



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESPECIALIDAD EN ONCOLOGÍA MÉDICA

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
“SALVADOR ZUBIRÁN”**

**“NEUTRÓFILOS INFILTRANTES DE TUMOR EN DIFERENTES SUBTIPOS
MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA LOCALIZADO”**

**TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA

ENRIQUE SOTO PÉREZ DE CELIS

ASESORES

**DRA. YANIN CHÁVARRI GUERRA, INCMNSZ
DR. ARMANDO GAMBOA DOMÍNGUEZ, INCMNSZ**

**ASESORA ESTADÍSTICA: M. TZIPE GOVEZENSKY, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS UNAM**



México, D.F.

NOVIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIÓN DE TESIS



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
DR. "SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.

DRA. YANIN CHÁVARRI GUERRA

MÉDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE HEMATO-ONCOLOGÍA DEL INCMNSZ

DR. ARMANDO GAMBOA DOMÍNGUEZ

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA DEL INCMNSZ

DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ONCOLOGÍA MÉDICA DEL INCMNSZ

DR. SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES

JEFE DE ENSEÑANZA DEL INCMNSZ

ÍNDICE

	Página
Antecedentes	4
Definición del problema	6
Justificación	7
Objetivos	7
Metodología	7
Resultados	12
Discusión	19
Conclusiones	23
Referencias	24

Antecedentes

Cáncer de Mama. Epidemiología y Generalidades

El cáncer es la principal causa de mortalidad en el mundo, en el 2012 se le atribuyeron 8.2 millones de muertes y un 13% de todas las muertes en el mundo.

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente a nivel global en mujeres mayores de 15 años, con una incidencia reportada para el año 2012 de 1.67 millones, lo que corresponde a un 25% de todos los tipos de cáncer. El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres con 522 000 defunciones anuales reportadas en el año 2012.¹ Las tendencias mundiales de 1980 a 2010, muestran que tanto incidencia y mortalidad se han incrementado, sin embargo las tasas se han aumentado más rápido en países de ingresos bajos y medios, empeorando así la carga de enfermedades evitables, discapacidad y muerte en las personas de bajos recursos.

En México, la incidencia de cáncer de mama se ha incrementado durante las últimas décadas, de acuerdo con el sistema único de información para la vigilancia epidemiológica (SUIVE), en el año 2011 8,892 casos nuevos fueron reportados, con una tasa de incidencia nacional ajustada por edad de 25.17 por 100,000 mujeres de 14 años y más. Las entidades geográficas afectadas por un mayor número de casos nuevos al año se localizan al norte y centro del país (Jalisco 16.8, D.F. 13.7, Veracruz 19.1 y Chihuahua 11.9 por 100, 000 habitantes), mientras que en el sur del país se reporta una menor incidencia (Guerrero 1.41, Quintana Roo 1.46 por 100, 000 habitantes). Desde el 2006 es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, superando desde ese año a la mortalidad por cáncer cervico-uterino, con una tasa de mortalidad reportada de 67 por 100,000 habitantes para el año 2008. (Figura 1) La predicción del GLOBOCAN es que en el 2030, 24386 mujeres serán diagnosticadas y 97778 (40%) van a morir por esta causa en México.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que varía ampliamente en presentación clínica, respuesta a tratamiento y pronóstico. Estudios de expresión génica usando micro arreglos han identificado varios subtipos distintos de cáncer de mama, que difieren notablemente en el curso clínico, pronóstico y respuesta al tratamiento. La lista de genes que diferencia a estos subtipos se llama la lista intrínseca y se compone de varios grupos de genes relacionados con expresión de receptor de

estrógenos (RE) (el clúster luminal), la expresión y proliferación del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), un grupo único de genes llamado el grupo basal y el recientemente descrito “claudin-low” (Tabla 1).

El sistema inmunológico y el cáncer

Existe una gran cantidad de evidencia reciente que indica la importancia del sistema inmunológico y sus componentes en el desarrollo y la progresión de los tumores malignos. Todas las neoplasias humanas inducen una respuesta inmune en su microambiente, la cual es generalmente poco efectiva para destruir las células malignas. Sin embargo, existen datos recientes que muestra que la interacción entre las células tumorales y los leucocitos es parcialmente responsable de la respuesta al tratamiento con quimioterapia. La presencia de linfocitos infiltrantes de tumor, por ejemplo, ha sido identificada como un factor pronóstico independiente de respuesta al tratamiento y supervivencia en pacientes con cáncer de mama, particularmente en tumores triple negativos y con sobreexpresión de HER2. Debido al creciente interés en la compleja interacción entre los linfocitos T y el cáncer, se han llevado a cabo pocos estudios investigando el papel de otras células del sistema inmune en el microambiente tumoral.

Una de las poblaciones leucocitarias menos estudiadas en el cáncer humano son los neutrófilos. A pesar de que los neutrófilos se encuentran de forma común en el microambiente de varios tumores, se sabe poco sobre su papel en la patogénesis del cáncer, y tradicionalmente se les ha considerado como meros espectadores. Los neutrófilos representan la población más abundante de leucocitos circulantes y, cuando ingresan al interior de los tumores, se les considera neutrófilos infiltrantes de tumor (NIT). Bajo la influencia de ciertas citocinas en el microambiente tumoral, estos NITs se polarizan, transformándose en neutrófilos pro-tumorigénicos (fenotipo N2) o proinflamatorios y antitumorigénicos (fenotipo N1). El mecanismo exacto que genera esta polarización, así como las características peculiares de cada fenotipo de NIT no han sido elucidadas del todo. Lo que si sabemos es que la presencia de estas células es un factor desfavorable en diversas neoplasias malignas.

