



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA  
CURSO DE ESPECIALIDAD EN GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA**

## **TÍTULO**

Determinación de TILs (infiltración tumoral de linfocitos) en pacientes con cáncer de mama triple negativo localmente avanzado como predictor de respuesta a neoadyuvancia

## **TESIS QUE PRESENTA**

**DRA KARLA LILIANA TOLEDO MARTINEZ**

## **PARA OBTENER EL GRADO DE**

**SUBESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA**

## **ASESOR**

**DR. JUAN ENRIQUE BARGALLO ROCHA**



**Ciudad de México, marzo 2020**



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.

---

DOCTOR  
EDUARDO CERVERA CEBALLOS  
DIRECTOR DE DOCENCIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

---

DOCTOR  
AARON GONZÁLEZ ENCISO  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE SUBESPECIALIZACIÓN EN GINECOLOGÍA  
ONCOLÓGICA  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

---

DOCTOR  
JUAN ENRIQUE BARGALLO ROCHA  
MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE TUMORES MAMARIOS  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

Este trabajo de tesis con **No 2019/0027**, presentado por la alumna Karla Liliana Toledo Martínez se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr Juan Enrique Bargalló Rocha, con fecha 30 de marzo del 2020 para su impresión final.

**Dr Eduardo Cervera Cevallos**  
**Director de docencia**

**Dr Juan Enrique Bargalló Rocha**  
**Investigador Principal**

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Cancerología en el servicio de tumores mamarios bajo la dirección del Dr Juan Enrique Bargalló Rocha

## **DEDICATORIA**

Agradezco a Dios por el curso de esta vida, por permitir el inicio y realización de cada proyecto. La culminación de esta etapa académica la dedico a mis padres Blanca Estela Martínez Arrollo y Álvaro Toledo Alonso; ustedes son la base, el mejor ejemplo de amor, persistencia, fortaleza y superación. Gracias por mostrarme el camino y recorrerlo a mi lado.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por el apoyo incondicional, a mis maestros por la paciencia y la comprensión; finalmente a mis compañeros y amigos quienes recorrieron conmigo esta etapa llena de aprendizaje y crecimiento.

## RESUMEN

**Antecedentes:** Los tumores triple negativos representan aproximadamente del 15-20% de todos los cánceres de mama; son considerados una entidad heterogénea que agrupa a diferentes subtipos de tumores. Así mismo, se ha descrito que responden mejor a la quimioterapia, con tasas más elevadas de respuestas patológicas completas en promedio 30-45%, sin embargo, tienen peor pronóstico lo que se conoce como paradoja de los triples negativos. Se piensa que el infiltrado linfocitario puede estar asociado a una mejor respuesta antitumoral ya que los linfocitos participan en el control y eliminación de las células tumorales.

**Objetivo Principal:** Determinar la asociación entre la infiltración tumoral de linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+ y la respuesta patológica completa en cáncer de mama con inmunofenotipo triple negativo

**Material y Métodos:** Este es un estudio retrospectivo, observacional, transversal. Se analizaron biopsias por aguja gruesa de pacientes con diagnóstico histopatológico de cáncer de mama invasor con inmunofenotipo triple negativo tratadas con quimioterapia neoadyuvante y posteriormente sometidas a cirugía (mastectomía o cirugía conservadora) para evaluación de la respuesta patológica en el periodo 01 de enero del 2014 al 31 de diciembre del 2018.

**Resultados:** Se incluyó una cohorte de 130 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama localmente avanzado con inmunofenotipo triple negativo, la media de edad fue de 52 años (rango 25 - 90 años), el tamaño tumoral más frecuente fue T3 en 42.3%, en cuanto a la afección ganglionar en un 36.9% las pacientes fueron N1 y en un 36.2% N2, la etapa clínica más frecuente fue IIIA en 46.2%. La histología más frecuente fue ductal infiltrante en un 89.2%. El esquema de quimioterapia neoadyuvante administrado en el 65.38% de los casos fue Adriamicina/Ciclofosfamida 4 ciclos seguido de Paclitaxel 4 ciclos, siendo este el más utilizado. Se realizaron mastectomía total en un 60.7% y 31.6% fueron tratadas con cirugía conservadora

**Conclusión:** En este estudio se demostró una correlación entre los niveles de TILS y la tasa de respuesta patológica completa posterior a quimioterapia neoadyuvante en tumores triple negativos. A mayor infiltración de TILS mayor tasa de respuesta patológica completa. Encontrado mayor concentración entre CD3+ y CD8+ y la respuesta patológica completa en este grupo de tumores.

**DATOS DEL ALUMNO:**

**DRA KARLA LILIANA TOLEDO MARTÍNEZ**  
RESIDENTE DE GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA, CIUDAD UNIVERSITARIA  
MATRICULA UNAM: 513214477  
CORREO ELECTRONICO: karlatoledo0488@gmail.com  
TELEFONO: 5552853216

**DATOS DEL ASESOR:**

**DR. JUAN ENRIQUE BARGALLÓ ROCHA**  
JEFE SERVICIO TUMORES MAMARIOS  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA  
CORREO ELECTRONICO: ebargallo@gmail.com  
TELEFONO:  
ASESOR CLINICO Y METODOLOGICO

**DATOS DE LA TESIS:**

**TITULO**

Determinación de TILs (infiltración tumoral de linfocitos) en pacientes con cáncer de mama triple negativo localmente avanzado como predictor de respuesta a neoadyuvancia

AÑO 2020

## MARCO TEÓRICO

El cáncer de mama se considera un problema de salud pública, presentando un incremento de la incidencia global anual del 0.5%, de acuerdo con la última publicación de la base de datos Globocan en 2018, el cáncer de mama presenta una incidencia mundial de 1 671 149 y una mortalidad de 521 907, ubicándose en el primer lugar de muertes por cáncer en mujeres a nivel mundial<sup>2</sup>.

La primera clasificación molecular de cáncer de mama fue descrita por Perou, Sorlie y colaboradores, dividiendo por medio de microarreglos en subtipos relacionados con la expresión de genes asociados a receptores hormonales denominados luminales y aquellos relacionados con la expresión de genes que no están asociados a receptores hormonales denominados HER sobre expresado y triple negativo.<sup>3</sup> Este último definido como la ausencia de expresión de receptores de estrógeno, progesterona y HER2 (expresión del <1% de tinción en células tumorales)<sup>4</sup>.

