas poblaciones celulares.

Sin embargo, tras QTNA, y **de manera independiente a la respuesta alcanzada, se produce un descenso de la densidad de FOXP3+**. Todos los pacientes (100%) tienen grado 2 de este infiltrado celular y ninguno (0%) presenta grado 3, independientemente de la respuesta alcanzada.

Nuestros resultados de TILs post-QTNA muestran concordancia con los estudios previos en la literatura. Se ha observado en nuestro trabajo como el tratamiento oncológico neoadyuvante con quimioterapia basada en esquemas con antraciclinas, taxanos, sales de platino y trastuzumab, podría alterar el estado inflamatorio inmunitario de los tumores. Parece inducirse muerte celular o apoptosis inmunogénica con una liberación de antígenos reconocidos por las células dendríticas con la posterior activación de T CD4+ y T CD8+ con acción citotóxica que mantendrían constantes o aumentarían la densidad de los TILs T CD8+<sup>177-180,184,185</sup>.

**En nuestro trabajo la densidad de los linfocitos T CD8+ prácticamente se mantiene constante, no disminuyendo tras el tratamiento con QTNA en aquellos pacientes con RCp y disminuyendo en no RCp. En cambio, hay disminución de FOXP3+ independientemente de la respuesta.** Estos hallazgos están en relación a esa respuesta anti-tumoral por parte de la quimioterapia. De hecho, Ladoire et al.<sup>179,180</sup> muestra en la evaluación post-QTNA una no modificación de T CD3+ ni de T CD8+, y un descenso de FOXP3+, con resultado de un ratio CD8+/FOXP3+ post-QTNA elevado, asociándose con la RCp en una alta sensibilidad (75%) y especificidad (93%).

Así, la modificación de los TILs por el tratamiento oncológico, podría convertir un tumor frío y poco inmunogénico, como puede ser el carcinoma de mama, en un tumor más inmunogénico, influyendo en la respuesta a tratamiento y en el pronóstico<sup>177-180,184-185</sup> como también veremos más adelante al analizar supervivencia.



### 5.4.2 Correlación con la SLE y SG.

Se analizó la SLE y SG tras 9 años de seguimiento.

Un alto porcentaje de pacientes tiene densidad baja (grado 0-2) de FOXP3+ tanto pre-QTNA (89%-100%) como post-QTNA (100%), y un bajo porcentaje de pacientes tiene densidad alta (grado 3) de FOXP3+ tanto pre-QTNA (0%-10%) como post-QTNA (0%), independientemente de la SLE ó SG (> media ó < media). Esto pudiera estar en relación a la baja tasa de recaída y larga supervivencia de las pacientes en estadio no metastásico. Si bien, se ve cómo **con el tratamiento neoadyuvante, el 10% de los pacientes que presentaban densidad grado 3 de FOXP3+ pre-QTNA, bajan de densidad a 0-2 post-QTNA, consiguiéndose que el 100% de los pacientes, independientemente de la SLE ó SG, tengan grado 0-2 de FOXP3+ en relación al papel inmunomodulador favorecedor de la quimioterapia/trastuzumab.**

**El porcentaje de pacientes con infiltrado de linfocitos T CD8+ en tejido pre-QTNA con grado 0-2 es el mayoritario (alrededor del 60%) y se mantiene prácticamente constante post-QTNA, independiente de la SLE ó SG (> media ó < media).**

En nuestro trabajo, al igual que ocurre en el trabajo de Ladoire et al.<sup>179</sup>, el infiltrado FOXP3+ y T CD8+ pre-QTNA no se correlacionó ni con SLE ni con SG, y FOXP3+ post-QTNA tampoco se relacionó con la SG.

Sin embargo, una baja infiltración FOXP3+ post-QTNA se asoció a mejor SLE (p = 0.036) mientras que una alta infiltración T CD8+ post-QTNA se asoció a mejor SLE (p < 0.0001) y SG (p < 0.0001) en Ladoire et al.<sup>179</sup>, pero no en nuestro trabajo.

Lo que también destaca Ladoire et al.<sup>179</sup> es que el ratio TCD8+/FOXP3+ post-QTNA elevado se correlaciona mejor para la SLE y SG que incluso otros factores clásicos como el TNM patológico o el empleo de quimioterapia. Así, crearon el sistema de puntuación patológico-inmunitario (PathIm) utilizando el TNM patológico post-QTNA y el ratio CD8/FOXP3+ post-QTNA para establecer el pronóstico: los pacientes con mínimo estadio TNM patológico y alto ratio CD8/FOXP3+ tuvieron una tasa de SLE a los 5 años del 96% y de SG del 100%.

Así que, ahondando en ese dato, **si tenemos en cuenta que el global de los pacientes incluidos en nuestro estudio tienen buena SLE y SG** (tasa de SLE/9años del 72.3% y de SG/9años del 83.0%), objetivamos que, **tras QTNA, hay mayor porcentaje de pacientes con alta densidad T CD8+ que de FOXP3+:** Hasta el 40% de los pacientes tienen densidad 3 de T CD8+ post-QTNA, mientras que ninguno (0%) de los pacientes tiene densidad 3 de FOXP3+ post-QTNA.

Además, tal y como analiza Liu F et al.<sup>183</sup>, un ratio CD8/FOXP3+ elevado (elevada densidad T CD8+ y baja densidad FOXP3+), está relacionado con mejor SLE y SG, siendo mayor este ratio en subtipo luminal vs no luminal. En nuestro trabajo, un alto



porcentaje de nuestra muestra es fenotipo luminal y, además, hay pocos eventos de recaída o muerte, lo que influye en los resultados de supervivencia y TILs.

Aunque no podamos sacar conclusiones más claras de nuestro estudio sobre la influencia de los TILs del TME en la supervivencia, sí que hay múltiples referencias en la literatura que apoyarían nuestra hipótesis<sup>183,192-194</sup> sobre todo con el infiltrado post-QTNA<sup>179</sup>. Ali et al.<sup>192</sup>, Liu et al.<sup>194</sup> y Mahmoud et al.<sup>195</sup> apoyan la idea de que una mayor densidad de T CD8+ reduce el riesgo de muerte mientras que un elevado infiltrado de FOXP3+ lo aumentaría<sup>193</sup>.

Además, podría haber otros factores confusores para sacar conclusiones como el subtipo tumoral (RH-), grado tumoral (G3), edad (>50 años) y afectación ganglionar (N+) que pudieran influir en la supervivencia tal y como expone Ladoire et al.<sup>179,180,183</sup> ó incluso que otros infiltrados celulares o moléculas co-estimuladoras o co-represoras del TME pudieran tener un papel más crítico en la supervivencia como CAFs, TAMs, TANS, MDSCs, CTLA-4 o PDL-1/PD-1<sup>160-167,196-198</sup>.

### 5.4.3 Correlación con el estadio TNM al diagnóstico.

**Hay un mayor porcentaje de pacientes con alta densidad de infiltrado T CD8+ pre-QTNA en estadio III (38.6%) vs estadio II (21.4%).** Estos porcentajes son similares post-QTNA, independientemente del estadio TNM al diagnóstico.

No se encontró asociación entre la densidad de infiltrado FOXP3+ y estadio TNM clínico.

Hay una relación indirecta entre el trabajo de Ladoire et al.<sup>179</sup> y el nuestro, dado que, aunque este autor no valora directamente estadio II vs III, sí ve una correlación positiva entre una mayor infiltración por T CD3+, CD8+ y FOXP3+ pre-QTNA y factores pronósticos negativos como RH-, mayor grado tumoral y afectación ganglionar. También Bates et al.<sup>174</sup> ve un mayor infiltrado FOXP3+ en aquellos pacientes con mayor riesgo de recaída como pudiera ser la afectación ganglionar. Nosotros no objetivamos relación de FOXP3+ con mayor estadio a pesar de la hipótesis referenciadas<sup>174,179</sup> y a los datos de que una mayor infiltración FOXP3+ favorecería el crecimiento tumoral<sup>134,135</sup> implicando afectación ganglionar y mayor estadio tumoral. En cambio, sí vemos en nuestro trabajo que **una mayor densidad de T CD8+ pre-QTNA pudiera tener relación con un mayor estadio TNM al diagnóstico**<sup>179</sup>.

### 5.4.4 Correlación con el inmunofenotipo tumoral.

Los hallazgos de nuestro trabajo están en relación a la bibliografía sobre el tema<sup>179,183,190-196</sup>: **Hay un mayor infiltrado de T CD8+ pre/post-QTNA en HER2+ RH- respecto al resto de subtipos. No se encontró relación del subtipo con FOXP3+ salvo en luminal A donde hay bajo grado de FOXP3+ pre-QTNA.**





Tsang et al.<sup>191</sup> asoció un alto infiltrado de TILs al subtipo HER2+ (luminal B HER2+ y HER2+ puro) y triple negativo, pero no al subtipo luminal A. Lo mismo observó Loi S. et al.<sup>190</sup> que además destaca que, dentro de estos subtipos, el tener mayor infiltración de TILs, se correlaciona con mejor pronóstico en triple negativo y con mejor respuesta a tratamiento en HER2+ (sin embargo, no usaron esquemas de tratamiento con anti-HER2+).

Son los trabajos de Ladoire et al.<sup>179</sup>, Liu F et al.<sup>183</sup>, Liu S et al.<sup>194</sup> y Mahmoud et al.<sup>194</sup> los que demuestran que una mayor infiltración T CD8+ se asocia a RH-, HER2+ y basal like y, a su vez, con mejor pronóstico en RE-<sup>192,193,195</sup>.

Además, Liu F et al.<sup>183</sup> y Liu S et al.<sup>193</sup> refieren un mayor infiltrado FOXP3+ en RE- (triple negativo y HER2 puro), aunque sin poderse demostrar su papel pronóstico en estos subtipos<sup>193,196</sup>.

En nuestro estudio, dado el bajo número de pacientes triple negativo, no pudimos sacar conclusiones en este inmunofenotipo.

## 5.5 PERFIL INMUNITARIO EN SANGRE PERIFÉRICA.

### 5.5.1 Pacientes vs sanas.

- a. En nuestro trabajo, en el grupo de pacientes hay **mayores niveles basales estadísticamente significativos de leucocitos (p = 0.004), neutrófilos (p < 0.001), Treg (p = 0.028) y ratio neutrófilos/linfocitos (p < 0.001) respecto a sanas**, correlacionándose con la información disponible en la literatura.

Debido al estado inflamatorio específico de las pacientes, se detecta una leucocitosis<sup>199</sup> y una neutrofilia<sup>125,140</sup>, siendo estas últimas de las primeras células del sistema inmunitario en luchar contra un daño producido en el organismo, con la activación del sistema inmunitario ante el proceso de carcinogénesis y la perpetuación del mismo. Se produce una reacción "leukemoide" de origen paraneoplásico como resultado de la liberación por parte del tumor de factores de crecimiento de la línea mieloide (G-CSF, GM-CSF, IL-6)<sup>125,126</sup>, donde prima la neutrofilia y la monocitosis. Ese estado de leucocitosis favorecería el desarrollo tumoral<sup>200</sup> y la trombosis asociada a cáncer por la generación de NETs por parte de los neutrófilos<sup>201</sup>, liberación de factores procoagulantes, etc.

Los Treg se encuentran incrementados acorde a los resultados de los autores Li CH et al.<sup>259</sup>, Wang ZK et al.<sup>260</sup>, Liu JT et al.<sup>261</sup> y Liyanage UK et al.<sup>262</sup>, debido a la inmunodepresión producida en el ambiente tumoral que se perpetúa con la acción inhibitoria de los Treg sobre los T CD8+ citotóxicos.



Dado el aumento de neutrófilos y la disminución de linfocitos, se produce un mayor ratio neutrófilos/linfocitos en pacientes respecto a sanas<sup>216,217,219,224-227</sup>.

- b. En pacientes hay **menores niveles basales estadísticamente significativos de linfocitos totales (p < 0.001), linfocitos T (p < 0.001), linfocitos B (p = 0.009), T CD4+ (p < 0.001), T CD8+ (p = 0.001), ratio linfocitos/monocitos (p = 0.018), ratio CD4/CD8 (p = 0.003) y ratio CD8/Treg (p < 0.001), respecto a sanas.**

Los niveles disminuidos de linfocitos reflejan la inmunosupresión en el ambiente tumoral de las pacientes como mecanismo de escape para favorecer la progresión<sup>233-236</sup>. Aunque en estadios precoces de la carcinogénesis pueden estar aumentados los linfocitos T CD4+ y T CD8+<sup>263</sup>, posteriormente se produce la linfosupresión de linfocitos T citotóxicos efectores y un aumento de aquellos con acción inmunosupresora pro-tumoral como los Tregs<sup>129, 209-233</sup>.

Las ratios linfocitos/monocitos, CD4/CD8 y CD8/Treg acordes a nuestra hipótesis y a la de trabajos previos<sup>238,263-275</sup>, se encuentran disminuidos dada la inmunosupresión linfocitaria con aumento de Treg.

- c. No hay diferencias en los valores basales de monocitos (p = 0.336) ni linfocitos NK (p = 0.566) entre pacientes y sanas.

A diferencia de lo que se ha encontrado en la literatura<sup>206-211</sup> en nuestro trabajo no hemos encontrado mayores niveles de monocitos en pacientes. El fenotipo M2 de monocitos es el que está aumentado en la patológica tumoral<sup>206-211</sup> según diversos autores. En nuestro estudio no hemos diferenciado los diferentes subtipos de monocitos/macrófagos en el análisis.

En cuanto a los hallazgos de los linfocitos NK, mientras que hay autores que destacan mayores niveles de células NK en pacientes<sup>238,245,246</sup>, hay otros como Caras I et al.<sup>248</sup>, Liu X et al.<sup>249</sup>, Nieto-Velázquez NG et al.<sup>250</sup>, Mamessier E et al.<sup>251,252</sup> y Garner WL et al.<sup>253</sup> que observan igual que en este trabajo, que no hay diferencias en los niveles periféricos de las células NK en los pacientes respecto a sanas sino una mayor proporción de subgrupos de células NK más inmaduras con capacidad citotóxica disminuida y más inmunomoduladora (CD56+brightCD16+dim/-), y una disminución de la expresión del receptor NKG2D<sup>250</sup>, necesaria para la activación de la citotoxicidad, en relación a mecanismos de evasión y tolerancia por parte de las células tumorales lo que favorece la invasión y metástasis.