El primer estudio que analizó su presencia en tumores humanos fue publicado por Fossati en 1999. En dicho estudio se analizaron 105 muestras de gliomas, realizándose

búsqueda de células MPO y CD15+. Los investigadores encontraron que un 70% tenía infiltración neutrofílica. Cuando se analizaron los gliomas de bajo grado, se encontró que un 40-50% tenía infiltración por neutrófilos, mientras que hasta un 85% de los glioblastomas multiformes tenían infiltración neutrofílica. Por lo tanto, parece que en tumores del sistema nervioso central, la infiltración por neutrófilos tiene correlación con el grado histológico. Otro estudio, realizado en 121 muestras de cáncer de células renales localizado encontró una correlación entre la presencia de neutrófilos infiltrantes de tumor y el grado histológico. Adicionalmente, aquellos tumores con neutrófilos infiltrantes tuvieron peores desenlaces en cuanto a supervivencia y recurrencia. Un tercer estudio revisó 115 adenocarcinomas gástricos localizados, encontrando que una alta densidad de neutrófilos infiltrantes correlacionaba con una etapa más avanzada, con la presencia de metástasis a distancia y con un peor pronóstico.

Definición del problema

En conjunto, estos estudios sugieren que la presencia de neutrófilos infiltrantes de tumor correlaciona con un fenotipo agresivo en diferentes neoplasias. Esto, a su vez, podría tener importantes consecuencias pronósticas.

En la actualidad, el papel de las células del sistema inmunológico en el cáncer, particularmente en el cáncer de mama, ha tomado un papel protagónico en el ámbito de la investigación básica y clínica. Estudios recientes han demostrado que la presencia de un infiltrado linfocítico predice mejor supervivencia y menor recurrencia en el subtipo triple negativo del cáncer de mama. Al mismo tiempo, la presencia de un infiltrado linfocítico con predominio de linfocitos T CD8+ predice mejor respuesta a quimioterapia y a tratamientos blanco en pacientes con cáncer de mama HER2+. A pesar de que la importancia de los linfocitos en el microambiente del cáncer de mama ha sido hasta ahora ampliamente estudiada, no existe en la literatura ninguna información sobre el papel que juegan los neutrófilos en dicho escenario, ni sobre si existe alguna diferencia en los neutrófilos infiltrantes de tumor entre diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama.

Justificación

Si, como se ha demostrado en otros tumores, los neutrófilos infiltrantes de tumor tienen un papel en el cáncer de mama, esto tendría importantes consecuencias pronósticas y quizás terapéuticas en el manejo de esta patología. Dado que el cáncer de mama es un tumor heterogéneo, en el que los diferentes subtipos moleculares tienen características muy diferentes entre sí, un primer paso esencial es determinar si algún subtipo de cáncer de mama está más relacionado con infiltración neutrofílica para posteriormente realizar análisis prospectivos que correlacionen con la supervivencia.

Hipótesis

La presencia de neutrófilos infiltrantes de tumor (NITs) en cáncer de mama localizado correlacionará con los subtipos histológicos más agresivos, como los tumores HER2+ y triple negativo.

Objetivos

General

- ▶ Determinar si existe una correlación entre la presencia de NITs y los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama,
- ▶ Específicos
 - Determinar la cantidad de NITs presentes en cada subtipo molecular de cáncer de mama (RH+, HER2+ y triple negativo)
 - Establecer una correlación entre la presencia de NITs, respuesta completa patológica en pacientes con cáncer de mama localizado.

Metodología

Diseño General

- a) Diseño del estudio: estudio retrospectivo, longitudinal, no aleatorio.
- b) Descripción de la maniobra: revisión de laminillas disponibles en el departamento de patología del Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán. Revisión de expedientes clínicos.

c) Tamaño de la muestra: todos los tumores localizados de mama vírgenes a tratamiento diagnosticados entre 2006 y 2013 en el Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán (136 tumores aproximadamente)

d) Mecanismo de asignación: ninguno

e) Grupos de tratamiento: ninguno

f) Duración del seguimiento: ninguno

Criterios de inclusión

- ▶ Tumores de mama diagnosticados entre 2006 y 2013 en el INCMNSZ
- ▶ Etapas clínicas localizadas (I-III)
- ▶ Sin tratamiento previo
- ▶ Diagnóstico histopatológico de cáncer de mama (adenocarcinoma) con reporte de receptores hormonales y HER2.
- ▶ Con datos clínicos disponibles en el archivo del hospital

Criterios de exclusión

- ▶ Tumores metastásicos al momento del diagnóstico
- ▶ Ausencia de datos clínicos
- ▶ Falta de disponibilidad de las laminillas o bloques de parafina en el departamento de patología
- ▶ Pacientes que hayan recibido tratamiento antes de la toma de biopsia con quimioterapia, radioterapia u otro tratamiento oncológico.

Criterios de eliminación

- ▶ Material insuficiente para realizar las tinciones apropiadas
- ▶ Cambio de la etapificación a etapa IV después de la revisión del expediente o las biopsias
- ▶ Diagnóstico de enfermedad en ganglios linfáticos
- ▶ Histología no adenocarcinoma

Desenlaces y variables

- a) Desenlaces principales a medir

- Revisión de laminillas teñidas con hematoxilina-eosina
- Identificación de áreas con agregados neutrofílicos dentro del tejido tumoral
 - Solo se tomarán en cuenta neutrófilos en contacto directo con células tumorales
- Revisión inicial con magnificación 4x para identificar áreas de agregados neutrofílicos en el tejido tumoral
- Revisión semicuantitativa de 10 campos de alto poder (40x) con cuantificación de NITs identificados morfológicamente. Se correlacionó la densidad de NITs con el tamaño del tumor.
- Todos los análisis de patología se llevaron a cabo en el departamento de patología del INCMNSZ por patólogos especializados en mama. Cada muestra fue analizada utilizando los mismos procedimientos estandarizados. Los receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) se determinaron por inmunohistoquímica. Los casos se clasificaron como receptores hormonales (RH) positivos en caso de positividad de RE o RP (expresión mayor o igual al 1% de receptores hormonales) y como RH negativos en caso de negatividad tanto de RE como de RP (expresión menor del 1% de receptores hormonales). La expresión de HER2 se determinó inicialmente por inmunohistoquímica y se consideró negativa en casos de puntuación 0 (sin tinción de la membrana) o 1+ (tinción débil e incompleta de la membrana); y positiva en aquellos con puntuación 3+ por inmunohistoquímica. Los tumores con expresión 2+ de HER2 por inmunohistoquímica fueron sometidos a amplificación mediante FISH o CISH, considerándose HER2+ en caso de que una de dichas pruebas fuese positiva y HER2- en caso de que fuese negativa.
- Los tumores con RH+ y HER2- se clasificaron como luminales. Aquellos con sobreexpresión de HER2 se clasificaron como HER2+. Finalmente, aquellos con RH negativos y HER2 negativo se clasificaron como triple negativos (TN).