Los tumores triple negativos representan aproximadamente del 15-20% de todos los cánceres de mama; son considerados una entidad heterogénea que agrupa a diferentes subtipos de tumores. Lehmann y colaboradores describieron 6 entidades: Basal like 1, basal like 2, mesenquimal, mesenquimal de células madre, receptor de andrógeno (LAR) y el subtipo bajo en claudina. Cada uno con expresión de diferentes genes, diferentes inmunofenotipos y una sensibilidad variable a los diferentes esquemas de quimioterapia<sup>5</sup>. Aproximadamente el 80% de los tumores triple negativos son basal like o bajo en claudina.<sup>6</sup>

Los tumores “basal-like” muestran expresión de citoqueratinas 5 y 17, son tumores con alta tasa de proliferación celular por lo que clínicamente presentan un crecimiento y diseminación rápida, se han asociado a mutaciones en BRCA, Rb y TP53, alta inestabilidad genómica e hipometilación comparado con otros subtipos de triple negativos. El subtipo bajo en claudina es rico en componente transicional de epitelial a mesenquimal generalmente se presenta como un cáncer metaplásico, expresión de genes relacionados con la respuesta inmune.<sup>7</sup>

La mutación que se encuentra más frecuentemente asociada a tumores triple negativos es en TP53 en aproximadamente 80-85% de los casos. Sin embargo, existe una gran variedad de mutaciones genéticas lo que les confiere una gran diversidad molecular distintiva. Algunas mutaciones asociadas en menor frecuencia que TP53 incluyen la amplificación de MYC (40%), amplificación de MCL1, pérdida o mutación en RB1 (20%), mutaciones germinales esporádicas en BRCA 1 o 2 (15-20%), mutación o delección en pTEN (10%), amplificación en CCNE1 (9%), mutaciones en USH2A (9%), PIK3CA (8%), FGFR2 (4%) y HER (2%).<sup>8,9</sup>

Estos tumores generalmente se presentan en mujeres más jóvenes y tienden a presentar una historia natural de la enfermedad más agresiva, con mayores tasas de recurrencia a distancia en los primeros 3-5 años después del diagnóstico. Las metástasis viscerales son más frecuentes que en los tumores hormonodependientes y los principales sitios de metástasis incluyen el pulmón y el sistema nervioso central.<sup>10</sup>

En diferentes estudios se ha descrito que responden mejor a la quimioterapia, con tasas más elevadas de respuestas patológicas completas en comparación con los luminales en promedio 30-45%, sin embargo, tienen peor pronóstico lo que se conoce como paradoja de los triple negativos. En una revisión sistemática publicada por Cortazar y cols, donde se incluyeron 12,000 pacientes con cáncer de mama invasor tratadas con quimioterapia neoadyuvante la tasa de respuesta patológica completa para los triples negativos fue del 33.6%.<sup>11</sup> Definieron como respuesta patológica completa a la ausencia de componente invasor o in situ en la mama y en los ganglios linfáticos axilares (ypT0, ypN0).

Hoy en día se sabe que la transformación neoplásica altera la estructura de los tejidos e induce una respuesta inmune. En ciertas situaciones esta respuesta puede eliminar tumores incipientes. Sin embargo, cuando esta eliminación es incompleta, la transformación neoplásica permite a las células tumorales escapar del sistema inmune. El concepto de la inmunoección del cáncer se basa en este proceso, el cual se encuentra apoyado por estudios experimentales y relevancia clínica<sup>12</sup>.

La inmunoección define el proceso de carcinogénesis en 3 fases: eliminación, equilibrio y escape. Mientras que la mayoría de los pacientes se diagnostican en la fase de escape, la relación entre el tumor y la inmunidad del hospedero tiende a evolucionar. Existen parámetros inmunológicos que pueden servir para monitorizar dicha respuesta y recientemente se ha descrito su uso como factores pronóstico, factores predictivos ante un tratamiento citotóxico o como marcadores para terapias inmunológicas dirigidas<sup>13</sup>.

Característicamente los tumores triple negativos presentan una amplia gama de mutaciones, como se mencionó anteriormente, esto induce una respuesta inmune dada la presencia de neoantígenos, por lo que se le conoce como uno de los inmunofenotipos más inmunogénico.

Desde hace tiempo se ha estudiado el papel del sistema inmune para combatir el cáncer de mama, se ha descrito que la inmunidad innata y adaptativa pueden jugar un papel promotor o antitumoral. De hecho, la infiltración tumoral de linfocitos puede contribuir de manera positiva o negativa a la invasión, crecimiento, metástasis tumoral por lo que ha sido considerado un factor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento neoadyuvante, específicamente en tumores triple negativos y HER2 sobreexpresados<sup>14</sup>. Ambos son considerados subtipos de cáncer de mama con mayor inmunogénicidad<sup>14</sup>, esto posiblemente debido a la heterogeneidad genética que los caracteriza.

Los diferentes tipos de respuesta a la quimioterapia en individuos con diferentes inmunofenotipos de cáncer de mama sugiere que la naturaleza de la interacción tumor-sistema inmune puede ir en paralelo a la heterogeneidad genética y, por lo tanto, a la respuesta al tratamiento citotóxico<sup>15</sup>. Se piensa que el infiltrado linfocitario puede estar asociado a una mejor respuesta antitumoral ya que los linfocitos participan en el control y eliminación de las células tumorales. En cáncer de mama, una extensa infiltración tumoral por linfocitos T CD8+ y T CD4+ ha sido asociada con una mayor supervivencia y mejor respuesta a tratamiento<sup>16</sup>. Mahamoud y colaboradores asociaron a los linfocitos T citotóxicos CD8+ como un factor pronóstico independiente asociado a una mejor supervivencia global ( $p= 0.001$ ), independiente de la etapa clínica, presencia o no de invasión linfovascular y de la sobreexpresión o no de HER2. Así mismo, tumores con una mayor infiltración de linfocitos reguladores tendrán un peor pronóstico<sup>17</sup>. Por lo que la cantidad, calidad y tipo de linfocitos infiltrantes son factores determinantes en la respuesta inmune antitumoral, en este sentido la relación entre los mecanismos de defensa inmune del hospedero y el pronóstico ha sido discutido desde hace tiempo, especialmente en tumores con alta proliferación como tumores grado 3