## 5.5.2 Correlación con la RCp.

Tras valorar la RCp tanto con el sistema TNM patológico como con el sistema M&P, se han objetivado las siguientes correlaciones con el perfil inmunitario en sangre periférica en nuestro trabajo:

- Los **niveles pre-QTNA** de leucocitos ( $p \leq 0.011$ ), neutrófilos ( $p \leq 0.011$ ) y Treg ( $p = 0.042$ , sólo en sistema TNM) son mayores en no RCp vs RCp, con diferencias estadísticamente significativas.
- Los **niveles post-QTNA** de neutrófilos ( $p \leq 0.019$ ), monocitos ( $p = 0.019$ ) y Treg ( $p \leq 0.003$ ) son estadísticamente mayores en no RCp vs RCp, mientras que el ratio linfocitos/monocitos ( $p \leq 0.006$ ) es menor en no RCp vs RCp.

Estos hallazgos podrían estar en relación al papel pronóstico negativo de estas poblaciones celulares del sistema inmunitario, por lo que niveles elevados de las mismas disminuirían la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante, lo que dificultaría lograr una RCp. La reacción "leucemoide" paraneoplásica, donde prima la neutrofilia y la monocitosis, favorecería el desarrollo tumoral<sup>200</sup>. Los neutrófilos probablemente serían de tipo TANs<sup>162,201,203,106</sup> y los monocitos serían de tipo M2 (TAMs)<sup>161,209-211</sup> con acción pro-tumoral, confiriendo por tanto resistencia al tratamiento oncológico. La presencia de Treg se relacionaría con una linfo-supresión sobre los T CD8+, lo que conferiría también resistencia al tratamiento<sup>264-266,268</sup>. Como consecuencia de todo lo anterior, con una linfo-deplección y un aumento de los niveles de monocitos, encontramos un ratio linfocito/monocito disminuido<sup>216-218</sup> en no RCp.

- Con el **tratamiento neoadyuvante** se observan las siguientes modificaciones:  
 En RCp se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de monocitos ( $p = 0.043$ ; RCp medida por M&P), Tregs ( $p \leq 0.044$ ) y leucocitos ( $p < 0.001$ ; RCp en mama medida por TNM), mientras que hay un ligero aumento de los linfocitos T CD8+ y T CD4+ (no estadísticamente significativo) y un aumento del ratio CD8/Treg (no estadísticamente significativo).  
 En no RCp se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de neutrófilos ( $p = 0.048$ ; respuesta medida por M&P), leucocitos ( $p = 0.003$ ; solo en respuesta medida por sistema M&P), linfocitos totales ( $p \leq 0.001$ ), linfocitos B ( $p < 0.001$ ), linfocitos NK ( $p = 0.001$ ), linfocitos T ( $p \leq 0.005$ ), T CD8+ ( $p \leq 0.004$ ), T CD4+ ( $p \leq 0.041$ ), ratios linfocitos/monocitos ( $p \leq 0.006$ ) y CD4/CD8 ( $p \leq 0.039$ ; en respuesta evaluada en mama ó ganglionar por el sistema TNM y en respuesta global evaluada por M&P), mientras que no hay modificación de los Treg y aumenta el ratio neutrófilos/linfocitos ( $p = 0.006$ ; sólo en respuesta evaluada por sistema TNM).



Los hallazgos de nuestro trabajo apoyan la idea del papel inmunomodulador del tratamiento oncológico con la liberación de antígenos, reconocidos por las células dendríticas con la posterior activación de Th CD4+ y T CD8+ con acción citotóxica<sup>177-180</sup> y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por parte del trastuzumab<sup>184-185</sup>.

Así, en nuestro trabajo, en RCp hay un descenso de los Tregs, monocitos y leucocitos disminuyendo su capacidad pro-tumoral<sup>199,212,268,269,273</sup> y un aumento (aunque no estadísticamente significativo) de T CD8+<sup>286</sup>, T CD4+<sup>268</sup> y del ratio CD8/Treg<sup>273</sup> ensalzando los mecanismo anti-tumorales.

Y, del mismo modo, en no RCp hay un descenso de los mecanismos anti-tumor (linfocitos B<sup>238</sup>, linfocitos NK<sup>238,255-257</sup>, linfocitos T CD8+<sup>263,264,266,267</sup>, T CD4+<sup>263,268</sup>, ratios linfocitos/monocitos<sup>218</sup> y CD4/CD8<sup>270-272</sup>) y un aumento del ratio neutrófilos/linfocitos<sup>230,231</sup>, en concordancia a la literatura referenciada.

### 5.5.3 Correlación con la SLE y SG.

Se analizó la SLE y SG tras 9 años de seguimiento con los siguientes hallazgos en nuestro trabajo:

#### 1. SLE.

Los pacientes con **mayor SLE** tenían mayores niveles post-QTNA de neutrófilos (p = 0.020) y de linfocitos (p = 0.011) y menores niveles post-QTNA de monocitos (p = 0.006) y de Treg (p = 0.028) respecto a aquellos con mayor SLE.

Con el tratamiento neoadyuvante, se produce un descenso de leucocitos (p = 0.001), linfocitos B (p < 0.001), NK (p < 0.001) y Treg (p = 0.033) en los pacientes con mayor SLE; mientras que en los pacientes con menor SLE se produce un descenso de linfocitos T (p = 0.043), linfocitos T CD4+ (p = 0.043), T CD8+ (p = 0.028), ratios linfocitos/monocitos (p = 0.012) y CD4/CD8 (p = 0.008), y un aumento del ratio neutrófilos/linfocitos (p = 0.038).

#### 2. SG.

Los pacientes con **mayor SG** tenían mayores niveles post-QTNA de linfocitos (p = 0.047) y menores niveles de Treg pre-QTNA (p < 0.001) y post-QTNA (p = 0.012).

Con el tratamiento neoadyuvante, se produce un descenso de leucocitos (p = 0.001), de linfocitos B (p < 0.001) y NK (p < 0.001) y un aumento del ratio CD4/CD8 (p = 0.028) en los pacientes con mayor SG. Mientras que en los pacientes con menor SG se produce un descenso del ratio CD4/CD8 (p = 0.028).

Al contrario de los trabajos previos de la literatura<sup>201,205,206</sup>, hallamos mayores niveles de neutrófilos post-QTNA en los pacientes con mayor SLE por lo que habría que analizar si los niveles de neutrófilos de nuestro trabajo estarían más en relación



a una actividad anti-tumoral que al fenotipo pro-NETotic<sup>201</sup> pro-tumoral que describen los autores.

En cambio, si son concordantes con la literatura los hallazgos en los pacientes de mayor supervivencia y niveles de linfocitos elevados anti-tumorales<sup>234-236</sup>, menores niveles de monocitos supresores tipo TAMs<sup>209,210,212</sup> y menores niveles de Treg inmunosupresores<sup>264-266,268,269</sup>, así como un descenso de los Tregs, leucocitos y linfocitos B<sup>238</sup>. Asimismo, se objetiva un descenso de las poblaciones anti-tumorales como linfocitos T totales, linfocitos T CD4+<sup>265,268,269,273</sup>, T CD8+<sup>265,268,269,278</sup>, ratios linfocitos/monocitos y CD4/CD8<sup>271,272</sup> y un aumento del ratio pro-tumoral neutrófilos/linfocitos<sup>216,217,219,224-226,230,231</sup> en aquellos pacientes con menor supervivencia.

### 3. Pacientes vs sanas.

Los valores de **linfocitos Treg post-QTNA de los pacientes** con mejor pronóstico (SLE/SLED ó SG > media) son similares a los **valores basales de la cohorte sana** (p > 0.05). Lo que estaría en relación al potencial papel del tratamiento oncológico neoadyuvante para reestablecer un sistema inmunocompetente de lucha antitumoral similar a cohorte sana<sup>264-266,268</sup>.

#### 5.5.4 Correlación con el estadio TNM al diagnóstico.

Se objetivan mayores niveles pre-QTNA estadísticamente significativos de leucocitos (p = 0.017), neutrófilos (p = 0.03), linfocitos B (p = 0.047) y linfocitos NK (p = 0.012) y mayor ratio CD4/CD8 post-QTNA (p = 0.002) en estadio II vs estadio III. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en el resto de poblaciones celulares estudiadas ni en los valores post-tratamiento.

A diferencia de la bibliografía<sup>200,204,206,240-243</sup>, en este trabajo hemos encontrado mayores niveles de leucocitos, linfocitos B, NK y neutrófilos en estadios más tempranos, pudiendo explicarse este hallazgo por la necesidad de evaluar los subtipos de esas poblaciones celulares según su actividad pro-tumoral o anti-tumoral (por ejemplo, neutrófilos que activen la citotoxicidad o TANs/NETs pro-tumorales; linfocitos NK citotóxicos o NK CD56+brightCD16+dim/- reguladores, etc.) en lugar de solo en los niveles de los mismos.

En cualquier caso, el hallazgo de los linfocitos B estaría más en relación con los autores Iglesia MD et al.<sup>243</sup>, Schmidt M et al.<sup>244</sup> y Mahmoud SM et al.<sup>240</sup> que describen, a diferencia del resto de autores, una asociación entre mayor actividad de los linfocitos B y mejor pronóstico (en consecuencia, menor estadio). Del mismo modo ocurre con los linfocitos NK<sup>256,258</sup>.

Sin embargo, en concordancia con la literatura<sup>261,271,272</sup>, sí hemos encontrado que el ratio CD4/CD8 está aumentado en estadios más precoces (II) respecto a más



avanzados (III) pudiendo ser la citotoxicidad anti-tumoral asociada a estas poblaciones celulares, la razón de este hallazgo.

### 5.5.5 Correlación con el inmunofenotipo tumoral.

En nuestro trabajo, encontramos que el subtipo **HER2+** (luminal HER2+ y HER2 puro) tiene mayores niveles en sangre periférica de linfocitos B y de ratio linfocitos/monocitos post-QTNA respecto a luminal A ( $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.029$ , respectivamente) y luminal B ( $p \leq 0.007$  y  $p = 0.011$ , respectivamente). Incluso, que el subtipo HER2+ tienen mayores niveles de linfocitos B ( $p \leq 0.035$ ) y TCD8+ ( $p = 0.045$ ) post-tratamiento y menores niveles de monocitos post-QTNA ( $p = 0.002$ ) respecto a HER2-.

Estos hallazgos coinciden con los autores Iglesia MD et al.<sup>243</sup>, Schmidt M et al.<sup>244</sup>, Mahmoud SM et al.<sup>240</sup>, Decker T et al.<sup>277</sup>, Lin KR et al.<sup>278</sup> y Wen J et al.<sup>209</sup> donde hay mayores niveles de linfocitos B<sup>240,243,244</sup>, T CD8+<sup>277,278</sup> y de monocitos<sup>209</sup> en el subtipo HER2+. Sin embargo, también mantienen que el triple negativo posee niveles de linfocitos B<sup>240</sup> y de monocitos<sup>209</sup> elevados, algo que no ocurre en nuestro trabajo.

Los hallazgos del ratio linfocitos/monocitos bajo en luminal A concuerdan con los autores Zenan H et al.<sup>222</sup> y Xu et al.<sup>223</sup>. Sin embargo, estos autores también mantienen que el subtipo HER2+ tiene este ratio bajo, lo que contrasta con nuestros resultados.

Estos datos, podrían indicar que en el subtipo HER2+, el infiltrado inmunitario podría tener especial interés frente al subtipo luminal, sin embargo, se necesitan más estudios sobre el tema.

El bajo número de pacientes en cada subtipo tumoral en nuestro trabajo, concretamente en triple negativo, no permite sacar conclusiones más esclarecedoras. Además, la mayoría de trabajos de la literatura también ofrecen resultados muy diversos, incluso muchos de ellos establecen los subtipos por mecanismos moleculares, lo que no es el caso de este trabajo en el que la discriminación se realiza por técnicas inmunohistoquímicas. Esta circunstancia podría dificultar, aún más, la concordancia y comparativa de los resultados.



## 6. CONCLUSIONES

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



A continuación, se exponen las conclusiones más destacadas del estudio.

1. El perfil inmunitario de las pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama es diferente al de sanas. En las pacientes se produce un aumento del estado inflamatorio (mayores niveles de leucocitos, neutrófilos, y ratio neutrófilos/linfocitos) con aumento de los mecanismos pro-tumorales (Treg) y disminución de los anti-tumorales (linfocitos, linfocitos T, linfocitos B, T CD4+ y T CD8+, ratios linfocitos/monocitos, CD4/CD8 y CD8/Treg) respecto a sanas.
2. Un elevado porcentaje de la muestra de nuestro estudio tiene déficit de vitamina D, pudiendo estar más en relación a la edad que al diagnóstico de cáncer o al estado inmunitario. El potencial papel inmunomodulador de la vitamina D necesita más investigación.
3. El tratamiento neoadyuvante tiene un potencial papel inmunomodulador y además, permite la caracterización del estado inmunitario en sangre periférica y en tejido, antes, durante y después del tratamiento, así como conocer sus implicaciones pronósticas y predictivas de respuesta a tratamiento.
4. En las pacientes que alcanzan Rcp con el tratamiento neoadyuvante se produce un descenso en sangre periférica de las poblaciones pro-tumorales (Tregs, monocitos y leucocitos) mientras que en no RCp hay un descenso de las anti-tumorales (linfocitos NK, linfocitos B, T CD8+, T CD4+, ratios linfocitos/monocitos y CD4/CD8). Y del mismo modo, en tejido hay una disminución de FOXP3+ y un mayor infiltrado de linfocitos T CD8+ en RCp.
5. En las pacientes que alcanzan mayor SLE y SG con el tratamiento neoadyuvante se produce un descenso en sangre periférica de las poblaciones pro-tumorales (leucocitos y Treg) y un aumento del ratio CD4/CD8 anti-tumoral. Y del mismo modo, en tejido hay una disminución de FOXP3+ y mayor infiltrado post-QTNA de linfocitos T CD8+ en los pacientes con una mayor SLE y SG.
6. La tasa de RCp fue similar en ambos sistemas de evaluación empleados (sistema de Miller & Payne y sistema TNM patológico). Añadir la evaluación ganglionar a la del tumor primario en mama permite una evaluación más completa y detallada.
7. En general, el carcinoma de mama candidato a neoadyuvancia tiene una larga SLE, SLED y SG a los 5 y 9 años de seguimiento. La SLE, SLED y SG es menor en el triple negativo respecto al resto de fenotipos. Lograr una RCp con la terapia neoadyuvante se correlaciona con mejor SLE, SLED y SG.