b) Desenlaces secundarios a medir

- Correlación con otras variables histológicas (tamaño tumoral, estado ganglionar, grado, invasión linfovascular, Ki67)
 - Revisión de expedientes clínicos (edad, estado de menopausia, etapa clínica)
 - Variables clínicas
 - Respuesta patológica completa, definida como ausencia total de enfermedad invasiva en la mama y en los ganglios linfáticos examinados.
- c) Frecuencia de las mediciones: medición única
- d) Estrategia de análisis estadístico
- Para determinar el punto de corte de positividad para la cuenta de NITs se empleo una curva receptor-operador (ROC) con la intención de definir la sensibilidad y especificidad de la cuenta de neutrófilos para identificar los subtipos HER2+ y Triple Negativo
 - Para examinar la asociación de los subtipos de cáncer de mama con la positividad para NITs, se utilizó la Prueba Exacta de Fisher debido a que algunos grupos tendrán un tamaño pequeño de muestra. Se consideró estadísticamente significativo un nivel alfa de 0.05.
 - Para examinar la asociación de la positividad para NITs con la Respuesta Patológica se utilizó la Prueba Exacta de Fisher debido a que algunos grupos tendrán un tamaño pequeño de muestra. Se consideró estadísticamente significativo un nivel alfa de 0.05.
 - Los factores pronósticos se evaluaron con análisis multivariados utilizando regresión logística.
 - Se considerará significativo un valor de p de <0.05 .

Riesgos y beneficios del estudio

- a) Molestias generadas por el estudio- ninguna, ya se cuenta con las muestras histopatológicas necesarias, estas no fueron obtenidas específicamente para el proyecto en cuestión y no se agregarán nuevas de forma prospectiva. No habrá intervención o interacción con los individuos.

- b) Riesgos potenciales- Se trata de un estudio de riesgo mínimo, ya que no entraña riesgos físicos, psicológicos, sociales, económicos o legales para los sujetos mayores de los que conlleva la vida diaria.
- c) Métodos de detección de los riesgos- ninguno
- d) Medidas de seguridad- los datos clínicos e histopatológicos de los pacientes, así como el hecho de que sus muestras fueron utilizadas en un estudio, serán preservados de forma confidencial. Se eliminarán los identificadores directos de los especímenes y los datos para su análisis y no se podrá constatar fácilmente la identidad de los individuos de los cuales se obtuvo la muestra. Ni los pacientes, ni sus médicos, recibirán resultados sobre esta investigación y los resultados no impactarán en las decisiones clínicas sobre los pacientes.
- e) Procedimientos a seguir para resolver los riesgos- ninguno
- f) Beneficios directos esperados
 - ▶ De confirmarse la correlación entre la presencia de NITs y subtipo molecular en cáncer de mama esto podría en un futuro tener un papel como un nuevo marcador para un desenlace adverso en cuanto a supervivencia en este grupo de pacientes.
 - ▶ La identificación de NITs en cáncer de mama ayudaría a caracterizar mejor el microambiente tumoral de esta neoplasia
- g) Beneficios indirectos esperados
 - ▶ De confirmarse la hipótesis este estudio abriría las puertas para la realización de otros estudios en series grandes de pacientes con tratamiento neoadyuvante para determinar el valor pronóstico de los NITs.
 - ▶ De confirmarse la hipótesis del estudio se podrían desarrollar protocolos de investigación sobre neutrófilos y cáncer de forma conjunta con otros departamentos del Instituto.

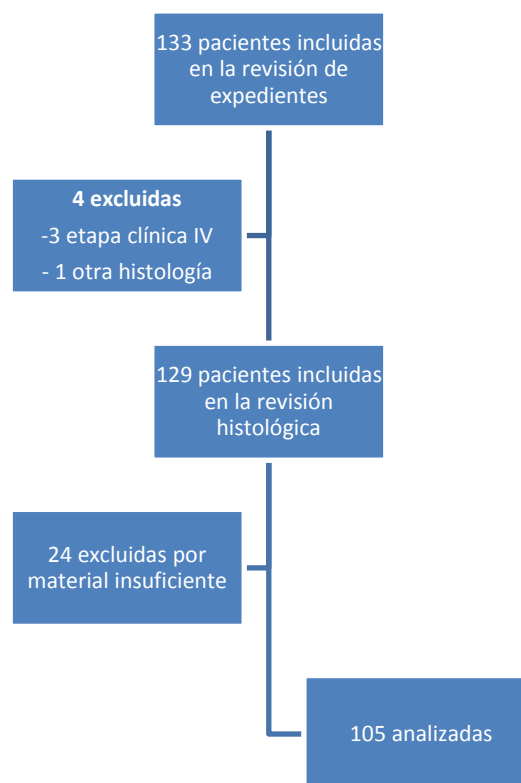
El proyecto cuenta con la aprobación del comité de ética en investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Resultados

Características de la población

133 pacientes fueron incluidas en el estudio. De estas 28 fueron excluidas debido a la ausencia de material, etapificación incorrecta o diagnósticos patológicos diferentes a adenocarcinoma. 105 pacientes fueron analizados. El diagrama de flujo de la inclusión de pacientes en el estudio puede verse en la Figura 1.

Figura 1. Diagrama de flujo de inclusión de pacientes.



72 tumores (69%) fueron clasificados como tipo luminal (TL), 15 (14%) como HER2+ y 18 (17%) como triple negativo (TN). La cuenta media de NITs fue de 1.82×10 campos de alto poder (0-28). La edad media de las pacientes fue de 55.75 años (30-88), con una mediana de 54 años. El Ki67 medio de los tumores fue de 27% (1-90) con una mediana de 20. 16 tumores no tuvieron determinación de Ki67. Las características de la población están resumidas en la tabla 1.