En 2014 con el fin de estandarizar la evaluación de los TILs en cáncer de mama se creó el Grupo Internacional de TILs, donde se estandarizó la metodología y se emitieron una serie de recomendaciones para la correcta evaluación y medición de estos<sup>18</sup>. Los TILs deberán ser reportados en el componente estromal en porcentaje (el área ocupada por células linfoides sobre el total del área estromal) tomando como una infiltración baja aquella menor al 10%, infiltración intermedia del 11-40% e infiltración alta 41-100%, se deben excluir las células linfoides que infiltran área tumoral, necrosis y áreas de hialinización, se recomienda utilizar biopsias por aguja de corte para una mejor evaluación en el escenario de neoadyuvancia, utilizar una magnificación microscópica de x200-400, así como cortes de tejido con un grosor de 4-5 $\mu$ m fijados en formaldehído y cubiertos con parafina.<sup>18</sup>

Las ventajas de la neoadyuvancia en los tumores triple negativos es que se puede disminuir el tamaño tumoral para permitir cirugía conservadora de mama, limitar el muestreo ganglionar axilar, lograr operar tumores inicialmente inoperables y valorar la sensibilidad a la quimioterapia *in vivo*. Con el esquema tradicional de antraciclinas y taxanos se estima que el 30% de tumores triple negativos alcanzarán una respuesta patológica completa y esto se considera un factor pronóstico favorable, por el contrario, aquellos pacientes que presentan enfermedad residual tienen mayor riesgo de recurrencias metastásicas y muerte por cáncer.<sup>19</sup>

Asano y cols, realizaron un estudio retrospectivo para evaluar la utilidad pronóstica de la infiltración tumoral de linfocitos en 177 pacientes con cáncer de mama triple negativo y HER2 sobre-expresado que previamente recibieron quimioterapia neoadyuvante y fueron sometidas a mastectomía. Concluyeron que los grupos de tumores que eran ricos en infiltración de linfocitos presentaban una tasa significativamente más alta de respuesta patológica completa ( $p<0.001$ ).<sup>20</sup>

Denkert C, et al analizó la infiltración tumoral de linfocitos en pacientes con cáncer de mama como factor pronóstico y predictivo independiente de respuesta a neoadyuvancia en un estudio retrospectivo, multicéntrico, aleatorizado. Incluyeron pacientes con cáncer de mama primario que habían sido tratados con quimioterapia neoadyuvante de 6 estudios realizados por el grupo alemán de cáncer de mama. Analizaron la infiltración de linfocitos en el estroma y en el tumor de biopsias realizadas en 3771 pacientes previo a tratamiento neoadyuvante y observaron que en el análisis de multivariado el porcentaje de infiltración tumoral fue un factor independiente para predecir la respuesta patológica completa.<sup>21,22</sup>

En el 2013 se publicó un estudio donde a partir de biopsias realizadas a pacientes del BIG 02-98 se determinó de manera retrospectiva el porcentaje de infiltración tumoral de linfocitos T, con mediciones en el estroma mediante H&E previo a tratamiento neoadyuvante con esquemas basados en antraciclinas y taxanos. Observaron que la presencia de los linfocitos estuvo asociada con una mayor tasa de respuesta patológica a la neoadyuvancia, así como una mejoría en el periodo libre de enfermedad y la supervivencia global en tumores triple negativos.<sup>23</sup>

Se ha evaluado el impacto de los TILs en la supervivencia global y el periodo libre de enfermedad. En el estudio de Adams S, Adams S, et al encontraron que por cada 10% de incremento en los TILs estromales existía un 14% de reducción de riesgo de recurrencia a distancia ( $p=0.04$ ) y un 19% en la reducción de riesgo de muerte por cáncer ( $p=0.01$ )<sup>4</sup> a 10.6 años de seguimiento.<sup>24</sup>

En un metanálisis realizado en la Universidad de Qingdao, China donde incluyeron 25 estudios para un total de 22,964 pacientes con cáncer de mama encontraron que el porcentaje de infiltración tumoral no fue un marcador pronóstico para el periodo libre de enfermedad ni supervivencia global en todos los inmunofenotipos a excepción de los triple negativos donde se observó asociado a una mejoría en el periodo libre de enfermedad (HR 0.82; 95% CI, 0.76-0.88) y en la supervivencia global (HR, 0.79; 95% CI, 0.71-0.87).<sup>25</sup>

Cuando se realizó un subanálisis con los subtipos de población de linfocitos T observaron que los linfocitos CD8+ estaban asociados a una mayor supervivencia libre de enfermedad (HR, 0.69; 95% CI 0.56-0.84) y supervivencia específica por cáncer de mama (HR, 0.78; 95% CI, 0.71-0.86). En algunos estudios donde evaluaron los linfocitos CD3+ observaron una mejoría en la supervivencia global, sin embargo, no fue estadísticamente significativo, probablemente porque el número de pacientes donde se evaluó esta subpoblación fue considerablemente menor.<sup>25</sup>

En el 2016 Stanon S, et al publicaron un estudio retrospectivo donde evaluaron si el porcentaje de infiltrado linfocitario podría predecir la respuesta a la quimioterapia en cáncer de mama en tumores luminales, triple negativos y con receptor HER2 sobreexpresado, siguiendo las recomendaciones del Grupo Internacional para evaluación de TILs del 2014. Observaron que los inmunofenotipos que presentaron mayor infiltrado linfocitario fueron los triples negativos y los que tenían el receptor HER2 sobreexpresado, las subpoblaciones de linfocitos citotóxicos CD8+ y FOXP3 estuvieron relacionadas con una respuesta patológica mayor en todos los subtipos de cáncer, de igual manera los linfocitos CD4+ determinados en sangre periférica estuvieron asociados con una tasa más alta de respuesta patológica completa. Sin embargo, no se realizó análisis por subgrupos de cáncer de mama, para poder determinar en qué inmunofenotipos se presentó mayor infiltrado o mayor respuesta a la neoadyuvancia.<sup>26</sup>

Otro metanálisis publicado en el 2017 incluyó 23 estudios retrospectivos con un total de 13,100 casos donde se evaluó la utilidad de los TILs como factor pronóstico para la respuesta a quimioterapia, así como su impacto en la supervivencia global y el periodo libre de enfermedad. Incluyeron todos los inmunofenotipos de cáncer de mama, etapas clínicas tempranas y localmente avanzadas que habían recibido quimioterapia neoadyuvante. Identificaron que la tasa de infiltrado linfocitario se asociaba a mejores respuestas patológicas en los subtipos triple negativos y HER2 sobreexpresado, ya que los tumores luminales presentaron muy baja infiltración linfocitaria.