8. El subtipo HER2+ tiene una mayor densidad de TILs, en concreto T CD8+ pre/post-QTNA en tejido y en sangre periférica, así como ratio linfocitos/monocitos elevado en sangre periférica. Sin embargo, el bajo número de pacientes en cada subtipo tumoral, concretamente en triple negativo, no permite sacar conclusiones más esclarecedoras.
9. Una mayor densidad en tejido de T CD8+ pre-QTNA parece relacionarse con un mayor estadio TNM al diagnóstico mientras que un ratio CD4/CD8 elevado en sangre periférica podría ser un biomarcador de estadios más precoces (II) al diagnóstico. Es necesario profundizar en las funciones del resto de poblaciones celulares (leucocitos, neutrófilos, linfocitos B y NK) antes de establecer su correlación con en el estadio tumoral.

Son necesarios más estudios con mayor poder estadístico para establecer definitivamente a las poblaciones celulares del sistema inmunitario como potenciales biomarcadores predictivos y pronósticos.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



1. GLOBOCAN. Global Cancer Observatory. [Último acceso el 15/01/20]. Accesible en: <http://gco.iarc.fr/resources.php>
2. Schmid P, Adams S, Rugo HS, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. N Engl J Med. 2018;379(22):2108-2121.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin 2019; 69:7.
4. REDECAN. Red Española de Registros de Cáncer. [Último acceso el 15/01/20]. Accesible en: <http://redecana.org/es/index.cfm>.
5. Instituto Nacional de Estadística (INE). Estadística de defunciones. [Último acceso el 15/01/20]. Accesible en: [https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica\\_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175](https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175)
6. Newman LA. Epidemiology of locally advanced breast cancer. Semin Radiat Oncol 2009; 19:195.
7. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer 1989; 63:181.
8. CAP. College of American Pathologists. Protocol for the Examination of Resection Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast. [Último acceso el 17/01/20]. Accesible en: <https://documents.cap.org/protocols/cp-breast-invasive-resection-19-4300.docx>
9. Cell Search CTC. [Último acceso el 18/01/20]. Accesible en: <https://www.cellsearchctc.com/clinical-applications/mbc-clinical-trials-case-studies>
10. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al. Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point during Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival Clin Cancer Res 2006;12(14): 4218-4224.
11. Hartkopf AD, Brucker SY, Taran F-A, et al: International pooled analysis of the prognostic impact of disseminated tumor cells from the bone marrow in early breast cancer: Results from the PADDY study. 2018 San Antonio Breast Cancer Symposium. Abstract GS5-07. Presented December 7, 2018
12. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. Br J Cancer 2007; 96:1504.
13. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32.825 patients. Breast.2008;17(4):323-334.
14. Bonnefoi H, Piccart M, Bogaerts J, et al. TP53 status for prediction of sensitivity to taxane versus non-taxane neoadjuvant chemotherapy in breast cancer



- (EORTC 10994/BIG 1-00): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2011; 12:527.
15. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747-752.
  16. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(19):10869-10874.
  17. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;23(9):2206-2223.
  18. Amin MB, et al., editors. *AJCC cancer staging manual.* 8th ed. Basel: Springer; 2017: 588–636.
  19. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006; 295:2492-502.
  20. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373:2005.
  21. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2013;31(22):2783-2790.
  22. Mittendorf EA, Chavez-MacGregor M, Vila J, et al. Bioscore: A Staging System for Breast Cancer Patients that Reflects the Prognostic Significance of Underlying Tumor Biology. *Ann Surg Oncol.* 2017;24(12):3502-3509.
  23. Chavez-MacGregor M, Mittendorf EA, Clarke CA, Lichtensztajn DY, Hunt KK, Giordano SH. Incorporating Tumor Characteristics to the American Joint Committee on Cancer Breast Cancer Staging System. *Oncologist.* 2017;22(11):1292-1300.
  24. Aguirre Ortega E, Alés Martínez JE, Andrés Conejero R, et al., editors. SEOM. Sociedad Española de Oncología Médica. *Manual Cáncer Hereditario.* 3º ed. GoNext Producciones S.L; 2019:1-472.
  25. Kesson EM, Allardice GM, George WD, et al. Effects of multidisciplinary team working on breast cancer survival: retrospective, comparative, interventional cohort study of 13 722 women. *BMJ* 2012; 344: e2718.
  26. Mauri D, Nicholas Pavlidis N, John PA. Neoadjuvant Versus Adjuvant Systemic Treatment in Breast Cancer: A Meta-Analysis, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 97, Issue 3, 2 February 2005, Pages 188–194
  27. Bines J, Earl H, Buzaid AC, Saad ED. Anthracyclines and taxanes in the neo/adjuvant treatment of breast cancer: does the sequence matter? *Ann Oncol* 2014;25(6):1079-1085.
  28. Peto R, Davies C, Godwin J, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-



- term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet*. 2012 Feb 4;379(9814):432-44.
29. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol* 2015; 33:13.
  30. Sharma P, López-Tarruella S, García-Saenz JA, et al. Efficacy of Neoadjuvant Carboplatin Plus Docetaxel in Triple-Negative Breast Cancer: Combined Analysis of Two Cohorts. *Clin Cancer Res*. 2017;23(3):649-657.
  31. Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N Engl J Med* 2017; 376:2147.
  32. Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 2014; 384:164.
  33. Ellis MJ, Coop A, Singh B, et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2001; 19:3808.
  34. Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, et al. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol* 2005; 23:5108.
  35. Cataliotti L, Buzdar AU, Noguchi S, et al. Comparison of anastrozole versus tamoxifen as preoperative therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: the Pre-Operative "Arimidex" Compared to Tamoxifen (PROACT) trial. *Cancer* 2006; 106:2095.
  36. Martin M, Hurvitz SA, Chan D, et al. Final results of NeoMONARCH: A phase 2 neoadjuvant study of abemaciclib in postmenopausal women with hormone receptor positive (HR+), HER2 negative breast cancer (BC) [abstract]. In: *Proceedings of the 2017 San Antonio Breast Cancer Symposium*; 2017 Dec 5-9; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2018;78(4 Suppl): Abstract nr PD5-01.
  37. Saura C, Hlauschek D, Oliveira M, et al. Neoadjuvant letrozole plus taselelisib versus letrozole plus placebo in postmenopausal women with oestrogen receptor-positive, HER2-negative, early-stage breast cancer (LORELEI): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2019;20 (9):1226-1238.
  38. EP, Jeong JH, Wickerham DL, et al. Benefit from exemestane as extended adjuvant therapy after 5 years of adjuvant tamoxifen: intention-to-treat analysis



- of the National Surgical Adjuvant Breast And Bowel Project B-33 trial. J Clin Oncol 2008; 26:1965.
39. Gray RG, Rea D, Handley K, et al. aTTom: Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6,953 women with early breast cancer. J Clin Oncol 2013; 31S: ASCO #5.
  40. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. Lancet Oncol. 2014;15(6):640-7.
  41. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). Ann Oncol. 2013;24(9):2278-84.
  42. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, et al. 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. Lancet Oncol. 2016;17(6):791-800.
  43. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med 2019; 380:617.
  44. Donker M, van Tienhoven G, Straver ME, 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 2014; 15:1303.
  45. Boughey JC, Ballman KV, Hunt KK, et al. Axillary Ultrasound After Neoadjuvant Chemotherapy and Its Impact on Sentinel Lymph Node Surgery: Results From the American College of Surgeons Oncology Group Z1071 Trial (Alliance). J Clin Oncol 2015; 33:3386.
  46. Kuehn T, Bauerfeind I, Fehm T, et al. Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective, multicentre cohort study. Lancet Oncol 2013; 14:609.
  47. Jagsi R, Chadha M, Moni J, et al. Radiation field design in the ACOSOG Z0011 (Alliance) Trial. J Clin Oncol 2014; 32:3600.
  48. Swisher SK, Vila J, Tucker SL, et al. Locoregional Control According to Breast Cancer Subtype and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Undergoing Breast-conserving Therapy. Ann Surg Oncol 2016; 23:749.
  49. ClinicalTrials.gov. NSABP Foundation Inc. A Randomized Phase III Clinical Trial Evaluating Post-Mastectomy Chestwall and Regional Nodal XRT and Post-Lumpectomy Regional Nodal XRT in Patients With Positive Axillary Nodes Before Neoadjuvant Chemotherapy Who Convert to Pathologically



- Negative Axillary Nodes After Neoadjuvant Chemotherapy. [Último acceso el 15/01/20]. Accesible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01872975>
50. van Nes JG, Putter H, Julien JP, et al. Preoperative chemotherapy is safe in early breast cancer, even after 10 years of follow-up; clinical and translational results from the EORTC trial 10902. *Breast Cancer Res Treat*, 2009;115 (1);101-113.
  51. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1998;16 (8): 2672-2685.
  52. Bear HD, Anderson S, Brown A, et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol*.2003;21 (22):4165-4174.
  53. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*.1999;17 (2):460-469.
  54. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012;30 (15): 1796-1804.
  55. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res*. 2004;10(19):6622
  56. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. *J Clin Oncol*. 2011;29(25):3351–3357.
  57. Houssami N, Macaskill P, von Minckwitz G, Marinovich ML, Mamounas E. Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer* 2012; 48 (18): 3342-3354.
  58. F.D.A. Guidance for Industry Pathologic Complete Response in Neoadjuvant Treatment of High-Risk Early-Stage Breast Cancer: Use as an Endpoint to Support Accelerated Approval. [Último acceso el 15/01/20]. Accesible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM305501.pdf>.
  59. Fayanju OM, Ren Y, Thomas SM, et al. The Clinical Significance of Breast-only and Node-only Pathologic Complete Response (pCR) After Neoadjuvant



- Chemotherapy (NACT): A Review of 20,000 Breast Cancer Patients in the National Cancer Data Base (NCDB). *Ann Surg* 2018; 268:591.
60. Spring LM, Fell G, Arfe A, et al. Pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy and impact on breast cancer recurrence and mortality, stratified by breast cancer subtypes and adjuvant chemotherapy usage: Individual patient-level meta-analyses of over 27,000 patients. *Cancer Res* 2019; 79S: SABCS #GS2-03.
  61. Ogston KN, Miller ID, Payne S, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast* 2003; 12:320–327.
  62. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.*2007;25:4414-22.
  63. Chevallier B, Roche H, Olivier J P, Chollet P, Hurtcloup P. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy. Results in a high histologic response. *Am J Clin Oncol* 1993; 16: 223-228.
  64. Sinn HP, Schmid H, Junkermann H, et al. Histologic regression of breast cancer after primary (neoadjuvant) chemotherapy. *Geburtshilfe Frauenheilkd.*1994; 54:552-8.
  65. Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: A determinant of outcome. *J Am Coll Surg.* 1995; 180:297-306.
  66. Honkoop AH, van Diest PJ, de Jong JS, et al. Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristics in patients with locally advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 1998; 77:621-6.
  67. Kuerer HM, Newman LA, Buzdar AU, et al. Pathologic tumor response in the breast following neoadjuvant chemotherapy predicts axillary lymph node status. *Cancer J Sci Am.* 1998; 4:230-6.
  68. Fisher ER, Wang J, Bryant J, Fisher B, Mamounas E, Wolmark N. Pathobiology of preoperative chemotherapy: Findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel (NSABP) protocol B-18. *Cancer.* 2002; 95:681-95.
  69. Kuroi K, Toi M, Tsuda H, Kurosumi M, Akiyama F. Issues in the assessment of the pathologic effect of primary systemic therapy for breast cancer. *Breast Cancer.* 2006; 13:38-48.
  70. Tresserra F, Martínez MA, Gonzalez-Cao M, et al. Respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante: correlación entre 2 sistemas de gradación histológica. *Rev Senol Patol Mamar.* 2013;26(3):77-84.
  71. Provenzano E, Boussuyt V, Viale G, et al. Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group. *Mod Pathol.*2015;28(9):1185-1201.





72. Kaufmann M, von Minckwitz G, Smith R, et al. International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: Review and recommendations. *J Clin Oncol.* 2003; 21:2600-8.
73. Agustí, Algarra M, Córdoba O, et al. Manual recomendaciones para el seguimiento de las mujeres supervivientes de cáncer de mama. *SEOM* 2017:1-472.
74. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1678S-1688S.
75. Enko D, Kriegshäuser G, Stolba R, et al. Method evaluation study of a new generation of vitamin D assays. *Biochem Med (Zagreb)* 2015; 25:203–212.
76. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96:53–58.
77. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al; Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96:1911–1930.
78. Hilger J, Friedel A, Herr R, et al. A systematic review of vitaminD status in populations worldwide. *Br J Nutr* 2013; 9:1-23.
79. González-Molero I, Morcillo S, Valdes S, et al. Vitamin D deficiency in Spain: A population-based cohort study. *Eur J Clin Nutr.* 2011;65:321-328.
80. Hatse S, Lambrechts D, Verstuy A, et al. Vitamin D status at breast cancer diagnosis: correlation with tumor characteristics, disease outcome, and genetic determinants of vitamin D insufficiency. *Carcinogenesis.* 2012; 33:1319–1326.
81. Zapatero A, Dot I, Diaz Y, et al. La hipovitaminosis D grave al ingreso en el paciente crítico se asocia a fracaso renal agudo y mal pronóstico. *Medicina Intensiva* 2017; <http://dx.doi.org/10.1016/j.medin.2017.07.004>.
82. Leyssens C, Verlinden L, De HG, et al. Impact on experimental colitis on vitamin d receptor deletion in intestinal epithelial or myeloid cells. *Endocrinology* 2017; 158:2354-2366.
83. Gominak SC. Vitamin D deficiency changes the intestinal microbiome reducing B vitamin production in the gut. The resulting lack of pantothenic acid adversely affects the immune system, producing a "pro-inflammatory" state associated with atherosclerosis and autoimmunity. *Med Hypotheses* 2016; 94:103-107.
84. Chen P, Hu P, Xie D, et al. Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 121:469–477.
85. Mohr SB, Gorham ED, Alcaraz JE, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *Anticancer Res.* 2011; 31:2939–2948.
86. Bolland MJ, Grey A, Gamble GD, et al. Calcium and vitamin D supplements



- and health outcomes: a reanalysis of the Women’s Health Initiative (WHI) limited-access data set. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94:1144–1149.
87. Neuhouser ML, Manson JE, Millen A, et al. The influence of health and lifestyle characteristics on the relation of serum 25-hydroxyvitamin D with risk of colorectal and breast cancer in postmenopausal women. *Am J Epidemiol.* 2012; 175:673–684.
  88. Yao S, Kwan ML, Ergas IJ, et al. Association of serum level of vitamin D at diagnosis with breast cancer survival: a case-cohort analysis in the pathways study. *JAMA Oncol.* 2017; 3:351–357.
  89. de Sousa Almeida-Filho B, De Luca Vespoli H, Pessoa EC, et al. Vitamin D deficiency is associated with poor breast cancer prognostic features in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017; 174:284–289.
  90. Imtiaz S, Siddiqui N, Raza SA, et al. Vitamin D deficiency in newly diagnosed breast cancer patients. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012; 16:409–413.
  91. Lemire, J. M. Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1995; 53:599-602.
  92. Hewison, M. Vitamin D and the immune system. *J. Endocrinol.* 1992; 132:173.
  93. Fournier C, Gepner P, Sadouk M, Charreire J. In vivo beneficial effects of cyclosporine A and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1990; 54:53.
  94. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93:7861.
  95. Pandolfi F, Franza L, Mandolini C, et al. Immune modulation by vitamin D: special emphasis on its role in prevention and treatment of cancer. *Clin. Ther.* 2017;39(5):884–893.
  96. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat. Rev. Cancer* 2014; 14(5): 342–357.
  97. Krishnan AV, Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011; 51: 311–336.
  98. Tavera-Mendoza LE, Westerling T, Libby E, et al. Vitamin D receptor regulates autophagy in the normal mammary gland and in luminal breast cancer cells. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 2017; 114(11): E2186–E2194.
  99. Piemonti L, Monti P, Sironi M. Vitamin D3 Affects Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol* 2000; 164:4443-4451.
  100. D’Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, et al. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3: involvement of NF-κB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 252.



101. Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J. Immunol.*1985; 134(5): 3032–3035.
102. Jeffery LE, Burke F, Mura M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J. Immunol.*2009; 183(9):5458–5467.
103. Kreutz M, Andressen R. Induction of human monocyte to macrophage maturation in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood* 1990; 76:2457.
104. Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*1989; 68:774.
105. Ma P, Beatty PL, McKolanis J, et al. Circulating Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) That Accumulate in Premalignancy Share Phenotypic and Functional Characteristics with MDSC in Cancer. *Front. Immunol.* 2019; 10:1401.
106. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* 2013;12(4): 253–268.
107. Vasquez-Dunddel D, Pan F, Zeng Q, et al. STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *J Clin Invest* 2013; 123: 1580-1589.
108. Lu T, Gabrilovich DI. Molecular pathways: tumor-infiltrating myeloid cells and reactive oxygen species in regulation of tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 4877-4882.
109. Munder M, Engelhardt M, Knies D, et al. Cytotoxicity of tumor antigen specific human T cells is unimpaired by arginine depletion. *PLoS One* 2013; 8: e63521.
110. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, et al. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2009;58: 49–59.
111. Yang G, Shen W, Zhang Y, et al. Accumulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) induced by low levels of IL-6 correlates with poor prognosis in bladder cancer. *Oncotarget.* 2017;8(24):38378–38388.
112. Kawano M, Mabuchi S, Matsumoto Y, et al. The significance of G-CSF expression and myeloid-derived suppressor cells in the chemoresistance of uterine cervical cancer. *Scientific reports.* 2015; 5:18217.
113. Weber J, Gibney G, Kudchadkar R, et al. Phase I/II Study of Metastatic Melanoma Patients Treated with Nivolumab Who Had Progressed after Ipilimumab. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(4):345–353.



114. Thakur A, Schalk D, Sarkar SH, et al. A Th1 cytokine-enriched microenvironment enhances tumor killing by activated T cells armed with bispecific antibodies and inhibits the development of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(4):497-509.
115. Mirza N, Fishman M, Fricke I, et al. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66: 9299-9307.
116. Lathers DM, Clark JI, Achille NJ, et al. Phase 1B study to improve immune responses in head and neck cancer patients using escalating doses of 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 422-430.
117. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent anti-tumor immunity. *Cancer Res* 2010; 70:3052-3061.
118. Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, et al. A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res* 2010; 16:4583-94.
119. Wahler J, So JY, Cheng LC, Maehr H, Uskokovic M, Suh N. Vitamin D compounds reduce mammosphere formation and decrease expression of putative stem cell markers in breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015; 148:148-55.
120. Lee HJ, So JY, DeCastro A, et al. Gemini vitamin D analog suppresses ErbB2-positive mammary tumor growth via inhibition of ErbB2/AKT/ERK signaling. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010; 121:408-12.
121. Wiers KM, Lathers DM, Wright MA, et al. Vitamin D3 treatment to diminish the levels of immune suppressive CD34+ cells increases the effectiveness of adoptive immunotherapy. *J Immunother* 2000; 23:115-124.
122. Young MRI, Ihm J, Lozano Y, et al. Treating tumor bearing mice with vitamin D 3 diminishes tumor-induced myelopoiesis and associated immunosuppression, and reduces tumor metastasis and recurrence. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 41:37-45.
123. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI et al. Prognostic effects of 25-hydroxyvitamin D levels in early breast cancer. *J. Clin. Oncol.*2009; 27(23),3757-3763.
124. Monserrat Sanz J, Gómez Lahoz AM, Sosa Reina MD, et al. Introducción al sistema inmune. Componentes celulares del sistema inmune innato. *Medicine*. 2017;12(24):1369-78.
125. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.*2000;80(5):617-53.
126. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.



127. Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(7):1478-83.
128. van Nierop K, de Groot C. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin Immunol.* 2002;14(4):251-7.
129. Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol.* 2002;32(5):1205-11.
130. Bryant VL, Ma CS, Avery DT, et al. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ Tfollicular helper cells. *J Immunol.* 2007;179(12):8180-90.
131. Wang L, Xiong Y, Bosselut R. Maintaining CD4-CD8 lineage integrity in T cells: where plasticity serves versatility. *Semin Immunol.* 2011;23(5):360-7.
132. Xie J, Tato CM, Davis MM. How the immune system talks to itself: the varied role of synapses. *Immunol Rev.* 2016;251(1):65-79.
133. Prieto Martín A, Barbarroja Escudero J, Haro Girón S. Respuesta inmune adaptativa y sus implicaciones fisiopatológicas. *Medicine.* 2016;12(24):30-9.
134. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164.
135. Chen Xin, Oppenheim Joost J. Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *International Immunopharmacol* 2011;11(10):1489-1496.
136. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57–70.
137. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; 144(5):646-674.
138. Johansson M, Denardo DG, Coussens LM. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol. Rev.* 2008;222,145–154.
139. Teng MWL, Swann JB, Koebel CM, et al. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol.*2008;84,988–993.
140. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007; 117(5):1137–46.
141. Yamaguchi R, Perkins G. An Emerging Model for Cancer Development from a Tumor Microenvironment Perspective in Mice and Humans. En: Alexander Birbrair, ed. *Tumor Microenvironment. Recent Advances.* Springer 2020;19-30.
142. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 2007;121(1):1–14.
143. Remon J, García-Campelo R, de Álava E, et al. Liquid biopsy in oncology: a consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish



- Society of Medical Oncology. Clin Transl Oncol 2019. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02211-x>.
144. Wang M, Zhang C, Song Y, et al. Mechanism of immune evasion in breast cancer. *Onco Targets Ther* 2017; 10: 1561–1573.
  145. Solinas C, Gombos A, Latifyan S, et al. Targeting immune checkpoints in breast cancer: an update of early results. *ESMO Open* 2017; 2:e000255.
  146. Herrmann F, Lehr HA, Drexler I, et al. HER-2/neu-mediated regulation of components of the MHC class I antigen-processing pathway. *Cancer Res* 2004; 64: 215–220.
  147. Garrido F, Algarra I, García-Lora AM. The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible 'hard' lesions. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59: 1601–1606.
  148. Kaneko K, Ishigami S, Kijima Y, et al. Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. *BMC Cancer* 2011; 11: 454.
  149. Liu Y, Komohara Y, Domenick N, et al. Expression of antigen processing and presenting molecules in brain metastasis of breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61: 789–801.
  150. Kinig L, Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, et al. The prognostic impact of soluble and vesicular HLA-G and its relationship to circulating tumor cells in neoadjuvant treated breast cancer patients. *Hum Immunol* 2016; 77: 791–799.
  151. Martin-Villalba A, Llorens-Bobadilla E, Wollny D. CD95 in cancer: tool or target? *Trends Mol Med* 2013; 19: 329–335.
  152. Gutierrez LS, Eliza M, Niven-Fairchild T, Naftolin F, Mor G. The Fas/Fas-ligand system: a mechanism for immune evasion in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 54: 245–253.
  153. Ryan BM, Konecny GE, Kahlert S, et al. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1. *Ann Oncol* 2006; 17: 597–604.
  154. Beckers RK, Selinger CI, Vilain R, et al. Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathology* 2016; 69: 25–34.
  155. Li Z, Dong P, Ren M, et al. PD-L1 expression is associated with tumor FOXP3(+) regulatory T-cell infiltration of breast cancer and poor prognosis of patient. *J Cancer* 2016; 7: 784–793.
  156. Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. LAG- 3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: clinical correlates and association with PD-1/PD-L1+ tumors. *Ann Oncol* 2017; 28: 2977–2984.
  157. Zhang H, Xiang R, Wu B, Li J, Luo G. T-cell immunoglobulin mucin-3 expression in invasive ductal breast carcinoma: clinicopathological correlations



- and association with tumor infiltration by cytotoxic lymphocytes. *Mol Clin Oncol* 2017; 7: 557–563.
158. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883–99.
  159. De Nardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2007; 9:212.
  160. Buchsbaum RJ, Oh SY. Breast Cancer-Associated Fibroblasts: Where we are and where we need to go. *Cancers* 2016;8,19.
  161. Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Distinct subsets, distinct functions. *Int. J. Dev. Biol*. 2011; 55: 861–867.
  162. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 2009; 16:183–194.
  163. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Adv Cancer Res*. 2015; 128:95-139.
  164. Yu J, Du W, Yan F, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress Antitumor Immune Responses through IDO Expression and Correlate with Lymph Node Metastasis in Patients with Breast Cancer. *J Immunol* 2013; 190(7):3783-3797.
  165. Yu H, Yang J, Jiao S, Li Y, Zhang W, Wang J. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: Implications for prognosis. *Cancer Immunol. Immunother*. 2015; 64:853–860.
  166. Ren X, Wu H, Lu J, et al. PD1 protein expression in tumor infiltrated lymphocytes rather than PDL1 in tumor cells predicts survival in triple-negative breast cancer. *Cancer Biol. Ther*. 2018; 19:373–380.
  167. Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D, Mamessier E. The PD1/PDL1 axis, a promising therapeutic target in aggressive breast cancers. *Oncoimmunology* 2016;5: e1085148.
  168. Hammerl D, Smid M, Timmermans AM, et al. Breast cancer genomics and immuno-oncological markers to guide immune therapies. *Semin. Cancer Biol*. 2018; 52:178–188.
  169. Whiteside T. *The Local Tumor Microenvironment*, 1st ed.; Springer: Heidelberg, Germany, 2007; 503.
  170. Bense RD, Sotiriou C, Piccart-Gebhart MJ, et al. Relevance of Tumor-Infiltrating Immune Cell Composition and Functionality for Disease Outcome in Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. 2017;109.
  171. Coronella-Wood JA, Hersh EM. Naturally occurring B-cell responses to breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52:715-38.



172. Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J.* 2012; 26(6):2253-76.
173. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M. FOXP3 expression in human cancer cells. *J Transl Med.*2008;6:19-21.
174. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 5373-80.
175. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M. FOXP3 expression in human cancer cells. *J Transl Med.*2008; 6:19-21.
176. Douglass S, Ali S, Meeson AP, Browell D, Kirby JA. The role of FOXP3 in the development and metastatic spread of breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2012; 31:843-54.
177. Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J ClinOncol.* 2010; 28:105-13.
178. Hornychova H, Melichar B, Tomsova M, Mergancova J, Urmanska H, Ryska A. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer Invest.* 2008; 26:1024-31.
179. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumorinfiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14:2413–2420.
180. Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, et al. In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival.*J Pathol.* 2011; 224:389-400.
181. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 5373-80.
182. Douglass S, Ali S, Meeson AP, Browell D, Kirby JA. The role of FOXP3 in the development and metastatic spread of breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2012; 31:843-54.
183. Liu F, Lang R, Zhao J, et al. CD8+ cytotoxic T cell and FOXP3+ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 130:645–655.
184. Tamura K, Shimizu C, Hojo T, et al. FcgammaR2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol* 2011; 22(6):1302-7.





185. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 2004; 10:5650–5655.
186. Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 2015; 26:259-71.
187. Denkert C, Minckwitz G von, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, Pfitzner BM, Salat C, Loi S, Schmitt WD 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; 33:983-91.
188. Issa-Nummer, Darb-Esfahani S, Loibl S, et al. Prospective Validation of Immunological Infiltrate for Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in HER2-Negative Breast Cancer – A Substudy of the Neoadjuvant GeparQuinto Trial. *PLoS One*. 2013; 8(12): e79775.
189. Loi S, Sirtaine N, Piette F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in nodepositive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol* 2013; 31:860–867.
190. Loi S. Tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer subtypes and therapeutic efficacy. *Oncolmmunology* 2013; 2: e24720.
191. Tsang JYS, Ni Y-B, Chan S-K, et al. Increased lymphocytic infiltration in breast cancer correlated with molecular subtypes and HER2 gene amplification. *Histopathology* 2013; 62:963-5.
192. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol* 2014; 25:1536–1543.
193. Liu S, Foulkes WD, Leung S, et al. Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res*. 2014 Sep 6;16(5):432.
194. Liu S, Lachapelle J, Leung S et al. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012; 14: R48.
195. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29:1949–1955.
196. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG et al. An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 127:99–108.