Tabla 1. Características de la población

Variable	Tumores (n=105)	
	n	%
Edad	Mediana 54 años (30-88)	
Estado hormonal al diagnóstico	Premenopáusica	39 37%
	Posmenopáusica	66 63%
Etapa T Clínica	1	32 30%
	2	51 49%
	3	15 14%
	4	7 7%
Etapa N Clínica	0	55 52%
	1	42 40%
	2	8 8%
Histología	Lobulillar	12 11%
	Ductal G1	19 18%
	Ductal G2	49 47%
	Ductal G3	25 24%
Receptores Hormonales (RH)	Negativos	24 23%
	Positivos	81 77%
Receptores de progesterona (RP)	Negativos	38 36%
	Positivos	67 64%
Receptores de estrógeno (RE)	Negativos	28 27%
	Positivos	77 73%
HER2	Negativo	90 86%
	Positivo	15 14%
Subtipo histológico	Luminal	72 69%
	HER2+	15 14%
	Triple negativo	18 17%
KI67	Mediana 20% (1-90)	
Tratamiento Inicial	Cirugía	34 32%
	QT neoadyuvante	71 68%

Cuenta de Neutrófilos

La cuenta media de NITs fue de 1.82×10 campos de alto poder (0-28). El análisis ROC determino un punto de corte para la positividad de >1 NIT por 10 campos de alto poder (AUC 0.85; IC 95% 0.76-0.93, $p < 0.001$). El análisis ROC puede verse en la figura 2. En este punto de corte la determinación de NITs tiene una sensibilidad del 73% (IC 95% 55-85) y una especificidad de 94% (IC 95% 86-98) para detectar tumores de mama HER2 o Triple Negativo (Figura 3). El valor predictivo positivo de la prueba es de 86%, con un valor predictivo negativo de 88% y una precisión del 87% (Figura 4) Los tumores con >1 NIT por 10 campos de alto poder fueron considerados como NIT-positivos

Figura 2. Curva ROC para positividad de NITs.

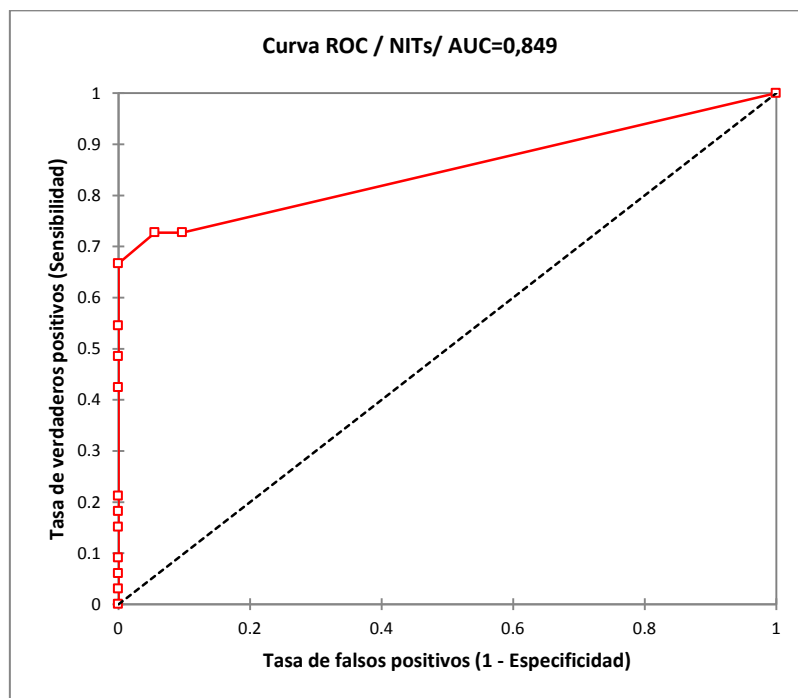


Figura 3. Sensibilidad y especificidad de la prueba.

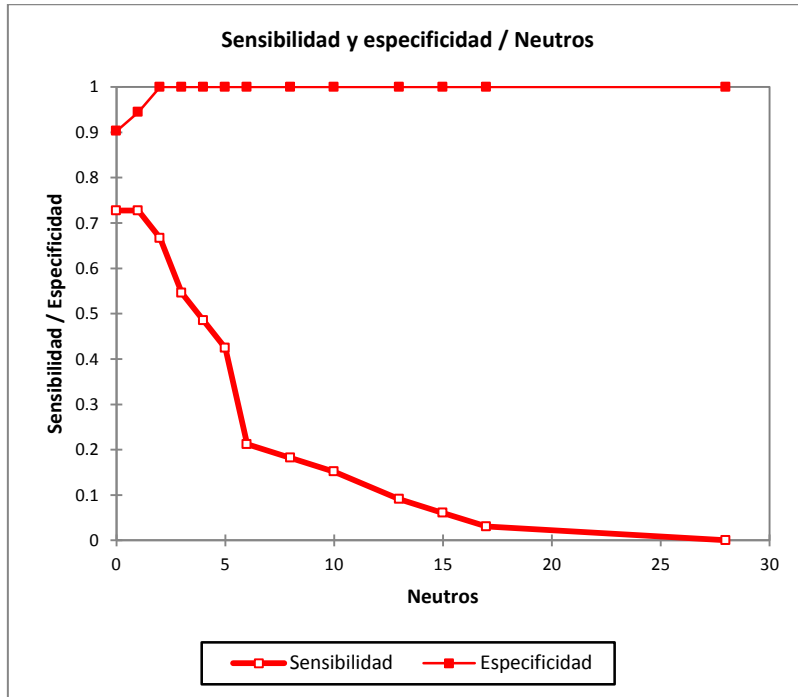
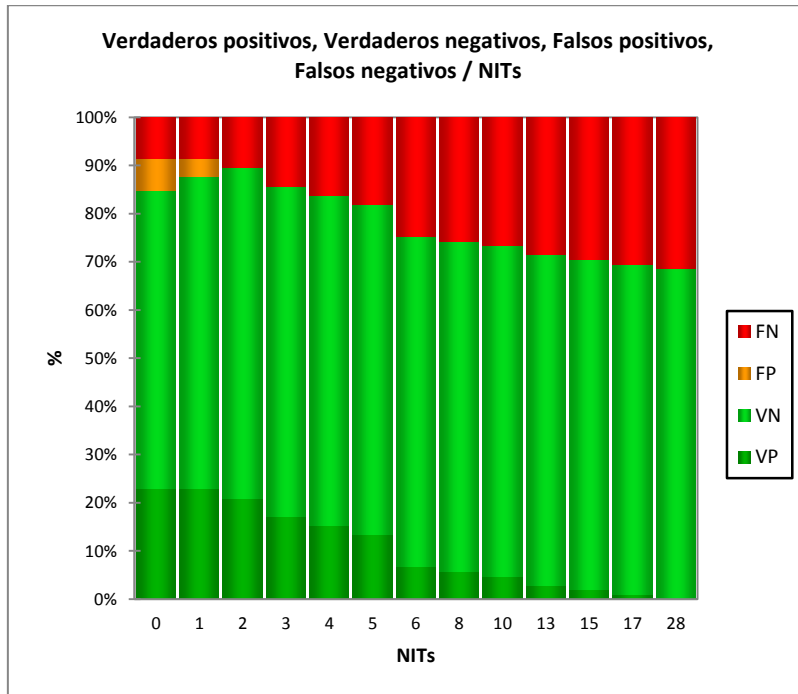