De igual manera realizaron una evaluación de las subpoblaciones de linfocitos y encontraron que CD8+, CD4+ así como FOXP13 se encontraban asociadas a tasas mayores de respuesta patológica completa e inclusive un periodo libre de enfermedad mayor con un OR de 1.0, no se encontró impacto en la supervivencia global a 5 años. Las desventajas del metanálisis fue que los estudios eran muy heterogéneos, se utilizaron diferentes esquemas de quimioterapia, incluyeron etapas tempranas y localmente avanzadas.<sup>27</sup>

Finalmente, este año se publicó un estudio donde se analizó el valor pronóstico de los TILs mediante H&E en cáncer de mama triple negativo específicamente, para la respuesta a la neoadyuvancia. Incluyeron 166 muestras de tumor de pacientes con cáncer de mama localmente avanzado con inmunofenotipo triple negativo, se determinó la tasa de infiltración linfocitaria siguiendo las recomendaciones publicadas del Grupo Internacional de TILs del 2014. Encontraron que el porcentaje de infiltración era un factor pronóstico independiente para la respuesta patológica completa en triple negativo ( $p= 0.0001$ ), sin embargo, no se estudiaron las subpoblaciones linfocitarias. Al igual que en otros estudios hacen énfasis en el estudio de la infiltración en el estroma tumoral y no de los linfocitos intratumorales,

ya que el porcentaje exacto de infiltración presenta mayor dificultad para ser evaluado en estos últimos.<sup>28</sup>

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

De la evidencia publicada hasta el momento, no existe duda de que el porcentaje de infiltración linfocitario está asociado a una mayor tasa de respuesta patológica completa en cáncer de mama, específicamente en tumores triple negativos. Sin embargo, son pocos los estudios que realizan subanálisis de poblaciones linfocitarias y los que lo realizan hacen esta determinación sin importar el inmunofenotipo de cáncer. De igual manera existe una amplia heterogenidad en los esquemas de quimioterapia utilizados en diferentes estudios, lo cual podría representar un sesgo importante al evaluar la respuesta patológica completa.

## **JUSTIFICACIÓN**

Es necesario realizar un estudio donde se tenga una mejor selección de pacientes con cáncer de mama triple negativo, los cuales hayan sido sometidos al mismo tipo de quimioterapia y se encuentren en etapas localmente avanzadas, para que la evaluación de la respuesta patológica completa tenga el menor sesgo posible y se pueda determinar si alguna subpoblación de linfocitos T puede ser utilizada como un biomarcador de esta en pacientes mexicanas.

## **HIPÓTESIS**

Existe asociación entre la infiltración tumoral de las subpoblaciones de linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+ y la respuesta patológica completa en cáncer de mama con inmunofenotipo triple negativo

## **OBJETIVO**

Determinar la asociación entre la infiltración tumoral de linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+ y la respuesta patológica completa en cáncer de mama con inmunofenotipo triple negativo

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Diseño:** Estudio retrospectivo, observacional, transversal

### **Criterios de inclusión**

- Pacientes del Instituto Nacional de Cancerología con diagnóstico histopatológico de cáncer de mama invasor triple negativo
- Etapas clínicas IIB a IIIC acordes a AJCC 8

- Pacientes que hayan recibido quimioterapia neoadyuvante como parte del tratamiento

#### **Criterios de exclusión**

- Pacientes embarazadas
- Sexo masculino
- Pacientes con enfermedades autoinmunes

#### **Criterios de eliminación**

- Pacientes con material insuficiente en bloques de parafina para realizar nuevos cortes
- Paciente con información incompleta en expediente clínico

#### **Pacientes y muestras**

Se analizaron biopsias obtenidas por aguja gruesa de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama invasor con inmunofenotipo triple negativo tratadas con quimioterapia neoadyuvante y posteriormente sometidas a cirugía (mastectomía o cirugía conservadora) para evaluación de la respuesta patológica dentro del periodo del 01 de enero del 2014 a 31 diciembre del 2018. Las muestras fueron extraídas de la base del servicio de Patología del Instituto Nacional de Cancerología.

Se corroboró por dos patólogos del instituto adscritos al servicio de patología mamaria, el inmunofenotipo triple negativo (definido por la AJCC 8 como aquel con <1% de receptores para estrógeno, progesterona y expresión de HER2 negativo por inmunohistoquímica) de cada muestra.

Se realizó una revisión del expediente de cada paciente para corroborar que los datos clínico-patológicos tales como edad, tamaño tumoral, estado ganglionar, tipo de cirugía, esquema de quimioterapia neoadyuvante y reporte de patología final se encontraran completos.

- Evaluación patológica

Inicialmente se realizó evaluación de cada bloque de parafina para corroborar que contara con material suficiente para realizar 4 cortes de 4 µm grosor de tejido, se fijaron en laminillas electrocargadas de 3 µm.

Se determinó mediante H&E el porcentaje de infiltración linfocitaria total en el estroma tumoral y posteriormente mediante inmunohistoquímica el porcentaje de infiltración tumoral de las subpoblaciones linfocitarias CD3+, CD4+ y CD8+. Los anticuerpos empleados fueron el anti-CD4 (ab133616, abcam), anti-CD8 (ab4055,

abcam) y anti-CD3 (ab5690, abcam), utilizando el kit para inmunohistoquímica Optiview del sistema automatizado ventana de Roche.