197. Hendrickx W, Simeone I, Anjum S, et al. Identification of genetic determinants of breast cancer immune phenotypes by integrative genome-scale analysis. *Oncoimmunology* 2017; 6(2): e1253654.
198. Bedognetti D, Hendrickx W, Ceccarelli M, Miller LD, Seliger B. Disentangling the relationship between tumor genetic programs and immune responsiveness. *Curr Opin Immunol* 2016; 39:150-8.
199. Granger JM, Kontoyiannis DP. Etiology and outcome of extreme leukocytosis in 758 nonhematologic cancer patients: a retrospective, single-institution study. *Cancer*. 2009;115(17):3919-3923.
200. Shoenfeld Y, Tal A, Berliner S, Pinkhas J. Leukocytosis in non hematological malignancies--a possible tumor-associated marker. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1986;111(1):54-58.
201. Yang L, Liu Q, Zhang X, et al. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature* 2020; 583:133–138.
202. Sevmis M, Yoyen-Ermis D, Aydin C, et al. Splenectomy-Induced Leukocytosis Promotes Intratumoral Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells, Angiogenesis and Metastasis. *Immunol Invest*. 2017; 46(7):663-676.
203. Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, et al. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer *Immunobiology* 2013;218(11):1402–10.
204. Pieterse E, Rother N, Garsen M, Hofstra JM, Satchell SC, Hoffmann M, et al. Neutrophil extracellular traps drive endothelial-to-Mesenchymal transition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(7):1371–9.
205. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(32):13076–81.
206. Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, et al. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* 2007; 67:2649–2656.
207. Maeda R, Ishii G, Neri S, et al. Circulating CD14+CD204+ cells predict postoperative recurrence in non-small-cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2014; 9:179–188.
208. Li C, Luo X, Lin Y, et al. A higher frequency of CD14+CD169+ monocytes/macrophages in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE* 2015; 10:e0141817.
209. Wen J, Ye F, Huang X, et al. Prognostic Significance of Preoperative Circulating Monocyte Count in Patients With Breast Cancer Based on a Large Cohort Study. *Medicine* 94(49):e2266.
210. Tiainen S, Tumelius R, Rilla K, Hämäläinen K, Tammi M, Tammi R, Kosma VM, Oikari S and Auvinen P: High numbers of macrophages, especially M2-like



- (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. *Histopathology*.2015; 66:873–883.
211. Zhang B, Cao M, He Y, et al. Increased circulating M2-like monocytes in patients with breast cancer. *Tumour Biol* 2017 Jun;39(6):1010428317711571.
  212. Ni X-J, Zhang X-L, Ou-Yang Q-W, et al. An Elevated Peripheral Blood Lymphocyte-to-Monocyte Ratio Predicts Favorable Response and Prognosis in Locally Advanced Breast Cancer following Neoadjuvant Chemotherapy. *PLoS ONE* 2014; 9(11): e111886.
  213. Teng J-J, Zhang J, Zhang T-Y, Zhang S, Li B-S. Prognostic value of peripheral blood lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with solid tumors: a meta-analysis. *OncoTargets and therapy*. 2016; 9:37-47.
  214. Stotz M, Pichler M, Absenger G, et al. The preoperative lymphocyte to monocyte ratio predicts clinical outcome in patients with stage III colon cancer. *Br J Cancer*. 2014; 110:435-440.
  215. Wei X, Huang F, Wei Y, et al. Low lymphocyte-to-monocyte ratio predicts unfavorable prognosis in non-germinal center type diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res*. 2014; 38:694–698.
  216. Cho U, Park HS, Im SY, et al. Prognostic value of systemic inflammatory markers and development of a nomogram in breast cancer. *PLoS ONE* 2018; 13(7): e0200936.
  217. Marin Hernandez C, Pinero Madrona A, Gil Vazquez PJ, et al. Usefulness of lymphocyte-to-monocyte, neutrophil-to-monocyte and neutrophil-to-lymphocyte ratios as prognostic markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Clin Transl Oncol*. 2018; 20:476–83.
  218. Xiao-Jian N, Xiao-Lan Z, Qian-Wen OY, et al. An elevated peripheral blood lymphocyte-to-monocyte ratio predicts favorable response and prognosis in locally advanced breast cancer following neoadjuvant chemotherapy. *PLoS One*. 2014;9(11): e111886.
  219. Losada B, Guerra JA, Malón D, et al. Pretreatment neutrophil/lymphocyte, platelet/lymphocyte, lymphocyte/monocyte, and neutrophil/monocyte ratios and outcome in elderly breast cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2019; 21:855–863.
  220. Goto W, Kashiwagi S, Asano Y, et al. Predictive value of lymphocyte-to-monocyte ratio in the preoperative setting for progression of patients with breast cancer. *BMC Cancer* 2018; 18:1137.
  221. Hu R-j, Liu Q, M J-y, et al. Preoperative lymphocyte-to-monocyte ratio predicts breast cancer outcome: A meta-analysis. *Clinica Chimica Acta* 2018 484:1–6.
  222. Zenan H, Zixiong L, Zhicheng Y, et al. Clinical prognostic evaluation of immunocytes in different molecular subtypes of breast cancer. *J Cell Physiol*. 2019; 234:20584–20602.



223. Xu Y, Ju L, Tong J, et al. Supervised Machine Learning Predictive Analytics For Triple-Negative Breast Cancer Death Outcomes. *OncoTargets and Therapy* 2019;12: 9059–9067.
224. Yao M, Liu Y, Jin H, et al. Prognostic value of preoperative inflammatory markers in Chinese patients with breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2014; 7:1743-52.
225. Azab B, Shah N, Radbel J, Tan P, Bhatt V, Vonfrolio S, et al. Pretreatment neutrophil/lymphocyte ratio is superior to platelet/lymphocyte ratio as a predictor of long-term mortality in breast cancer patients. *Med Oncol.* 2013; 30(1):432.
226. Noh H, Eomm M, Han A. Usefulness of pretreatment neutrophil to lymphocyte ratio in predicting disease-specific survival in breast cancer patients. *J Breast Cancer.* 2013; 16:55–9.
227. Templeton AJ, Rodriguez-Lescure A, Ruiz A, et al. Prognostic role for the derived neutrophil-to-lymphocyte ratio in early breast cancer: a GEICAM/9906 substudy. *Clin Transl Oncol* 2018; 20:1548.
228. Jia W, Wu J, Jia H, Yang Y, Zhang X, Chen K, et al. The Peripheral Blood Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio Is Superior to the Lymphocyte-To-Monocyte Ratio for Predicting the Long-Term Survival of Triple- Negative Breast Cancer Patients. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0143061.
229. Vernieri C, Mennitto A, Prisciandaro M, et al. The neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios predict efficacy of platinum-based chemotherapy in patients with metastatic triple negative breast cancer. *Sci Rep.* 2018; 8:8703.
230. Asano Y, Kashiwagi S, Onoda N, et al. Predictive value of neutrophil/lymphocyte ratio for efficacy of preoperative chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2016; 23:1104–10.
231. Chen Y, Chen K, Xiao X, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is correlated with response to neoadjuvant chemotherapy as an independent prognostic indicator in breast cancer patients: a retrospective study. *BMC Cancer.* 2016; 16:320.
232. Krenn-Pilko S, Langsenlehner U, Thurner EM, et al. The elevated preoperative platelet-to-lymphocyte ratio predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Br J Cancer* 2014;110: 2524–30.
233. Dirican A, Kucukzeybek BB, Alacacioglu A, et al. Do the derived neutrophil to lymphocyte ratio and the neutrophil to lymphocyte ratio predict prognosis in breast cancer? *Int J Clin Oncol* 2015; 20(1):70-81.
234. Papatestas AE, Kark AE. Peripheral lymphocyte counts in breast carcinoma: An index of immune competence. *Cancer* 1974; 34:2014-2017.
235. Papatestas AE, Lesnick GJ, Genkins G, Aufses AH Jr. The prognostic significance of peripheral lymphocyte counts in patients with breast carcinoma. *Cancer* 1976; 37:164-168.



236. Ownby HE, Roi LD, Isenberg RR, Brennan MJ. Peripheral lymphocyte and eosinophil counts as indicators of prognosis in primary breast cancer. *Cancer*. 1983; 52:126–30.
237. Qian Y, Tao J, Li X, et al. Peripheral inflammation/immune indicators of chemosensitivity and prognosis in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Onco Targets Ther*. 2018; 11:1423–32.
238. Murta EF, de Andrade JM, Falcão RP, Bighetti S. Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori*. 2000;86(5):403-407.
239. Tsuda B, Miyamoto A, Yokoyama K, et al. B-cell populations are expanded in breast cancer patients compared with healthy controls. *Breast Cancer*. 2018; 25(3):284-291.
240. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132:545–53.
241. Whitford P, Alam SM, George WD, Campbell AM. Flow cytometric analysis of tumour-draining lymph nodes in breast cancer patients. *Eur J Cancer*. 1992;28(2-3):350-356.
242. Lee YT, Marshall GJ, Weiner J, Bateman JR. Peripheral B- and T-lymphocyte counts in patients with sarcoma and breast carcinoma. *Cancer*. 1977;40(2):667-671.
243. Iglesia MD, Vincent BG, Parker JS, et al. Prognostic B-cell signatures using mRNA-seq in patients with subtype-specific breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(14):3818-3829.
244. Schmidt M, Bohm D, von Torne C, et al. The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68:5405–13.
245. Mozaffari F, Lindemalm C, Choudhury A, et al. NK-cell and T-cell functions in patients with breast cancer: effects of surgery and adjuvant chemo- and radiotherapy. *Br J Cancer* 2007; 97(1):105–111.
246. Ostapchuk YO, Cetin EA, Perfilyeva YV, et al. Peripheral blood NK cells expressing HLA-G, IL-10 and TGF-beta in healthy donors and breast cancer patients. *Cell Immunol* 2015;298(1–2): 37–46.
247. Jia Y, Xu L, Lin Q, et al. Levels of lymphocyte subsets in peripheral blood prior treatment are associated with aggressive breast cancer phenotypes or subtypes. *Med Oncol*. 2014;31(6):981.
248. Caras I, Grigorescu A, Stavaru C, et al. Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53(12):1146–1152.
249. Liu X, Ran R, Shao B, et al. Combined peripheral natural killer cell and circulating tumor cell enumeration enhance prognostic efficiency in patients



- with metastatic triple-negative breast cancer. *Chin J Cancer Res.* 2018;30(3):315-326.
250. Nieto-Velázquez NG, Torres-Ramos YD, Muñoz-Sánchez JL, et al. Altered Expression of Natural Cytotoxicity Receptors and NKG2D on Peripheral Blood NK Cell Subsets in Breast Cancer Patients. *Transl Oncol.* 2016;9(5):384-391.
251. Mamessier E, Pradel LC, Thibult ML, et al. Peripheral blood NK cells from breast cancer patients are tumor-induced composite subsets. *J Immunol.* 2013;190(5):2424-2436.
252. Mamessier E, Sylvain A, Thibult ML, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest* 2011;121(9): 3609–3622.
253. Garner WL, Minton JP, James AG, Hoffmann CC. Human breast cancer and impaired NK cell function. *J Surg Oncol* 1983;24(1): 64–66.
254. Muntasell A, Servitja S, Cabo M, et al. High Numbers of Circulating CD57<sup>+</sup> NK Cells Associate with Resistance to HER2-Specific Therapeutic Antibodies in HER2<sup>+</sup> Primary Breast Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(8):1280-1292.
255. Holl EK, Frazier VN, Landa K, Beasley GM, Hwang ES, Nair SK. Examining Peripheral and Tumor Cellular Immunome in Patients With Cancer. *Front Immunol.* 2019;10:1767.
256. Verma C, Kaewkangsadan V, Eremin JM, et al. Natural killer (NK) cell profiles in blood and tumour in women with large and locally advanced breast cancer (LLABC) and their contribution to a pathological complete response (PCR) in the tumour following neoadjuvant chemotherapy (NAC): differential restoration of blood profiles by NAC and surgery. *J Transl Med.* 2015;13:180.
257. Foulds GA, Vadakekolathu J, Abdel-Fatah TMA, et al. Immune Phenotyping and Transcriptomic Profiling of Peripheral Blood Mononuclear Cells From Patients With Breast Cancer: Identification of a 3 Gene Signature Which Predicts Relapse of Triple Negative Breast Cancer. *Front Immunol.* 2018;9:2028.
258. Kim R, Kawai A, Wakisaka M, et al. A potential role for peripheral natural killer cell activity induced by preoperative chemotherapy in breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(4):577-585.
259. Li CH, Kuo WH, Chang WC, Huang SC, Chang KJ, Sheu BC. Activation of regulatory T cells instigates functional down-regulation of cytotoxic T lymphocytes in human breast cancer. *Immunol Res.* 2011;51(1):71-79.
260. Wang ZK, Yang B, Liu H, et al. Regulatory T cells increase in breast cancer and in stage IV breast cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(6):911-916.
261. Liu JT, Yue J, Ren XB, Li H. Measurement of CD4+CD25+ T cells in breast cancer patients and its significance. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2005;27(7):423-425.



262. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol.* 2002;169(5):2756-2761.
263. Song G, Wang X, Jia J, et al. Elevated level of peripheral CD8(+) CD28(-) T lymphocytes are an independent predictor of progression-free survival in patients with metastatic breast cancer during the course of chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62(6):1123-1130.
264. Huang Y, Ma C, Zhang Q, et al. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget.* 2015;6(19):17462-17478.
265. Fu G, Miao L, Wang M, et al. The Postoperative Immunosuppressive Phenotypes of Peripheral T Helper Cells Are Associated with Poor Prognosis of Breast Cancer Patients. *Immunol Invest.* 2017;46(7):647-662.
266. Bailur JK, Gueckel B, Derhovannessian E, Pawelec G. Presence of circulating Her2-reactive CD8 + T-cells is associated with lower frequencies of myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells, and better survival in older breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2015;17(1):34.
267. Liu J, Blake SJ, Yong MC, et al. Improved Efficacy of Neoadjuvant Compared to Adjuvant Immunotherapy to Eradicate Metastatic Disease. *Cancer Discov.* 2016;6(12):1382-1399.
268. Chen R, Chen GP, Wang JH, Chen JM, Lin MQ. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2019;41(11):849-853.
269. Shao B, Li HP, DI LJ, et al. Predictive and prognostic value of monitoring lymphocyte subsets in peripheral blood before and after chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2016;48(2):304-309.
270. Nasr Ghalib N, Nasrullayeva GM, Qaziyev AY, Al-Ali Jawad KH. T- Lymphocyte Subset (CD4 /CD8) Ratios of Breast Cancer Patients in Basra-Iraq and Baku-Azerbaijan. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(S3):175-177.
271. Sevcíková L, Hunáková L, Chorváth B, Turzová M, Boljesíková E. T-lymphocyte subsets (CD4/CD8 ratio) in breast cancer patients. *Neoplasma.* 1992;39(4):219-222.
272. Bilik R, Mor C, Hazaz B, Moroz C. Characterization of T-lymphocyte subpopulations infiltrating primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 1989;28(2):143-147.
273. Sánchez-Margalet V, Barco-Sánchez A, Vilariño-García T, et al. Circulating regulatory T cells from breast cancer patients in response to neoadjuvant chemotherapy. *Transl Cancer Res* 2019;8(1):59-65.
274. Chan MS, Wang L, Felizola SJ, et al. Changes of tumor infiltrating lymphocyte subtypes before and after neoadjuvant endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer patients--an immunohistochemical study of Cd8+ and



- Foxp3+ using double immunostaining with correlation to the pathobiological response of the patients. *Int J Biol Markers*. 2012;27(4):e295-e304.
275. Solis-Castillo LA, Garcia-Romo GS, Diaz-Rodriguez A, et al. Tumor-infiltrating regulatory T cells, CD8/Treg ratio, and cancer stem cells are correlated with lymph node metastasis in patients with early breast cancer [published online ahead of print, 2020 Mar 16]. *Breast Cancer*. 2020;10.1007/s12282-020-01079-y.
276. Whitford P, Mallon EA, George WD, Campbell AM. Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Br J Cancer*. 1990;62(6):971-975.
277. Decker T, Fischer G, Bücke W, et al. Increased number of regulatory T cells (T-regs) in the peripheral blood of patients with Her-2/neu-positive early breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(11):1945-1950.
278. Lin KR, Pang DM, Jin YB, et al. Circulating CD8<sup>+</sup> T-cell repertoires reveal the biological characteristics of tumors and clinical responses to chemotherapy in breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67(11):1743-1752.





## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Definición de tumor primario (T)- Clínico y patológico (8ª edición TNM AJCC).

TX	Primary tumor cannot be assessed	T2	Tumor >20 mm but ≤50 mm in greatest dimension
T0	No evidence of primary tumor	T3	Tumor >50 mm in greatest dimension
Tis (DCIS)*	Ductal carcinoma <i>in situ</i>	T4	Tumor of any size with direct extension to the chest wall and/or to the skin (ulceration or macroscopic nodules); invasion of the dermis alone does not qualify as T4
Tis (Paget)	Paget disease of the nipple NOT associated with invasive carcinoma and/or carcinoma <i>in situ</i> (DCIS) in the underlying breast parenchyma. Carcinomas in the breast parenchyma associated with Paget disease are categorized based on the size and characteristics of the parenchymal disease, although the presence of Paget disease should still be noted	T4a	Extension to the chest wall; invasion or adherence to pectoralis muscle in the absence of invasion of chest wall structures does not qualify as T4
T1	Tumor ≤20 mm in greatest dimension	T4b	Ulceration and/or ipsilateral macroscopic satellite nodules and/or edema (including peau d'orange) of the skin that does not meet the criteria for inflammatory carcinoma
T1mi	Tumor ≤1 mm in greatest dimension	T4c	Both T4a and T4b are present
T1a	Tumor >1 mm but ≤5 mm in greatest dimension (round any measurement >1.0-1.9 mm to 2 mm)	T4d	Inflammatory carcinoma
T1b	Tumor >5 mm but ≤10 mm in greatest dimension		
T1c	Tumor >10 mm but ≤20 mm in greatest dimension		

\*Note: Lobular carcinoma *in situ* (LCIS) is a benign entity and is removed from TNM staging in the AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition.



## Anexo 2. Definición de ganglios linfáticos regionales clínicos (cN) y patológicos (pN) (8º edición TNM AJCC).

Clinical (cN)		Pathologic (pN)	
<b>cNX*</b>	Regional lymph nodes cannot be assessed (e.g., previously removed)	<b>pNX</b>	Regional lymph nodes cannot be assessed (e.g., not removed for pathological study or previously removed)
<b>cN0</b>	No regional lymph node metastases (by imaging or clinical examination)	<b>pN0</b>	No regional lymph node metastasis identified or ITCs only
<b>cN1</b>	Metastases to movable ipsilateral level I, II axillary lymph node(s)	<b>pN0(i+)</b>	ITCs only (malignant cells clusters no larger than 0.2 mm) in regional lymph node(s)
<b>cN1mi**</b>	Micrometastases (approximately 200 cells, larger than 0.2 mm, but none larger than 2.0 mm)	<b>pN0(mol+)</b>	Positive molecular findings by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR); no ITCs detected
<b>cN2</b>	Metastases in ipsilateral level I, II axillary lymph nodes that are clinically fixed or matted; or in ipsilateral internal mammary nodes in the absence of axillary lymph node metastases	<b>pN1</b>	Micrometastases; or metastases in 1–3 axillary lymph nodes; and/or in clinically negative internal mammary nodes with micrometastases or macrometastases by sentinel lymph node biopsy
<b>cN2a</b>	Metastases in ipsilateral level I, II axillary lymph nodes fixed to one another (matted) or to other structures	<b>pN1mi</b>	Micrometastases (approximately 200 cells, larger than 0.2 mm, but none larger than 2.0 mm)
<b>cN2b</b>	Metastases only in ipsilateral internal mammary nodes in the absence of axillary lymph node metastases	<b>pN1a</b>	Metastases in 1–3 axillary lymph nodes, at least one metastasis larger than 2.0 mm
<b>cN3</b>	Metastases in ipsilateral infraclavicular (level III axillary) lymph node(s) with or without level I, II axillary lymph node involvement; or in ipsilateral internal mammary lymph node(s) with level I, II axillary lymph node metastases; or metastases in ipsilateral supraclavicular lymph node(s) with or without axillary or internal mammary lymph node involvement	<b>pN1b</b>	Metastases in ipsilateral internal mammary sentinel nodes, excluding ITCs
<b>cN3a</b>	Metastases in ipsilateral infraclavicular lymph node(s)	<b>pN1c</b>	pN1a and pN1b combined.
<b>cN3b</b>	Metastases in ipsilateral internal mammary lymph node(s) and axillary lymph node(s)	<b>pN2</b>	Metastases in 4–9 axillary lymph nodes; or positive ipsilateral internal mammary lymph nodes by imaging in the absence of axillary lymph node metastases
<b>cN3c</b>	Metastases in ipsilateral supraclavicular lymph node(s)	<b>pN2a</b>	Metastases in 4–9 axillary lymph nodes (at least one tumor deposit larger than 2.0 mm)
	Note: (sn) and (f) suffixes should be added to the N category to denote confirmation of metastasis by sentinel node biopsy or fine needle aspiration/core needle biopsy respectively.	<b>pN2b</b>	Metastases in clinically detected internal mammary lymph nodes with or without microscopic confirmation; with pathologically negative axillary nodes
	*The cNX category is used sparingly in cases where regional lymph nodes have previously been surgically removed or where there is no documentation of physical examination of the axilla.		
	**cN1mi is rarely used but may be appropriate in cases where sentinel node biopsy is performed before tumor resection, most likely to occur in cases treated with neoadjuvant therapy.		

Pathologic (pN)	
<b>pN3</b>	Metastases in 10 or more axillary lymph nodes; or in infraclavicular (level III axillary) lymph nodes; or positive ipsilateral internal mammary lymph nodes by imaging in the presence of one or more positive level I, II axillary lymph nodes; or in more than three axillary lymph nodes and micrometastases or macrometastases by sentinel lymph node biopsy in clinically negative ipsilateral internal mammary lymph nodes; or in ipsilateral supraclavicular lymph nodes
<b>pN3a</b>	Metastases in 10 or more axillary lymph nodes (at least one tumor deposit larger than 2.0 mm); or metastases to the infraclavicular (level III axillary lymph) nodes
<b>pN3b</b>	pN1a or pN2a in the presence of cN2b (positive internal mammary nodes by imaging); or pN2a in the presence of pN1b
<b>pN3c</b>	Metastases in ipsilateral supraclavicular lymph nodes
	Note: (sn) and (f) suffixes should be added to the N category to denote confirmation of metastasis by sentinel node biopsy or FNA/core needle biopsy respectively, with NO further resection of nodes



### Anexo 3. Definición de metástasis a distancia (M) (8º edición TNM AJCC).

#### Distant Metastasis (M)

<b>M0</b>	No clinical or radiographic evidence of distant metastases*
<b>cM0(i+)</b>	No clinical or radiographic evidence of distant metastases in the presence of tumor cells or deposits no larger than 0.2 mm detected microscopically or by molecular techniques in circulating blood, bone marrow, or other nonregional nodal tissue in a patient without symptoms or signs of metastases
<b>cM1</b>	Distant metastases detected by clinical and radiographic means
<b>pM1</b>	Any histologically proven metastases in distant organs; or if in non-regional nodes, metastases greater than 0.2 mm



## Anexo 4. Grupos Estadío Anatómico (8º edición TNM AJCC).

<b>Stage 0</b>	Tis	N0	M0	<b>Stage IIIA</b>	T0	N2	M0
<b>Stage IA</b>	T1	N0	M0		T1	N2	M0
<b>Stage IB</b>	T0	N1mi	M0		T2	N2	M0
	T1	N1mi	M0		T3	N1	M0
<b>Stage IIA</b>	T0	N1	M0		T3	N2	M0
	T1	N1	M0	<b>Stage IIIB</b>	T4	N0	M0
	T2	N0	M0		T4	N1	M0
<b>Stage IIB</b>	T2	N1	M0		T4	N2	M0
	T3	N0	M0	<b>Stage IIIC</b>	Any T	N3	M0
				<b>Stage IV</b>	Any T	Any N	M1

**Notes:**

1. T1 includes T1mi.
2. T0 and T1 tumors with nodal micrometastases (N1mi) are staged as Stage IB.
3. T2, T3, and T4 tumors with nodal micrometastases (N1mi) are staged using the N1 category.
4. M0 includes M0(i+).
5. The designation pM0 is not valid; any M0 is clinical.
6. If a patient presents with M1 disease prior to neoadjuvant systemic therapy, the stage is considered Stage IV and remains Stage IV regardless of response to neoadjuvant therapy.
7. Stage designation may be changed if postsurgical imaging studies reveal the presence of distant metastases, provided the studies are performed within 4 months of diagnosis in the absence of disease progression, and provided the patient has not received neoadjuvant therapy.
8. Staging following neoadjuvant therapy is designated with "yc" or "yp" prefix to the T and N classification. There is no anatomic stage group assigned if there is a complete pathological response (pCR) to neoadjuvant therapy, for example, ypT0ypN0cM0.



## Anexo 5. Grupos Estadío Pronóstico Clínico (8º edición TNM AJCC).

TNM	Grade	HER2	ER	PR	Stage	
Tis N0 M0	Any	Any	Any	Any	0	
T1* N0 M0 T0 N1mi M0 T1* N1mi M0	G1	Positive	Positive	Positive	IA	
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
		Negative	Positive	Negative		IB
			Negative	Positive		
			Negative	Negative		
	G2	Positive	Positive	Positive	IA	
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
		Negative	Positive	Negative		IB
			Negative	Positive		
			Negative	Negative		
	G3	Positive	Positive	Positive	IA	
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
		Negative	Positive	Negative		IB
			Negative	Positive		
			Negative	Negative		

TNM	Grade	HER2	ER	PR	Stage	
T0 N1** M0 T1* N1** M0 T2 N0 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IB	
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
		Negative	Positive	Negative		IIA
			Negative	Positive		
			Negative	Negative		
	G2	Positive	Positive	Positive	IB	
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
		Negative	Positive	Negative		IIA
			Negative	Positive		
			Negative	Negative		
	G3	Positive	Positive	Positive	IB	
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
		Negative	Positive	Negative		IIA
			Negative	Positive		
			Negative	Negative		

TNM	Grade	HER2	ER	PR	Stage	
T2 N1*** M0 T3 N0 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IB	
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
		Negative	Positive	Negative		IIA
			Negative	Positive		
			Negative	Negative		
	G2	Positive	Positive	Positive	IIA	
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
		Negative	Positive	Negative		IIB
			Negative	Positive		
			Negative	Negative		
	G3	Positive	Positive	Positive	IIB	
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
		Negative	Positive	Negative		IIIA
			Negative	Positive		
			Negative	Negative		

TNM	Grade	HER2	ER	PR	Stage	
T0 N2 M0 T1* N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1*** M0 T3 N2 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IIA	
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
		Negative	Positive	Negative		IIA
			Negative	Positive		
			Negative	Negative		
	G2	Positive	Positive	Positive	IIA	
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
		Negative	Positive	Negative		IIIA
			Negative	Positive		
			Negative	Negative		
	G3	Positive	Positive	Positive	IIB	
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
		Negative	Positive	Negative		IIIA
			Negative	Positive		
			Negative	Negative		



TNM	Grade	HER2	ER	PR	Stage	
T4 N0 M0 T4 N1*** M0 T4 N2 M0 Any T N3 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IIIA	
			Negative	Negative		
		Negative	Positive	Positive		IIIB
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
			Negative	Negative		
	G2	Positive	Positive	Positive	IIIA	
			Negative	Negative		
		Negative	Positive	Positive		IIIB
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
			Negative	Negative		
	G3	Positive	Positive	Positive	IIIB	
			Negative	Negative		
		Negative	Positive	Positive		IIIB
			Negative	Negative		
			Positive	Positive		
			Negative	Negative		
Any T Any N M1	Any	Any	Any	Any	IV	

**Notes:**

1. Because N1mi categorization requires evaluation of the entire node, and cannot be assigned on the basis of an FNA or core biopsy, N1mi can only be used with Clinical Prognostic Staging when clinical staging is based on a resected lymph node in the absence of resection of the primary cancer, such as the situation where sentinel node biopsy is performed prior to receipt of neoadjuvant chemotherapy or endocrine therapy.
2. For cases with lymph node involvement with no evidence of primary tumor (e.g. T0 N1, etc.) or with breast ductal carcinoma *in situ* (e.g. Tis N1, etc.), the grade, HER2, ER, and PR information from the tumor in the lymph node should be used for assigning stage group.
3. For cases where HER2 is determined to be "equivocal" by ISH (FISH or CISH) testing under the 2013 ASCO/CAP HER2 testing guidelines, the HER2 "negative" category should be used for staging in the Clinical Prognostic Stage Group.
4. The prognostic value of these Prognostic Stage Groups is based on populations of persons with breast cancer that have been offered and mostly treated with appropriate endocrine and/or systemic chemotherapy (including anti-HER2 therapy).