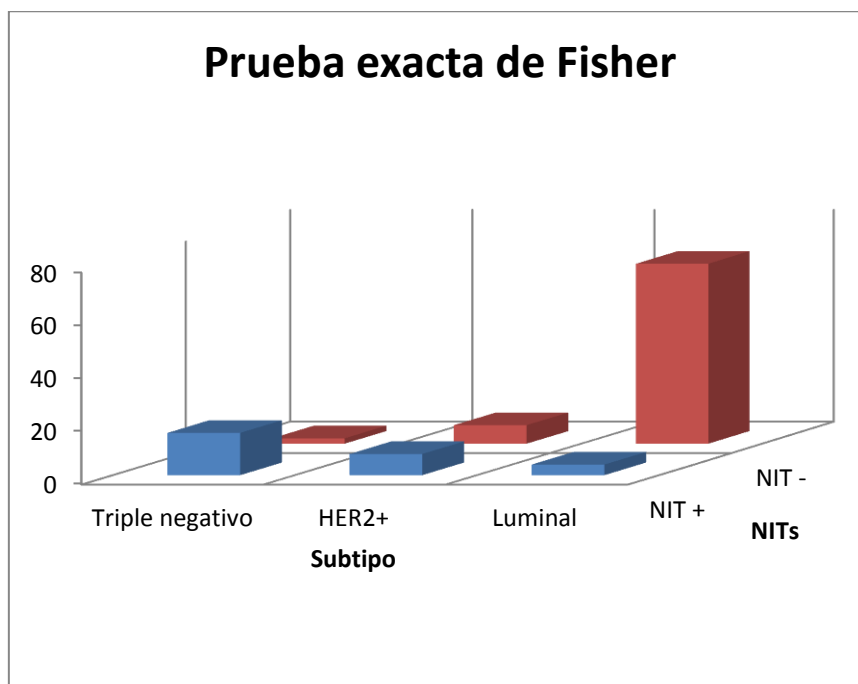
Figura 4. Precisión de la prueba.



Neutrófilos intratumorales

El 27% de todos los tumores fueron NIT-positivos (n=28). De los 18 tumores considerados como TN, 16 (88%) fueron NIT-positivos, con un promedio de 7 NITs x 10 campos de alto poder por tumor (0-17). De los 15 tumores considerados HER2+, 8 (53%) fueron NIT-positivos, con un promedio de 4 NITs x 10 campos de alto poder por tumor (0-28). En lo que se refiere a los tumores luminales, solo 4 de 68 (5%) fueron NIT-positivos, con un promedio de 0.16 NITs x 10 campos de alto poder por tumor (0-2). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la presencia de NITs entre el subtipo TN y el luminal ($p < 0.001$), entre el subtipo HER2+ y el luminal ($p < 0.001$) y entre el subtipo TN y el HER2+ ($p = 0.047$). La diferencia entre los subtipos fue estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.001$ (Figura 5).

Figura 5. Positividad de NITs por subtipo.



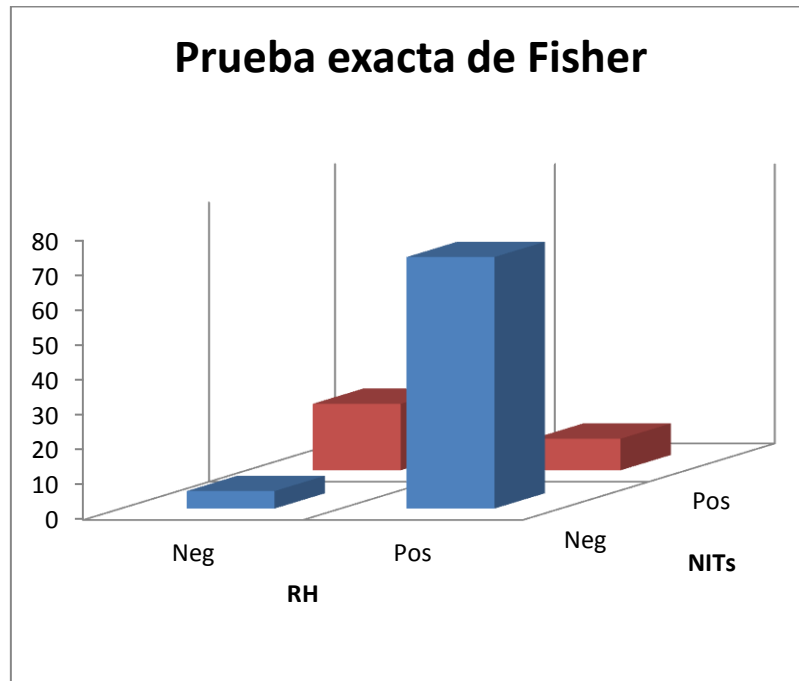
En el análisis univariado el subtipo, la expresión de receptores de estrógeno, la expresión de receptores de progesterona, la expresión de receptores hormonales de forma global, la sobreexpresión de HER2, el grado histológico y el valor de Ki67 estuvieron asociados con una mayor posibilidad de encontrar positividad de NITs. Los resultados de dicho análisis se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Análisis univariado para la positividad de NITs.