El porcentaje de infiltración de linfocitos fue medido acorde a los estándares del Grupo Internacional de Infiltración Tumoral de Linfocitos 2014, quienes emiten las siguientes recomendaciones: Los Tils deberán ser reportados en el componente estromal, deberán ser reportados en porcentaje (el área ocupada por células linfoides sobre el total del área estromal) tomando como una infiltración baja aquella menor al 10%, infiltración intermedia del 11-40% e infiltración alta 41-100%, se deben excluir las células linfoides que infiltran área tumoral, necrosis y áreas de hialinización, se recomienda utilizar biopsias por aguja de corte para una mejor evaluación en el escenario de neoadyuvancia, utilizar una magnificación microscópica de x200-400, así como cortes de tejido con un grosor de 3-5µm fijados en formaldehído y cubiertos con parafina

Adicionalmente se digitalizaron todas las laminillas de inmunohistoquímica para un mejor análisis con el microscopio AXIO-SCAN Z1, CARL ZEISS.

- Análisis estadístico

Se realizó análisis con estadística descriptiva de las variables incluidas en el estudio. Las variables categóricas se resumieron mediante tablas de contingencia para calcular porcentajes. Se evaluaron mediante la prueba de Mann Whitney para determinar asociación entre variables clínicas patológicas e infiltrado linfocitario con la respuesta patológica. Se determinó correlación mediante la prueba de Tau b y Tau c de Kendall, entre el porcentaje de infiltración de linfocitos (bajo, intermedio, alto) y el tipo de infiltración linfocitaria (CD3, CD4 y CD8) con la respuesta patológica. Se realizó un modelo de regresión logística para el análisis univariado y multivariado para determinar la asociación del infiltrado linfocitario de forma independiente con la respuesta patológica

El nivel de significancia estadística se estableció en  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS V.22.

- Cálculo de muestra:

El porcentaje de respuesta patológica completa posterior a quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo se ha descrito desde un 20 hasta 45% en diferentes estudios; para el cálculo de la muestra tomamos el 20%.

**Formula:**  $N = Z * p (1 - p) / d^2$

- P = proporción basada en la tasa de respuesta patológica completa en triple negativos (0.2)
- Z= Distribución estándar (1.96 para intervalo de confianza del 95%)
- D= Margen de error (0.05)

$$N = 1.96 * 0.20 (1-0.2) / (0.05)^2$$

$$N = 0.392 (0.8) / 0.0025$$

$$N = 0.2744 / 0.0025$$

N =109 Pacientes

### **Aspectos éticos**

El presente estudio se realizó de acuerdo con la normatividad vigente en México, la Declaración de Helsinki y la legislación internacional. Por tratarse de un estudio retrospectivo, no requiere de consentimiento informado, pero si se solicitó autorización al Comité de Ética hospitalaria. La información se manejó de forma confidencial en todo momento y en apego a los lineamientos institucionales y las guías de práctica clínica vigentes.

### **Resultados**

Se incluyeron un total de 130 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama invasor localmente avanzado con Inmunofenotipo triple negativo la mediana de edad fue de 52 años (rango 25 años-90 años), el tamaño tumoral más frecuente fue T3 en 42.3%, en cuanto a la afección ganglionar en un 36.9% las pacientes fueron N1 y en un 36.2% N2, la etapa clínica más frecuente fue IIIA en 46.2%. La histología más frecuente fue ductal infiltrante en un 89.2% (Tabla 1).

Variable	n = 130	%
<b>Etapa clínica</b>		
II B	15	11.5
III A	60	46.2
III B	36	27.7
III C	19	14.6
<b>Tamaño tumoral</b>		
T1	3	2.3
T2	31	23.8
T3	55	42.3
T4	41	31.5
<b>Ganglios linfáticos</b>		
N0	13	10.0
N1	48	36.9
N2	47	36.2
N3	22	16.9
<b>Histología</b>		
Ductal	116	89.2
Lobulillar	8	6.2
Mixto	1	0.8
Otro	5	3.8
<b>Esquema de quimioterapia</b>		
AC/ Taxol	85	65.38
Docetaxel + ciclofosfamida	39	30
Otro	6	4.6
<b>Tipo de cirugía</b>		
Mastectomía total	79	60.7
Cirugía conservadora	51	39.2

Tabla 1.- Características clinicopatológicas de 130 pacientes con cáncer de mama en etapa avanzada  
Inmunofenotipo triple negativo

El esquema de quimioterapia neoadyuvante administrado en el 65.38% de los casos fue Adriamicina/Ciclofosfamida 4 ciclos seguido de Paclitaxel 4 ciclos, siendo este el más utilizado. Se realizaron mastectomía total en un 39.2% y 31.6% fueron tratadas con cirugía conservadora (Tabla 1).

Todas las pacientes incluidas en el estudio se resumieron en tablas de contingencia para ver la distribución de las mismas de acuerdo al porcentaje de infiltración de linfocitos y la respuesta patológica. 63 Pacientes (48.5%), tuvieron respuesta patológica completa y 67 pacientes (51.5%) se ubicaron en el grupo de respuesta

patológica parcial, mediante la tinción de hematoxilina- eosina, identifico la infiltración de linfocitos, 42 pacientes tuvieron infiltración alta, 45 pacientes tuvieron un porcentaje de infiltración medio y 43 pacientes se identificaron con infiltración linfocitaria baja, la infiltración por subpoblación de linfocitos se presenta en la tabla 2.

		<b>Parcial</b>	<b>Completa</b>	<b>Total</b>
<b>H&amp;E</b>	Alto	12	30	42
	Medio	25	20	45
	Bajo	16	32	43
	<b>Total</b>	<b>67</b>	<b>63</b>	<b>130</b>
<b>CD3</b>	Alto	27	62	89
	Medio	40	1	41
	Bajo	0	0	0
	<b>Total</b>	<b>67</b>	<b>63</b>	<b>130</b>
<b>CD4</b>	Alto	0	0	0
	Medio	18	20	38
	Bajo	49	43	92
	<b>Total</b>	<b>67</b>	<b>63</b>	<b>130</b>
<b>CD8</b>	Alto	11	36	47
	Medio	56	27	83
	Bajo	0	0	0
	<b>Total</b>	<b>67</b>	<b>63</b>	<b>130</b>

Tabla 2.- Distribución de pacientes por porcentaje de infiltración linfocitaria de acuerdo a la respuesta patológica.