## Anexo 6. Grupos Estadio Pronóstico Patológico (8º edición TNM AJCC).

TNM	Grade	HER2	ER	PR	Stage
Tis N0 M0	Any	Any	Any	Any	0
T1* N0 M0 T0 N1mi M0 T1* N1mi M0	G1	Positive	Positive	Positive	IA
			Positive	Negative	
			Negative	Positive	
		Negative	Positive	Positive	
			Positive	Negative	
			Negative	Positive	
	G2	Positive	Positive	Positive	IA
			Positive	Negative	
			Negative	Positive	
		Negative	Positive	Positive	
			Positive	Negative	
			Negative	Positive	
G3	Positive	Positive	Positive	IA	
		Positive	Negative		
		Negative	Positive		
	Negative	Positive	Positive		
		Positive	Negative		
		Negative	Positive		

TNM	Grade	HER2	ER	PR	Stage
T0 N1** M0 T1* N1** M0 T2 N0 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IA
Positive			Negative	IB	
Negative			Positive	IIA	
Negative			Positive	Positive	IA
			Positive	Negative	IB
			Negative	Positive	IIA
G2		Positive	Positive	Positive	IA
			Positive	Negative	IB
			Negative	Positive	IIA
		Negative	Positive	Positive	IA
			Positive	Negative	IIA
			Negative	Positive	IIA
G3	Positive	Positive	Positive	IA	
		Positive	Negative	IIA	
		Negative	Positive	IB	
	Negative	Positive	Positive	IIA	
		Positive	Negative	IIA	
		Negative	Positive	IIA	

TNM	Grade	HER2	ER	PR	Stage
T2 N1*** M0 T3 N0 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IA
Positive			Negative	IB	
Negative			Positive	IIA	
Negative			Positive	Positive	IA
			Positive	Negative	IB
			Negative	Positive	IIA
G2		Positive	Positive	Positive	IB
			Positive	Negative	IIA
			Negative	Positive	IB
		Negative	Positive	Positive	IB
			Positive	Negative	IIA
			Negative	Positive	IIA
G3	Positive	Positive	Positive	IB	
		Positive	Negative	IIA	
		Negative	Positive	IIA	
	Negative	Positive	Positive	IIA	
		Positive	Negative	IIA	
		Negative	Positive	IIIA	

TNM	Grade	HER2	ER	PR	Stage
T0 N2 M0 T1* N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1*** M0 T3 N2 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IB
Positive			Negative	IIIA	
Negative			Positive	IIIA	
Negative			Positive	Positive	IB
			Positive	Negative	IIIA
			Negative	Positive	IIIA
G2		Positive	Positive	Positive	IB
			Positive	Negative	IIIA
			Negative	Positive	IB
		Negative	Positive	Positive	IIIA
			Positive	Negative	IIIA
			Negative	Positive	IIIB
G3	Positive	Positive	Positive	IIA	
		Positive	Negative	IIIA	
		Negative	Positive	IIIA	
	Negative	Positive	Positive	IIA	
		Positive	Negative	IIIA	
		Negative	Positive	IIIA	



TNM	Grade	HER2	ER	PR	Stage
T4 N0 M0 T4 N1*** M0 T4 N2 M0 Any T N3 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IIIA
			Negative	Negative	IIIB
			Negative	Negative	IIIB
		Negative	Positive	Positive	IIIA
			Negative	Positive	IIIB
			Negative	Negative	IIIB
	G2	Positive	Positive	Positive	IIIA
			Negative	Negative	IIIB
			Negative	Negative	IIIB
		Negative	Positive	Positive	IIIA
			Negative	Negative	IIIB
			Negative	Positive	IIIB
G3	Positive	Positive	Positive	IIIA	
		Negative	Negative	IIIB	
		Negative	Negative	IIIB	
	Negative	Positive	Positive	IIIA	
		Negative	Negative	IIIB	
		Negative	Positive	IIIC	
Any T Any N M1	Any	Any	Any	Any	IV





## **ANEXO 7. Consentimiento informado. Hoja de información al paciente.**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE**

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

**TÍTULO: "RESPUESTA COMPLETA PATOLÓGICA Y MODIFICACIÓN DEL PATRÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DEL TUMOR Y LINFOCITOS T-REGULADORES DEL TUMOR Y SANGUÍNEOS TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN PACIENTES DE CÁNCER DE MAMA".**

Usted ha sido diagnosticada de un cáncer de mama en una fase en la que podrá ser tratada con quimioterapia antes de someterse a cirugía, en función de los estándares actuales vigentes, como tratamiento más eficaz de su enfermedad.

En el Hospital Virgen Macarena se está desarrollando un proyecto de investigación para tratar de cuantificar la respuesta inmune (células del sistema de defensa de nuestro organismo) en el seno del tumor antes y después de recibir la quimioterapia con el fin de conocer el valor pronóstico de la presencia de dicha respuesta en la zona donde se encuentra el tumor.

#### **Importancia:**

Este estudio puede ayudar a conocer más y mejor su enfermedad, lo que puede ayudar a diseñar mejor los tratamientos en un futuro inmediato.

Su participación en esta investigación no supone ningún beneficio directo para usted, si bien otros pacientes en el futuro podrían beneficiarse de los resultados de su colaboración.

#### **Implicaciones para la paciente:**

- Su participación es totalmente voluntaria.
- Usted podrá retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Con el fin de garantizar la fiabilidad de los datos recogidos en este estudio y de dar cumplimiento a la normativa vigente, puede ser necesario que miembros del equipo investigador, Autoridades Sanitarias, o miembros del Comité Ético de Investigación Clínica tengan acceso a sus datos personales, comprometiéndose a la más estricta confidencialidad.

Toda su información de carácter personal se tratará con arreglo a la Directiva 95/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de octubre de 1995, relativa a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales, a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y a su normativa de desarrollo.



- La información que se solicita es necesaria para el desarrollo del estudio científico y se encontrará referenciada por medio de un código numérico asignado por orden de entrada en el estudio, no vinculados en ningún caso con su nombre y apellidos. Los resultados del estudio podrán ser dados a conocer a la comunidad científica a través de congresos o publicaciones, de forma que no sea posible la identificación de los participantes en el mismo. La información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

De acuerdo con la ley vigente, tiene usted derecho al acceso de sus datos personales y a su rectificación, cancelación y oposición, que podrá ejercer dirigiéndose al médico que le atiende en este estudio.

### **Riesgos de la investigación para el paciente:**

#### Descripción de las pruebas

Para participar en el estudio necesitamos que nos permita obtener una muestra de 10 ml sangre periférica antes del inicio de la quimioterapia, después de cada ciclo de tratamiento y tras la cirugía.

Este procedimiento no supondrá ningún riesgo ni molestia para usted, ya que la extracción se hará coincidir con una venopunción prevista en las pruebas de vigilancia que su oncólogo indicará y que son las habituales para el seguimiento de su enfermedad, por lo que no será necesario realizar ningún procedimiento adicional ni exploración.

El estudio del tejido tumoral se realizará aprovechando las muestras obtenidas en la biopsia realizada cuando se le diagnosticó el cáncer de mama y en la que se realizará tras la intervención quirúrgica.

Tampoco hay programada ninguna visita específica para este estudio, ya que se llevará a cabo coincidiendo con las visitas de vigilancia habituales de su enfermedad.

Adicionalmente a la extracción de la muestra, se recogerán datos relativos a la evolución de su enfermedad.

### **Información adicional:**

Su médico estará encantado de contestar cualquier pregunta adicional que usted pudiera tener. Si las investigaciones adicionales hacen surgir nuevas circunstancias que hagan necesario obtener su consentimiento para continuar en el estudio, su médico le informará en seguida.

Se le proporcionará una copia de esta hoja de información y de su consentimiento informado firmado, para que los guarde.

El médico que proporciona la información es:

Nombre: \_\_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_



## ANEXO 8. Consentimiento informado. Hoja de consentimiento por escrito del paciente.

### CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

TÍTULO: "RESPUESTA COMPLETA PATOLÓGICA Y MODIFICACIÓN DEL PATRÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DEL TUMOR Y LINFOCITOS T-REGULADORES DEL TUMOR Y SANGUÍNEOS TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN PACIENTES DE CÁNCER DE MAMA".

Yo (Nombre y Apellidos): .....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente).
- He podido hacer preguntas sobre el estudio "RESPUESTA COMPLETA PATOLÓGICA Y MODIFICACIÓN DEL PATRÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DEL TUMOR Y LINFOCITOS T-REGULADORES DEL TUMOR Y SANGUÍNEOS TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN PACIENTES DE CÁNCER DE MAMA".
- He recibido suficiente información sobre el estudio "RESPUESTA COMPLETA PATOLÓGICA Y MODIFICACIÓN DEL PATRÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DEL TUMOR Y LINFOCITOS T-REGULADORES DEL TUMOR Y SANGUÍNEOS TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN PACIENTES DE CÁNCER DE MAMA".
- He hablado con el profesional sanitario informador: .....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

▪ Si

207

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000049978

CSV

GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular



- No
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
  - Cuando quiera
  - Sin tener que dar explicaciones
  - Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos
- Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado "RESPUESTA COMPLETA PATOLÓGICA Y MODIFICACIÓN DEL PATRÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DEL TUMOR Y LINFOCITOS T-REGULADORES DEL TUMOR Y SANGUÍNEOS TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN PACIENTES DE CÁNCER DE MAMA"*

Firma de la paciente  
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional  
sanitario informador

Nombre y apellidos: .....

Nombre y apellidos: .....

Fecha: .....



## ANEXO 9. Esquema de visitas y procedimientos.

### ESQUEMA DE VISITAS Y PROCEDIMIENTOS DURANTE EL ESTUDIO

	ANTES DE INICIAR QT (BASAL)	ANTES DE CADA CICLO*	TRAS 3º CICLO	TRAS 6º CICLO	TRAS CIRUGÍA
<b>Consentimiento informado</b>	X				
<b>Datos demográficos</b>	X				
<b>Historia clínica y anamnesis</b>	x		x	x	
<b>Exploración física y valoración respuesta clínica</b>	x	x	x	x	x
<b>Hemograma</b>					
Hemoglobina					
Leucocitos					
Neutrófilos	x	x	x	x	
Linfocitos					
Monocitos					
Plaquetas					
Tiempos					
Coagulación					
<b>Bioquímica</b>					
Urea/BUN					
Proteínas totales					
Ácido úrico					
Creatinina					
GOT	x	x	x	x	
GPT					
GGT					
LDH					
Fosfatasas alcalinas					
BT					
<b>Test de gestación</b>	X				
<b>Marcadores tumorales</b>	X			x	X



Inmunofenotipo sérico	x		X	x	X
Vitamina D	X				
Valoración de respuesta. Senografía mamas y/o RNM	x		x		
Estudio histopatológico TIL	X				x

\*Aunque a las pacientes se le realizó estudio analítico en cada ciclo de tratamiento para pautar el tratamiento, para el análisis de resultados del estudio se han tomado los 3 puntos destacados durante el tratamiento (basal, C3, C6).



## ANEXO 10. Informe favorable del Comité de Ética de la Investigación (CEI).



Informe Dictamen Favorable  
Proyecto Investigación Biomédica

C.P. LCM-INM-2015-01 - C.I.

03 de julio de 2015

### CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

Dr. Víctor Sánchez Margalet  
Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

#### CERTIFICA

1º. Que el CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío en su reunión del día 30/06/2015, acta 06/2015 ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

**Título:** ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO

**Código Promotor:** LCM-INM-2015-01 **Código Interno:**

**Promotor:** Investigador

**Representante Legal:**

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEI emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

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

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y  
Virgen del Rocío

Dr. Luis De la Cruz Merino  
(*Oncología Médica*) Hospital Universitario Virgen  
Macarena

Lo que firmo en Sevilla, a 03 de julio de 2015

Fdo: NOMBRE  
SANCHEZ  
MARGALET  
VICTOR MANUEL -  
NIF 28691159Q

Firmado digitalmente por  
NOMBRE SANCHEZ MARGALET  
VICTOR MANUEL - NIF 28691159Q  
Nombre de reconocimiento (DN):  
cn=SANCHEZ MARGALET VICTOR  
MANUEL - NIF 28691159Q  
Fecha: 2015.07.03 12:47:03 +02'00'

Dr. Víctor Sánchez Margalet  
Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena – Virgen del Rocío de Sevilla

Página 1 de 1

Avda. Manuel Siurot, s/n – Edificio de Laboratorios 6ª planta Sevilla 41013 Sevilla España

Tel. 600 162 458 Fax. 955 00 80 15 Correo electrónico administracion.eecc.hvm.sspa@juntadeandalucia.es



**D. CARLOS GARCÍA PÉREZ,**  
**SECRETARIO TÉCNICO DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE LOS**  
**HOSPITALES UNIVERSITARIOS VIRGEN MACARENA – VIRGEN DEL ROCIO DE**  
**SEVILLA**

**HACE CONSTAR**

Que el proyecto titulado CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL INMUNITARIO EN SANGRE PERIFÉRICA Y EN TEJIDO DE CARCINOMA DE MAMA CON TRATAMIENTO NEOADYUVANTE. ESTUDIO DE SU POTENCIAL PAPEL PRONÓSTICO Y PREDICTIVO DE RESPUESTA es un subproyecto que forma parte del proyecto global titulado "ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESPUESTA INMUNE EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDO POR TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CARCINOMA DE MAMA AVANZADO", habiendo sido aprobado éste último por el CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena – Virgen del Rocío de Sevilla, el 03/07/2015

Y para que así conste, firmo la presente en Sevilla, en la fecha indicada en la firma realizada con certificado digital del documento

**GARCIA PEREZ**  
**JOSE CARLOS**  
**- 52664213D**

Firmado digitalmente  
por GARCIA PEREZ JOSE  
CARLOS - 52664213D  
Fecha: 2020.10.02  
08:34:50 +02'00'

**Hospital Universitario Virgen Macarena**

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena – Virgen del Rocío de Sevilla

Tfno: 600162458

Email: administracion.eecc.hvm.sspa@juntadeandalucia.es





## 9. ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Grado histológico combinado de Nottingham.

**Tabla 2.** Subtipos de carcinoma de mama. Características moleculares e inmunohistoquímica - Subtipos orientados al tratamiento.

**Tabla 3.** Grupos Estadio Anatómico (8º edición TNM AJCC).

**Tabla 4.** Análisis univariante y multivariante de los factores pronósticos y su influencia en la supervivencia específica de enfermedad (DSS).

**Tabla 5.** Supervivencia global (SG) y supervivencia específica de enfermedad (DSS) determinados al añadir el perfil de riesgo (0-3 puntos) de los biomarcadores (grado, RE, estado HER2) al estadio patológico de la 7ª Edición TNM AJCC.