Variable		n		p
		NIT-	NIT+	
Edad	Mediana	56 (30-88)	51 (32-80)	0.120
Estado hormonal al diagnóstico	Premenopáusica	28	11	0.822
	Posmenopáusica	49	17	
Etapa T Clínica	1	26	6	0.478
	2	37	14	
	3	10	5	
	4	4	3	
Etapa N Clínica	0	42	13	0.077
	1	32	10	
	2	3	5	
Histología	Lobulillar	12	0	<0.001
	Ductal G1	19	0	
	Ductal G2	37	12	
	Ductal G3	9	16	
Receptores Hormonales (RH)	Negativos	5	19	<0.001
	Positivos	72	9	
Receptores de progesterona (RP)	Negativos	19	19	<0.001
	Positivos	58	9	
Receptores de estrógeno (RE)	Negativos	7	21	<0.001
	Positivos	70	7	
HER2	Negativo	70	20	0.023
	Positivo	7	8	
Subtipo histológico	Luminal	68	4	<0.001
	HER2+	7	8	
	Triple negativo	2	16	
Ki67	Mediana	15% (1-60)	50% (7-90)	<0.001

Es importante resaltar que el 79% de los tumores RH negativos (19 de 24) fueron NIT-positivos, en contraste con 11% de los tumores RH positivos (9 de 81) ($p < 0.001$) (Figura 6)

Figura 6. Positividad de NITs y RH.



Para el análisis multivariado se incluyeron en el modelo aquellas variables que fueron positivas en el análisis univariado. Para evitar la multicolinealidad se incluyó exclusivamente la variable RH (omitiendo RE y RP) y HER2+ (omitiéndose la variable subtipo). Los resultados de dicho análisis se muestran en la tabla 3. Las únicas variables relacionadas con la positividad de NITs fueron el Ki67 (OR 1.05, 95% CI 1.01-1.1, $p = 0.008$) y la negatividad de los RH (OR 10.6; 95% CI 2.5-45.8, $p = 0.002$).

Tabla 3. Análisis multivariado para la positividad de NITs.

Variable	OR	IC 95%	p
Histología (CDI Grado 3)	1.76	0.42-7.42	0.44
RH negativos	10.59	2.45-45.8	0.002
HER2 negativo	0.60	0.13-2.78	0.51
Ki67	1.06	1.01-1.10	0.005

Correlación con Respuesta Patológica Completa

De los 105 tumores analizados, 71 (68%) recibieron como tratamiento inicial quimioterapia (QT) neoadyuvante seguida de cirugía. De estos 71 tumores, 8 (11%) tuvieron respuesta patológica completa (RPC) en la pieza quirúrgica. El 2% de los tumores luminales, el 12% de los tumores HER2+ y el 33% de los tumores TN que recibieron QT neoadyuvante tuvieron RPC. En el análisis univariado, las únicas variables que estuvieron relacionadas con alcanzar una RPC fueron el subtipo histológico triple negativo ($p=0.004$), la negatividad de los receptores hormonales ($p=0.001$), el Ki67 ($p=0.006$) y la positividad para NITs ($p=0.009$). En el análisis multivariado, sin embargo, ningún factor fue estadísticamente significativo para RPC, encontrándose solo una tendencia para la negatividad de los receptores hormonales (OR 9.13, IC 95% 0.94-88.5, $p=0.056$).

Discusión

Los datos presentados en el presente trabajo son, hasta donde sabemos, la primera evidencia encontrada en cuanto a la infiltración de neutrófilos a tumores mamarios humanos. Más aún, esta es también la primera demostración de que la infiltración por neutrófilos intratumorales correlaciona con los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama, con el subtipo más agresivo, el triple negativo, presentando la más alta positividad para NITs. En este último subtipo, los neutrófilos intratumorales se encontraron en mayor cantidad y frecuencia que en los subtipos luminal y HER2+ de forma estadísticamente significativa, con una presencia de NITs en el 88% de los tumores TN. Es importante mencionar que los dos tumores TN que fueron NIT negativos tenían histología medular y lobulillar, no correspondiendo con tumores ductales. Si analizáramos solamente los carcinomas ductales infiltrantes TN, la positividad de NIT sería del 100%.

Estudios previos han demostrado que el cáncer de mama triple negativo se asocia a mayor presencia de neutrófilos circulantes, así como la importancia de la relación entre los neutrófilos y los linfocitos en la sangre periférica para el pronóstico de dicha

neoplasia. Esto, junto a la demostración en este trabajo de la presencia aumentada de NITs en este subtipo tumoral, indica fuertemente que algunos factores derivados del tumor (quizás factores estimulantes de colonia y quimiocinas) tienen un papel señalizador directo o indirecto sobre la producción de neutrófilos sobre la médula ósea y el subsecuente reclutamiento de dichos neutrófilos hacia el interior del tumor desde la circulación periférica.

Recientemente, Fridlender y colaboradores postularon la existencia y caracterizaron dos tipos de neutrófilos asociados a tumores, aquellos que tienen características antitumorales (N1) y aquellos con características protumorales (N2), en analogía a lo descrito anteriormente en las poblaciones de macrófagos. Esta plasticidad de los neutrófilos se encuentra regulada por moléculas en el microambiente tumoral, entre las que se encuentra de forma preponderante el factor transformador del crecimiento β (TGF- β), que desempeña un importante papel en la adquisición del fenotipo N2 por parte de los neutrófilos. Por otra parte, la presencia de TGF- β previene la generación de neutrófilos N1. Estudios recientes han documentado la importancia del TGF- β y su vía de señalización en la recurrencia a distancia y capacidad metastásica del cáncer de mama TN. Dado que TGF- β es un regulador fundamental de la transición epitelio-mesénquima, la sobreexpresión de TGF- β en aquellos tumores TN de mal pronóstico pudiera estar relacionada con la inducción de dicho fenómeno y con la agresividad tumoral. Así mismo, se ha demostrado que la sobreexpresión de TGF- β en cáncer de mama TN funciona como una vía de resistencia al tratamiento con quimioterapia mediante la expresión de IL-8. De hecho, el uso de inhibidores de TGF- β consigue prevenir la resistencia al tratamiento con paclitaxel en modelos experimentales de tumores TN, lo cual ha llevado a grupos de investigadores a postular que TGF- β podría servir como un estimulador de la expansión de células madre del cáncer mediante IL-8. Esta sobreexpresión de TGF- β en el cáncer de mama TN podría ser una potencial explicación sobre la presencia de NITs en este subtipo molecular. En cuanto al subtipo HER2+, existe evidencia sobre el papel promotor de TGF- β en la migración, invasión y supervivencia de las células de cáncer de mama que sobreexpresan el oncogén HER2. La intercomunicación entre el receptor HER2 y la vía de TGF- β tiene como resultado proliferación y metástasis en modelos animales de cáncer de mama, así como falta de respuesta al tratamiento con trastuzumab.