La asociación entre la respuesta patológica y las diferentes variables clínico patológicas se demostró con la etapa clínica ( $p = 0.002$ ), tamaño tumoral ( $P = 0.036$ ) y el estado ganglionar ( $p = 0.002$ ) al igual que con el infiltrado linfocitario tumoral ( $p < 0.001$ ), y con las sub poblaciones de linfocitos CD3 ( $p < 0.001$ ) y CD8 ( $p < 0.001$ ) tablas 3.

Variable	n = 130	%	Valor de p en respuesta patológica
<b>Etapa clínica</b>			0.002*
II B	15	11.5	
III A	60	46.2	
III B	36	27.7	
III C	19	14.6	
<b>Tamaño tumoral</b>			0.036*
T1	3	2.3	
T2	31	23.8	
T3	55	42.3	
T4	41	31.5	
<b>Ganglios linfáticos</b>			0.002*
N0	13	10.0	
N1	48	36.9	
N2	47	36.2	
N3	22	16.9	
<b>Infiltrado linfocitario</b>			<0.001*
Alto	42	32.3	
Medio	45	34.6	
Bajo	43	33.1	
<b>Infiltrado linfocitario CD3</b>			<0.001*
Alto	89	68.5	
Medio	41	31.5	
Bajo	0	0	
<b>Infiltrado linfocitario CD4</b>			0.542
Alto	0	0	
Medio	38	29.2	
Bajo	92	70.8	
<b>Infiltrado linfocitario CD8</b>			<0.001*
Alto	47	36.2	
Medio	83	63.8	
Bajo	0	0	

Tabla 3.- Correlación entre la respuesta patológica y las características clínicas e infiltrado linfocitario tumoral en pacientes con cáncer de mama triple negativo.

En la correlación del infiltrado linfocitario con la respuesta patológica, se obtuvo un coeficiente de correlación de Tau c de Kendall de 0.362 y un valor de  $p < 0.001$  estableciendo un valor de predicción bajo entre el infiltrado linfocitario y la respuesta patológica, por si solo el porcentaje de infiltración se puede relacionar con la respuesta patológica, sin embargo al determinar el sub grupo de población (CD3, CD4 y CD8) podemos tener una correlación más precisa, pues no todas las

poblaciones correlacionan directamente con la respuesta patológica (Tabla 3 y figura 1).

Para valorar el valor de predicción del nivel de infiltrado linfocitario de CD3 y la respuesta patológica en pacientes con cáncer de mama triple negativo se utilizó el coeficiente de correlación de Tau b de Kendall con un valor de 0.625 y un valor de  $p < 0.001$  siendo estadísticamente significativo con un valor de predicción bueno, entre las subpoblaciones de linfocitos se podría establecer con un factor predictivo determinante en la respuesta patológica, a mayor infiltrado linfocitario de CD3 mejora la respuesta patológica.

En el caso de los linfocitos CD4 y la respuesta, el coeficiente de correlación de Tau b de Kendall fue de 0.054 con un valor de  $p = 0.545$  estableciendo una relación mínima entre ambas variables sin embargo este valor no es estadísticamente significativo, por lo que no fue posible establecer una relación entre el infiltrado linfocitario dependiente de linfocitos CD4 con la respuesta patológica. Para la subpoblación de linfocitos CD8 el coeficiente de correlación de Tau b de Kendall fue de 0.424 con un valor de  $p < 0.001$  siendo estadísticamente significativo con una relación de predicción moderada, con un infiltrado linfocitario de CD8 alto mejoro la respuesta patológica, aunque con menor fuerza de asociación que CD3 (Tabla 2).

Infiltrado linfocitario	Tau de Kendall	p
H&E	0.362 <sup>c</sup>	<0.001*
CD3	0.625 <sup>b</sup>	<0.001*
CD4	0.054 <sup>b</sup>	0.545
CD8	0.424 <sup>b</sup>	<0.001*

Tabla 3.- Correlaciones mediante Kendall t entre las subpoblaciones de linfocitos en el infiltrado linfocitario y la respuesta patológica.

\*Valor de p estadísticamente significativo, <sup>b</sup> Kendall tb, <sup>c</sup> Kendall tc

En el análisis univariado se encontró que tanto el estado ganglionar, el tamaño tumoral, la infiltración tumoral de linfocitos y la infiltración específica por las subpoblaciones de CD3+ y CD8+ se asociaron con una mayor tasa de respuesta patológica completa, los demás factores no tuvieron significancia estadística  $p > 0.05$  (Tabla 4). En análisis multivariado solo se confirmó la asociación entre la infiltración tumoral de linfocitos, así como de los linfocitos CD3+, CD8+ y el estado ganglionar (Tabla 4).

	Análisis univariado			Análisis multivariado		
	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p
Histología	0.917	0.531 – 1.586	0.758			
Tamaño tumoral	0.615	0.394 - 0.960	0.032*	0.808	0.404 – 1.617	0.547
Estado ganglionar	0.491	0.318 - 0.756	0.001*	0.398	0.201 - 0.789	0.008*
H&E	2.400	1.505 – 3.828	<0.001*	4.146	1.932 – 8.896	<0.001*
IHQCD3	91.85	12.00 – 702.9	<0.001*	121.5	12.59 – 1173	<0.000*
IHQCD4	1.266	0.594 – 2.700	0.541			
IHQCD8	6.788	3.000 – 15.35	<0.001*	5.604	1.735 – 18.10	0.004*

Tabla 4.- Análisis univariado y multivariado de las características clínicas y el infiltrado tumoral de linfocitos con la respuesta patológica.