**Tabla 6.** Criterios de selección en cáncer de mama para el estudio genético en línea germinal.

**Tabla 7.** Prevención en portadores de mutación genética para síndrome de cáncer de mama y ovario hereditarios.

**Tabla 8.** Sistema de evaluación de la respuesta completa patológica.

**Tabla 9.** Seguimiento del carcinoma de mama estadio temprano.

**Tabla 10.** Extracción de muestras en cohorte de pacientes y cohorte de sanas.

**Tabla 11.** Características clínico-epidemiológicas de la cohorte de pacientes.

**Tabla 12.** Datos del estadio pre/post-QTNA y respuestas completas patológicas alcanzadas en la cohorte de pacientes.

**Tabla 13.** Medianas (IC 95%) de niveles (cels/ul) y ratios basales de poblaciones celulares del sistema inmunitario en sangre periférica en sanas versus pacientes.

**Tabla 14.** Medianas (IC 95%) de niveles (ng/mL) basales de vitamina D en sangre periférica en sanas versus pacientes.

**Tabla 15.** Correlación entre los valores basales de vitamina D y las poblaciones celulares en sangre periférica en cohorte de sanas mediante coeficiente de correlación de Spearman.

**Tabla 16.** Correlación entre los valores basales de vitamina D y ratio de poblaciones celulares en sangre periférica en cohorte de sanas mediante coeficiente de correlación de Spearman.



**Tabla 17.** Correlación entre los valores basales de vitamina D y las poblaciones celulares en cohorte de enfermas mediante coeficiente de correlación de Spearman.

**Tabla 18.** Correlación entre los valores basales de vitamina D y ratio de poblaciones celulares en sangre periférica en cohorte de enfermas mediante coeficiente de correlación de Spearman.

**Tabla 19.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica y en tejido según respuesta patológica evaluada por estadio TNM patológico.

**Tabla 20.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica y en tejido según respuesta patológica evaluada por sistema de Miller & Payne.

**Tabla 21.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares (ratios) medidas en sangre periférica según respuesta patológica evaluada por estadio TNM patológico.

**Tabla 22.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares (ratios) medidas en sangre periférica según respuesta patológica evaluada por sistema de Miller & Payne.

**Tabla 23.** Comparativa de los valores basales (medianas e IC 95%) de las poblaciones celulares (cels/ul) en sangre periférica de cohorte sana con los valores post-tratamiento (C6) de los pacientes en RCp medida por sistema TNM patológico y valores p.

**Tabla 24.** Comparativa de los valores basales (medianas e IC 95%) de las poblaciones celulares (cels/ul) en sangre periférica de cohorte sana con los valores post-tratamiento (C6) de los pacientes en RCp medida por sistema de Miller & Payne y valores p.

**Tabla 25.** Comparativa de los valores basales de las poblaciones celulares (ratio) en sangre periférica de cohorte sana con los valores post-tratamiento (C6) de los pacientes en RCp medida por sistema de Miller & Payne (M&P) y TNM patológico, valores p.

**Tabla 26.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica y en tejido según supervivencia (SLE y SG).

**Tabla 27.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares (ratio) medidas en sangre periférica según supervivencia (SLE y SG).

**Tabla 28.** Comparativa de los valores basales (medianas e IC 95%) de las poblaciones celulares (cels/ul) en sangre periférica de cohorte sana con los valores post-tratamiento (C6) de los pacientes con SLE/SLED y SG > media y valores p.



**Tabla 29.** Comparativa de los ratios basales de las poblaciones celulares en sangre periférica de cohorte sana con los valores post-tratamiento (C6) de los pacientes con SLE/SLED y SG > media y valores p.

**Tabla 30.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica y en tejido según estadio TNM pre-QTNA.

**Tabla 31.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares (ratios) medidas en sangre periférica según estadio TNM clínico.

**Tabla 32.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica según inmunofenotipo.

**Tabla 33.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares (ratios) medidas en sangre periférica según inmunofenotipo.

**Tabla 34.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en tejido según inmunofenotipo.

**Tabla 35.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica y en tejido según expresión HER2.

**Tabla 36.** Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares (ratio) medidas en sangre periférica según expresión HER2.



## 10. ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Respuesta según Sistema de Miller & Payne.
- Figura 2.** Tasa respuesta según sistema TNM Patológico.
- Figura 3.** Curvas Kaplan Meier de SLE, SLED y SG a 5 años.
- Figura 4.** SLE a los 5 años según respuesta patológica medida por Sistema de Miller & Payne.
- Figura 5.** SLE a los 5 años según respuesta patológica medida por estadio TNM Patológico.
- Figura 6.** SG a los 5 años según respuesta patológica medida por Sistema de Miller & Payne.
- Figura 7.** SG a los 5 años según respuesta patológica medida por estadio TNM Patológico.
- Figura 8.** Curvas Kaplan Meier de SLE, SLED y SG a 9 años.
- Figura 9.** SLE a los 9 años según respuesta patológica medida por Sistema de Miller & Payne.
- Figura 10.** SLE a los 9 años según respuesta patológica medida por estadio TNM patológico.
- Figura 11.** SG a los 9 años según respuesta patológica medida por Sistema Miller & Payne.
- Figura 12.** SG a los 9 años según respuesta patológica medida por estadio TNM patológico.
- Figura 13.** SLE, SLED y SG a los 9 años según inmunofenotipo.
- Figura 14.** SLE, SLED y SG a los 9 años según sobreexpresión HER2.
- Figura 15.** Medianas (IC 95%) de niveles (cels/ul) y ratios basales de poblaciones celulares del sistema inmunitario en sangre periférica en sanas versus pacientes.
- Figura 16.** Medianas (IC 95%) de niveles (ng/mL) basales de vitamina D en sangre periférica en sanas versus pacientes.
- Figura 17.** Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama (estadio TNM patológico).



**Figura 18.** Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica ganglionar (estadio TNM patológico).

**Figura 19.** Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama y ganglionar (estadio TNM patológico).

**Figura 20.** Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama (Sistema de gradación de Miller & Payne).

**Figura 21.** Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica ganglionar (Sistema de gradación de Miller & Payne).

**Figura 22.** Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama y ganglionar (Sistema de gradación de Miller & Payne).

**Figura 23.** Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama (estadio TNM patológico).

**Figura 24.** Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica ganglionar (estadio TNM patológico).

**Figura 25.** Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama y ganglionar (estadio TNM patológico).

**Figura 26.** Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama (sistema de Miller & Payne).

**Figura 27.** Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama (sistema de Miller & Payne).



diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en axila (sistema de Miller & Payne).

**Figura 28.** Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8 y FOXP3 en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama y ganglionar (sistema de Miller & Payne).

**Figura 29.** Niveles de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) y ratios antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según supervivencia libre de enfermedad (SLE).

**Figura 30.** Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según supervivencia libre de enfermedad (SLE).

**Figura 31.** Niveles de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) y ratios antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según supervivencia global (SG).

**Figura 32.** Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según supervivencia global (SG).

**Figura 33.** Niveles de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según estadio pre-QTNA.

**Figura 34.** Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según estadio TNM pre-QTNA.

**Figura 35.** Niveles de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según inmunofenotipo.

**Figura 36.** Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según inmunofenotipo.

**Figura 37.** Niveles de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según expresión HER2.



**Figura 38.** Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según expresión HER2.

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**



## 11. ACTIVIDADES CIENTÍFICAS RELACIONADAS

### PREMIOS CONCEDIDOS

- **Palazón Carrión N**, de la Cruz Merino L. Caracterización del perfil inmunológico y de la vitamina D en sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama precoz y avanzado. **Segunda Convocatoria del Programa de Ayudas a Proyectos de Investigación Relacionados con el Cáncer de Mama. ADAMED y la Fundación Española de Cáncer de Mama (FECMA), edición 2019.** 12 marzo 2020.
- **Palazón Carrión N.** Efectos inmunomoduladores de la vitamina D en el carcinoma de mama. **Premio Doctor Moreno Nogueira a la mejor hipótesis en Oncología Médica, edición 2018.** Granada, 12 marzo 2019.
- **Palazón Carrión N**, Jiménez Cortegana C, Holgado E, Cruz J, et al. Myeloid-derived suppressor cells evolution in advanced breast cancer and comparative analysis with a healthy population cohort. **Premio 1º Comunicación oral. 12º Simposio Internacional GEICAM.** Toledo, 29 marzo 2019.
- Sánchez Margalet V, Barco Sánchez A, Vilariño García T, Jiménez Cortegana C, **Palazón Carrión N**, de la Cruz Merino L. Aumento del cociente CD8/Treg en pacientes con cáncer de mama en respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante. **Premio Comité Científico. XXVI Reunión Científica de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos y Medicina de Laboratorio (SANAC).** Marbella, 9 marzo 2019.

### PUBLICACIONES

- **Palazón Carrión N**, Jiménez Cortegana C, Sánchez León ML, Henao Carrasco F, Nogales Fernández E, Sánchez Margalet V, de la Cruz Merino L. Evolution of cytotoxic and regulatory T cells in blood and in tissue after neoadjuvant treatment in breast carcinoma. *Annals of Oncology*. Volume 31, Supplement 2. May 2020. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.03.150>
- **Palazón Carrión N**, Jiménez Cortegana C, Holgado E, et al. Evolution of the myeloid-derived suppressor cells in advanced breast cancer and comparative analysis with a healthy population cohort. *Journal of Clinical Oncology* 37, no. 15\_suppl (May 20 2019) 2543-2543. Published online May 26, 2019. doi: 10.1200/JCO.2019.37.15\_suppl.2543





- **Palazón Carrión N**, Sánchez León ML, Jiménez Cortegana C, et al. Myeloid derived-suppressor cells in healthy women and in advanced breast cancer patients. *Annals of Oncology*. Volume 30, Supplement 3. May 2019. doi:10.1093/annonc/mdz095
- Sánchez Margalet V, Barco Sánchez A, Vilariño García T, Jiménez Cortegana C, Pérez Pérez A, Henao Carrasco F, Virizuela Echaburu JA, Nogales Fernández E, Álamo de la Gala MC, Lobo Acosta MA, **Palazón Carrión N**, Nieto A, de la Cruz Merino L. Circulating regulatory T cells from breast cancer patients in response to neoadjuvant chemotherapy. *Transl Cancer Res* 2019;8(1):59-65. doi: 10.21037/tcr.2018.12.30
- **Palazón Carrión N**, Torres A, Sevilla L, Valdivia FJ, Espejo P, de la Cruz L. Cambios acontecidos en el microambiente inmune tumoral tras tratamiento neoadyuvante. A propósito de un caso clínico de cáncer de mama. XI Concurso +mir de Casos Clínicos para Residentes de Oncología Médica 2018. [Internet]. SEOM-Roche. 2018. ISBN: 978-84-17372-36-1. Available at: <http://www.seom.org/es/publicaciones/publicaciones-seom/residentes>.
- Luis de la Cruz Merino, **Natalia Palazón Carrión**, Fernando Henao Carrasco, Esteban Nogales Fernández, Mari Carmen Álamo de la Gala, Ana Vallejo Benítez, Massimo Chiesa, Victor Sanchez Margalet. New horizons in breast cancer: the promise of immunotherapy. *Clinical and Translational Oncology*, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1907-3>
- L. de la Cruz-Merino, M. Chiesa, R. Caballero, F. Rojo, **N. Palazón**, F.H. Carrasco, V. Sánchez-Margalet. Chapter: Breast Cancer Immunology and Immunotherapy, *New Avenues for Translational Research*. [Internet]. Elsevier. 2016. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.09.008>

### COMUNICACIONES A CONGRESOS

- **Palazón Carrión N**, Jiménez Cortegana C, Holgado E, et al. **Oral**: Evolución de las células supresoras derivadas de línea mieloide (MDSCs) en cáncer de mama avanzado y comparativa con cohorte sana. Congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) 2019. Pamplona, 22-25 marzo 2019.
- Sánchez Margalet V, Barco Sánchez A, Vilariño García T, Jiménez Cortegana C, **Palazón Carrión N**, de la Cruz Merino L. **Oral**: Aumento del cociente CD8/Treg en pacientes con cáncer de mama en respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante. XXVI Reunión Científica de la



Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos y Medicina del Laboratorio. Marbella, 7-9 marzo 2019.

- **Palazón Carrión N. Oral:** Potencial de las células mieloides supresoras (MDSC) como diana terapéutica. V Foro de inmunología e inmunoterapia del cáncer. GÉTICA. Madrid, 7-9 marzo 2019.
- **Palazón Carrión N, Jiménez Cortegana C, Sánchez León ML, et al. E-Póster:** Evolution of cytotoxic and regulatory T cells in blood and in tissue after neoadjuvant treatment in breast carcinoma. Virtual ESMO Breast 2020. 23-24 noviembre, 2020.
- **Palazón Carrión N, Jiménez-Cortegana C, Holgado E, et al. Póster:** Evolution of the myeloid-derived suppressor cells in advanced breast cancer and comparative analysis with a healthy population cohort. ASCO 2019. Chicago, 31 mayo-04 junio, 2019.
- Sánchez León ML, **Palazón Carrión N, Jiménez Cortegana C, et al. Póster:** Cambios inmunogénicos acontecidos en sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama metastásico en tratamiento sistémico. 12º Simposio Internacional GEICAM. Toledo, 28-29 marzo 2019.
- **Palazón Carrión N, Jiménez Cortegana C, Barco A, et al. Póster:** Linfocitos T reguladores en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama en respuesta a quimioterapia neoadyuvante. V Foro de Inmunología Traslacional e Inmunoterapia del Cáncer- FIT Cáncer 5. GÉTICA. Madrid, 7-9 marzo 2019.
- **Palazón Carrión N, Espejo P, Saavedra O, et al. E-Póster:** Cambios acontecidos en FOXP3 y CD8+ en cáncer de mama localmente avanzado tras neoadyuvancia. Indicadores pronósticos y predictivos. Congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) 2018. Madrid, 25-28 septiembre 2018.
- **Palazón Carrión N, Vallejo A, Henao F, et al. Póster:** Cáncer de mama: Papel de CD8/Foxp3 en la respuesta a quimioterapia neoadyuvante y datos de supervivencia. IV FORO de Inmunología Traslacional e Inmunoterapia del Cáncer. FIT CANCER 4. Madrid, 8-10 marzo 2018.



ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**00008745e2000049978**

CSV

**GEISER-f0c2-a3f2-2b7a-49c8-9fc5-f1a9-9579-7cf7**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**15/10/2020 07:49:58 Horario peninsular**