Por otra parte, el hecho de que los NITs en cáncer de mama se encuentren asociados con tumores de comportamiento agresivo como el subtipo TN, sugiere que se trata de neutrófilos N2. Dichos neutrófilos ejercen su acción protumoral mediante diversos mecanismos, entre los que se encuentra la producción de MMP-9, la producción de IL-8/CXCL8, la estimulación de la angiogénesis mediante la producción de VEGF y la producción de otras citocinas que tienen papel en la invasión y metástasis (entre ellas CXCR4).

Existen estudios que han demostrado que la inhibición conjunta de IL-8 e IL-6 (otra citocina pro-inflamatoria) disminuye de forma dramática el crecimiento de colonias de cáncer de mama triple negativo e inhibe la supervivencia celular. Más aún, se ha encontrado que la presencia de una expresión baja del metagén de IL-8, asociado a un número elevado de linfocitos B, puede identificar un grupo de tumores de buen pronóstico que se encuentra limitado exclusivamente a los subtipos triple negativo y basaloide. Por otro lado, se ha relacionado la sobreexpresión de CXCR4 con el grado histológico de los tumores triple negativos, demostrándose además una peor supervivencia a cinco años (58.33 vs 44.74%, $p=0.048$) en aquellos tumores triple negativo con sobreexpresión de CXCR4. No solo eso, sino que además se ha correlacionado dicha sobreexpresión con la capacidad de las células de cáncer de mama triple negativo para conseguir una transición epitelio-mesénquima exitosa y para producir metástasis a sitios viscerales. El silenciamiento de CXCR4 conduce a un aumento en la apoptosis, reduce la incidencia de metástasis pulmonares en ratones y además disminuye la actividad de MMP9, la cual, como mencionamos anteriormente, también es producida por los neutrófilos intratumorales N2. En lo que se refiere a esta metaloproteinasa, existen estudios que han demostrado su importancia en la patogénesis del cáncer de mama triple negativo. La MMP-9 es producida no solamente por células del estroma, sino por las mismas células tumorales, lo cual tiene efecto principalmente sobre la vascularización del tumor. Esta metaloproteinasa se encuentra expresada de forma preferente en tumores de mama triple negativos y de fenotipo basaloide. La expresión alta de MMP-9 ha sido correlacionada de forma positiva con una menor supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes con cáncer de mama triple negativo.

En cuanto a los tumores HER2+, es importante mencionar que 9 de los 15 tumores tuvieron además RH positivos. De estos, 5 (55%) fueron NIT-positivos. Por otra parte, de los 6 tumores HER2+ con RH negativos, 3 (50%) fueron NIT-positivos. Aunque en el estudio no se analizó por separado estos dos grupos debido a su tamaño, parecería que ambos tipos de tumores HER2+ se comportan igual en lo que a la infiltración por neutrófilos se refiere. A pesar de esto, la expresión de HER2 no logró alcanzar un valor estadísticamente significativo en el análisis multivariado, por lo que sería necesario analizar la presencia de NITs en un grupo más amplio de tumores HER2+.

La evidencia enlazando la sobreexpresión de HER2 y las citocinas producidas por los neutrófilos N2 ya mencionadas es mucho menor a la existente para el subtipo triple negativo. Sin embargo existen datos que indican que la regulación a la alta de CXCR4 es esencial para la capacidad metastásica de las células de cáncer de mama con sobreexpresión de HER2. HER2 aumenta la expresión de CXCR4 e inhibe su degradación. De hecho, en una serie polaca, hasta un 45% de los tumores HER2 positivo tienen una expresión intensa de CXCR4.

En esa misma serie, se demostró que los tumores con subtipos luminales (64% de los luminal A y 89% de los luminal B) fueron negativos para la tinción de CXCR4, lo cual corresponde con los resultados reportados en nuestra serie para NITs y abre la posibilidad a una correlación entre ambos fenómenos.

En este estudio, el principal factor de riesgo para encontrar NITs fue la negatividad de los receptores hormonales. Aunque no existe una explicación clara para este fenómeno, una hipótesis interesante es que esto se deba a la intercomunicación entre la vía del receptor de estrógeno y la vía del TGF- β . Ambas vías tienen efectos inversos en lo que se refiere a la proliferación y la apoptosis. De hecho, la activación del receptor de estrógeno bloquea la vía de TGF- β de diversas maneras, incluyendo interacciones directas con sus componentes de señalización o Smads. Esta podría ser la razón por la cual en ausencia de expresión de receptores de estrógeno, la vía de TGF β juega un papel preponderante, con la consecuente atracción de neutrófilos intratumorales que a su vez prolongan dicho círculo vicioso mediante la producción de más citocinas.

En cuanto a los datos relacionados con la RPC en el grupo de pacientes que recibió quimioterapia neoadyuvante, este estudio se ve limitado particularmente por el

tamaño de la muestra. Así mismo, es importante mencionar que es muy posible que las pacientes, particularmente aquellas con tumores HER2+, no hayan recibido un tratamiento completo. A pesar de que en el análisis univariado la presencia de NITs correlacionó con una mayor respuesta, esto dejó de ser significativo en el análisis multivariado. Dado que la evidencia presentada anteriormente apunta a que los NITs favorecen la resistencia al tratamiento con quimioterapia, sería interesante realizar más estudios que ayuden a esclarecer si estas células tienen un papel en la respuesta al tratamiento citotóxico.