\*Valor de p estadísticamente significativo

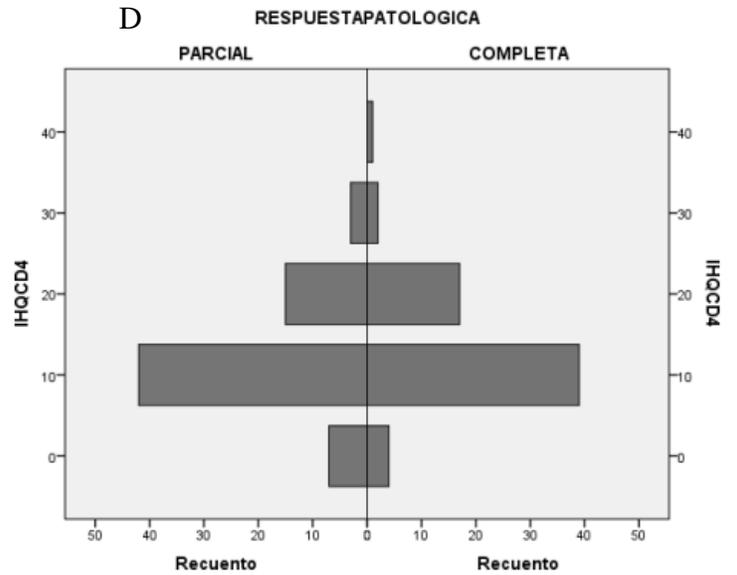
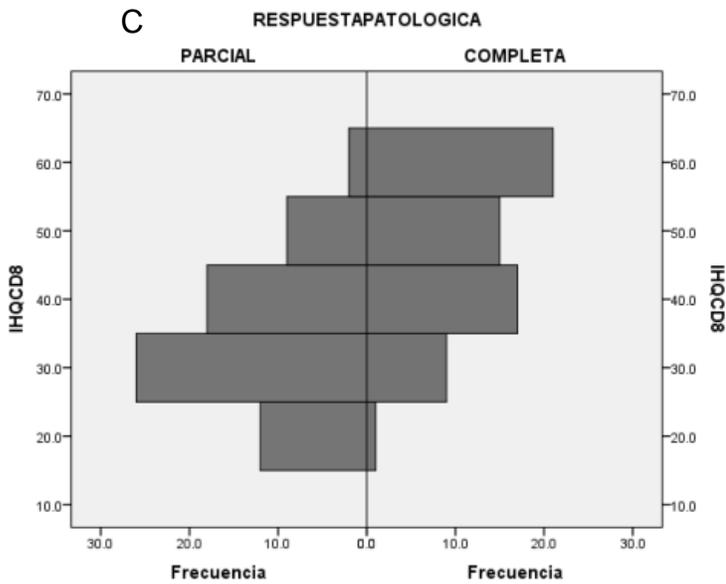
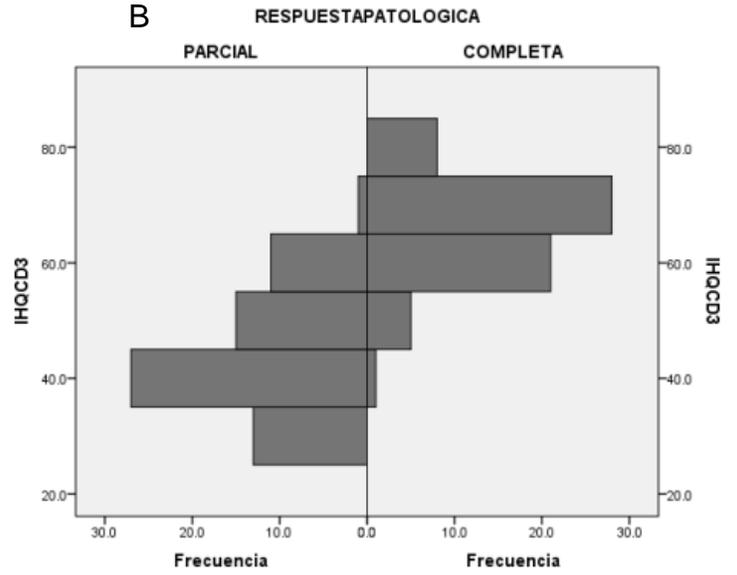
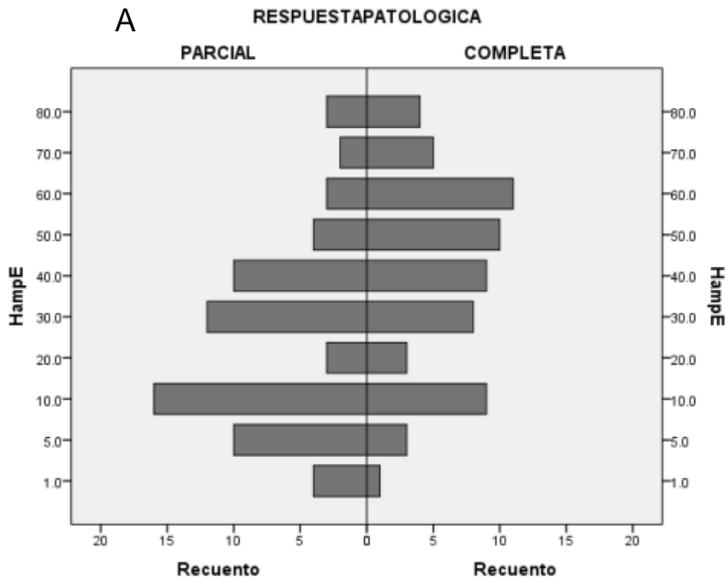


Figura1.- Distribución de pacientes por infiltración tumoral linfocitaria y respuesta patológica (A), infiltración de linfocitos CD3+ y respuesta patológica (B), infiltración de linfocitos CD8+ y respuesta patológica (C), infiltración de linfocitos CD4+ y respuesta patológica (D).

## DISCUSIÓN

Los tumores triple negativos son un grupo de neoplasias heterogeneas con pronóstico, respuesta a tratamiento y comportamiento biológico diferentes. Por lo tanto es importante identificar posibles biomarcadores para ayudar a predecir estas variables, especialmente aquellos tumores que son más quimiosensibles y tienen mayor probabilidad de presentar una respuesta patológica completa.

Diversos estudios han demostrado el valor pronóstico y predictivo de los linfocitos intratumorales en cáncer de mama. Sin embargo, la falta de estandarización para la medición de los mismos dificultaba la reproducibilidad.