Conclusiones

Los NITs se encuentran presentes en la mayoría de los cánceres de mama subtipo triple negativo, así como en la mitad de los tumores HER2+. Por otro lado, se encuentran prácticamente ausentes en aquellos tumores con un subtipo luminal. De hecho, la ausencia de expresión de receptores hormonales es el mayor predictor para positividad de NITs. A pesar de que los NITs en cáncer de mama se observan con menor frecuencia que otras células del sistema inmunológico, como los linfocitos, su presencia predominante en algunos subtipos sugiere que estas células, como parte del microambiente tumoral, podrían tener un papel en la agresividad y progresión de los tumores triple negativos. Aunque existen diversos mecanismos que podrían explicar la interacción entre los NITs y las células de cáncer de mama triple negativo, estos aún requieren ser dilucidados. Los resultados de este trabajo plantean la necesidad de realizar mayor investigación con NITs en este subtipo tumoral, principalmente en lo relacionado con respuesta al tratamiento y pronóstico.

Referencias

1. International Agency for Research on Cancer/World Health Organization. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.
2. Forouzanfar MK, Foreman KJ, Delossantos AM, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet Oncology* 2011; 378: 1461-84.
3. Anuarios de Morbilidad 2011 y CONAPO (2013). Proyecciones de la Población de México 2010-2050. www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/presna/Contenidos/estadisticas/2013/mama0.pdf
4. Estadísticas a propósito del día internacional contra el cáncer de mama.
5. Roman Rouzier, Charles M. Perou, W. et al. Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clin Cancer Res* (2005);11:5678-5685.
6. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* (2007)13:2329- 2334.
7. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*; (2001). 98(19):10869.
8. Prat A, Parker JS, Karginova O. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*; (2010) 12(5):R68).
9. Welch DR, Schissel DJ, Howrey RP, Aeed PA. Tumor-elicited polymorphonuclear cells, in contrast to "normal" circulating polymorphonuclear cells, stimulate invasive and metastatic potentials of rat mammary adenocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Aug;86(15):5859-63.
10. H Schmidt, L Bastholt, P Geertsen, I J Christensen, S Larsen, J Gehl and H von der Maase¹ Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are

- associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *British Journal of Cancer* (2005) 93, 273–278.
11. Fossati G, Ricevuti G, Edwards SW, Walker C, Dalton A, Rossi ML. Neutrophil infiltration into human gliomas. *Acta Neuropathol.* 1999 Oct;98(4):349-54.
 12. Reid MD, Basturk O, Thirabanjasak D, Hruban RH, Klimstra DS, Bagci P, Altinel D, Adsay V. Tumor-infiltrating neutrophils in pancreatic neoplasia. *Mod Pathol.* 2011 Dec;24(12):1612-9.
 13. Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, von der Maase H. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009 Oct 1;27(28):4709-17.
 14. Zhao JJ, Pan K, Wang W, Chen JG, Wu YH, Lv L, Li JJ, Chen YB, Wang DD, Pan QZ, Li XD, Xia JC. The prognostic value of tumor-infiltrating neutrophils in gastric adenocarcinoma after resection. *PLoS One.* 2012;7(3):e33655.
 15. Krell J, Frampton AE, Stebbing J. The clinical significance of tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: does subtype matter?. *BMC Cancer.* 2012 Apr 3;12:135.
 16. Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe?. *Carcinogenesis.* 2012 May;33(5):949-55
 17. Vlaicu P, Mertins P, Mayr T et al. Monocytes/macrophages support mammary tumor invasivity by co-secreting lineage-specific EGFR ligands and a STAT3 activator. *BMC Cancer* 2013;13:197.
 18. Zhao S, Ma W, Zhang M, Tang D, Shi Q, Xu S, Zhang X, Liu Y, Song Y, Liu L, Zhang Q. High expression of CD147 and MMP-9 is correlated with poor prognosis of triple-negative breast cancer (TNBC) patients. *Med Oncol.* 2013 Mar;30(1):335
 19. Mehner C, Hockla A, Miller E, Ran S, Radisky DC, Radisky ES. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget.* 2014 May 15;5(9):2736-49.

20. Hanker LC, Rody A, Holtrich U, Pusztai L, Ruckhaeberle E, Liedtke C, Ahr A, Heinrich TM, Sanger N, Becker S, Karn T. Prognostic evaluation of the B cell/IL-8 metagene in different intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Jan;137(2):407-16
21. Hartman ZC, Poage GM, den Hollander P, Tsimelzon A, Hill J, Panupinthu N, Zhang Y, Mazumdar A, Hilsenbeck SG, Mills GB, Brown PH. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res.* 2013 Jun 1;73(11):3470-80.
22. Yu S, Wang X, Liu G, Zhu X, Chen Y. High level of CXCR4 in triple-negative breast cancer specimens associated with a poor clinical outcome. *Acta Med Okayama.* 2013;67(6):369-75.
23. Yang P, Liang SX, Huang WH, Zhang HW, Li XL, Xie LH, Du CW, Zhang GJ. Aberrant expression of CXCR4 significantly contributes to metastasis and predicts poor clinical outcome in breast cancer. *Curr Mol Med.* 2014 Jan;14(1):174-84.
24. Sivrikoz ON, Doganay L, Sivrikoz UK, Karaarslan S, Sanal SM. Distribution of CXCR4 and γ -catenin expression pattern in breast cancer subtypes and their relationship to axillary nodal involvement. *Pol J Pathol.* 2013 Dec;64(4):253-9.
25. Band AM, Laiho M. Crosstalk of TGF- β and estrogen receptor signaling in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011 Jun;16(2):109-15.
26. Bholra NE, Balko JM, Dugger TC, Kuba MG, Sanchez V, Sanders M, Stanford J, Cook RS, Arteaga CL. TGF- β inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J Clin Invest.* 2013 Mar 1;123(3):1348-58.
27. Sato M, Kadota M, Tang B, Yang HH, Yang YA, Shan M, Weng J, Welsh MA, Flanders KC, Nagano Y, Michalowski AM, Clifford RJ, Lee MP, Wakefield LM. An integrated genomic approach identifies persistent tumor suppressive effects of transforming growth factor-beta in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014 Jun 2;16(3):R57.

28. Li YM, Pan Y, Wei Y, Cheng X, Zhou BP, Tan M, Zhou X, Xia W, Hortobagyi GN, Yu D, Hung MC. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell*. 2004 Nov;6(5):459-69.
-