En el 2014 el grupo de trabajo de linfocitos intratumorales publicaron las principales recomendaciones para la evaluación correcta en cáncer de mama, posteriormente Pruneri y cols apoyaron la validez de las recomendaciones en su publicación, de igual manera indicaron que por cada 10% de incremento en la infiltración de linfocitos intratumorales era un marcador predictor de mejoría en supervivencia en tumores de mama triple negativos.

Ruan y colaboradores publicaron en el 2018 un estudio retrospectivo de 425 pacientes con tumores de mama triple negativos, utilizadas las recomendaciones del grupo de trabajo de linfocitos intratumorales para determinar la asociación entre la tasa de respuesta patológica completa y el porcentaje de infiltración tumoral por linfocitos. Los resultados obtenidos respaldan que existe una relación proporcional del porcentaje de infiltración intratumoral de linfocitos pre quimioterapia y la tasa de respuesta patológica completa del cáncer de mama triple negativo, a mayor infiltración mayor tasa de respuesta patológica completa. De manera adicional, en este estudio proponen que el punto de corte para considerar una tasa de infiltración alta sea el 20%, ya que con este corte se obtiene una sensibilidad del 80% para predecir la respuesta patológica completa.

En el presente estudio realizamos determinación de linfocitos intratumorales en tumores de mama triple negativos por H&E encontrando hallazgos consistentes con

lo publicado previamente en la literatura, a mayor tasa de infiltración de linfocitos en el estroma tumoral, mayor tasa de respuesta patológica completa con una  $p = 0.004$  estableciendo una relación directamente proporcional, sin embargo al determinar el subgrupo de población linfocitaria existieron diferencias en cuanto a esta correlación, ya que no todas se correlacionan directamente con la respuesta patológica completa.

Para las subpoblaciones de CD3+ y CD8+ se observó una asociación directamente proporcional, entre mayor porcentaje de infiltración por estas dos subpoblaciones mayor tasa de respuesta patológica completa, particularmente con CD3+ quien mostró una mayor fuerza de asociación  $p=0.0001$ .

Al comparar con el porcentaje de infiltración de CD4+ con la tasa de respuesta patológica completa no se observó ninguna asociación con diferencia estadística  $p=0.734$ .

Es importante mencionar que el esquema de neoadyuvancia que se utilizó en el 89.2% de las pacientes fue adriamicina / ciclofosfamida 4 ciclos + paclitaxel 4 ciclos y el 100% de nuestras pacientes completaron el esquema, a diferencia de otros estudios publicados que evalúan la infiltración tumoral de linfocitos donde los esquemas de neoadyuvancia varían considerablemente, factor importante ya que esta variable puede impactar considerablemente en la tasa de respuesta patológica completa.

De igual manera nuestra población de estudio es homogénea con tumores triple negativos localmente avanzados.

## **CONCLUSIONES**

Nuestro estudio demuestra la correlación entre los niveles de TILS medidos con las recomendaciones del Grupo Internacional de TILS 2014 en la biopsia por aguja de corte correlacionan con la tasa de respuesta patológica completa posterior a quimioterapia neoadyuvante en tumores triple negativos. A mayor infiltración de TILS mayor tasa de respuesta.

Cuando se analizan las subpoblaciones de TILS encontramos que a mayor concentración de CD3+ y CD8+ mayor tasa de respuesta patológica completa en este grupo de tumores.

## REFERENCIAS.

- 1.-Bottai G, Raschioni C, Losurdo A, Di Tommaso L, Tinterri C, Torrì R, et al. An immune stratification reveals a subset of PD-1/LAG-3 double-positive triple-negative breast cancers. *Breast Cancer Res* 2016;18:121.
- 2.- Globocan 2018
- 3.- Perou C, et al. Portraits of human breast tumors. *Nature* 2000
- 4.-Hudis C, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist*. 2011;16(1):1-11
- 5.-Newman L, Reis-filho J, et al The 2014 Society of surgical oncology Susan G. Komen for the Cure Symposium: triple negative breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015; 22(3) 874-82
- 6.- Penault-Llorca F, Viale G. Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: a clinical perspective. *Ann Oncol*. 2012;23(6):19–22.
- 7.- Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua S, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;21(i):1688–99.
- 8.-Evans D, Howell A, Ward D, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in triple negative breast cancer. *J Med Genet*. 2011;48:520-2
- 9.-Couch F, Hart S, Shaarma P, et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33:304-11
- 10- Liedtke C, Mazouni C, Hess K, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26 (8):1275
- 11.-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;384:164-72
- 12.-Couzin-Fankel, et al Breakthrough of the year 2013. *Cancer immunotherapy Science* 342 2013
- 13-Mittal D, Gubin M, et al. New insights into cancer immunoeediting and its three component phases. *Curr Opin Immunol* 2014; 27:16-25
- 14.- Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer J et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes *J Clin Oncol* 30:1796-1804.2012
- 15.-Pruneri, G, et al Tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer, *The Breast* 2018
- 16.-Coussens L, Pollard J. Leukocytes in mammary development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011
- 17.-Mahmoud S, Paish E, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2011;29: 1949-1955

- 18.-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 *Annals of Oncology* 26: 259-271, 2015
- 19.- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007;13(8):2329–34.
- 20.-Asano Y, Kashiwagi S, et al Prediction of treatment response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer by subtype using tumor infiltrating lymphocytes *Anticancer research* 2017
- 21.- Denkert, et al Tumor associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010
- 22.- Carsten D, et al Tumour infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet* 2018
- 23-Loi S, Sirtaine N, et al Prognostic and predictive value of tumor infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98
- 24.- Adams S, Gray R, et al Prognostic Value of Tumor infiltrating Lymphocytes in triple negative breast cancer from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 y ECOG 1199. *J Clin Oncol* 2014
- 25- Mao Y, Qing Q, et al. The prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 2016
- 26.- Stanon E, Disis M, et al. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Journal of Immunotherapy of cancer* 2016 (4):59
- 27.-Wang K, Jianjun Xu, et al . Tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: A meta-analysis. *Oncotarget*, 2017 (7): 28
- 28.-Ruan et al. Predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes to pathological complete response in neoadjuvant treated triple-negative breast cancers. *Diagnostic pathology* 2018 (13):66