



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CURSO DE ESPECIALIDAD EN CIRUGÍA ONCOLÓGICA

**PRESENCIA DE INFILTRACIÓN TUMORAL DE LINFOCITOS Y SU ASOCIACION A
RESPUESTA PATOLÓGICA, DESPUÉS DE QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN
CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO LOCALMENTE AVANZADO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

SUBESPECIALISTA EN CIRUGÍA ONCOLÓGICA

PRESENTA:

MAYBELLINE ROBLES ESTRADA

DR. JUAN ENRIQUE BARGALLÓ ROCHA

DIRECTOR DE TESIS



MÉXICO, D.F.

2015



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.

TUTOR:

DR. JUAN ENRIQUE BARGALLÓ ROCHA
Jefe del departamento de Tumores Mamarios

ÍNDICE

INDICE

I.	RESÚMEN DE PROYECTO	(5)
	1) Antecedentes.....	(5)
	2) Objetivo.....	(5)
	3) Hipótesis de investigación.....	(5)
II.	MARCO TEÓRICO.....	(6)
	1) Antecedentes del cáncer de mama.....	(6)
	a. Cáncer de mama triple negativo.....	(6)
	b. Respuesta inmune en el microambiente tumoral.....	(6)
	c. Modelos Inmunológicos, modelo de peligro	(8)
	d. Inmunoección.....	(9)
	e. Composición y el papel del infiltrado linfocitario en cáncer de mama.....	(10)
	f. Quimioterapia neoadyuvante en Cáncer de mama Triple Negativo.....	(11)
	g. Datos actuales en la validación y utilidad del infiltrado linfocítico.....	(14)
II.	JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	(15)
III.	HIPOTESIS DEL PROYECTO.....	(16)
IV.	OBJETIVOS.....	(17)
	a. Objetivo Primario.....	(17)
	b. Objetivos secundarios.....	(17)
V.	GRUPOS DE ESTUDIO.....	(18)
VI.	TAMAÑO MUESTRAL.....	(18)
VII.	TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO.....	(18)
VIII.	METODOLOGÍA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	(19)
	1) Selección de pacientes.....	(19)
	2) Obtención de tejido tumoral.....	(19)
	3) Evaluación patológica.....	(19)
	4) Análisis histopatológico.....	(19)
	5) Criterios de inclusión.....	(23)
	6) Criterios de exclusión.....	(24)
	7) Criterios de eliminación.....	(24)
	8) Análisis de variables.....	(24)
	9) Período de realización del proyecto de investigación.....	(25)

IX.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	(26)
X.	RECURSOS DISPONIBLES.....	(27)
XI.	RESULTADOS.....	(28)
XII.	DISCUSIÓN.....	(39)
XIII.	FUTURAS DIRECCIONES.....	(46)
XIV.	CONCLUSIONES.....	(48)
XV.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	(49)

PRESENCIA DE INFILTRACION TUMORAL DE LINFOCITOS Y SU ASOCIACION A RESPUESTA PATOLOGICA, DESPUES DE QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN CANCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO LOCALMENTE AVANZADO

RESUMEN

Antecedentes: El cáncer de mama triple negativo (CMTN) comprende el 15-20 % del cáncer invasivo de mama. Se caracteriza por ser biológicamente agresivo, tener un mal pronóstico, carece de terapia blanco, ausencia de BCL2, contenido elevado de p53, alto grado histológico así como mutación de BRCA1 en 10-20 %. Respuestas inmune innatas y adaptativas juegan un papel importante en la inmunovigilancia tumoral, estas quizás limitan el desarrollo y crecimiento tumoral. El papel de la respuesta inmune en el cáncer de mama no se encuentra comprendido del todo, recientes observaciones sugieren el involucro de un microambiente tumoral y un equilibrio inmune en la respuesta al cáncer como factor pronóstico. En particular la quimioterapia puede desencadenar una respuesta inmune la cual contribuye a la respuesta al tratamiento.

Objetivo: Conocer si la presencia del infiltrado linfocitario (intratumoral, peritumoral y estromal) se asocia a una mejor respuesta patológica al tratamiento con QT Neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama Triple negativo localmente avanzado.

Hipótesis: El tratamiento con QT neoadyuvante, induce cambios en los infiltrados inmunes en el ambiente tumoral, con impacto en el pronóstico y supervivencia. Una respuesta inmune activa se ha asociado con un pronóstico favorable. El infiltrado linfocitario en el tumor (ILT) ha emergido como un fuerte factor pronóstico especialmente en el subtipo triple negativo. El identificar el infiltrado linfocitario en tumores antes del tratamiento con QT neoadyuvante y el manejo quirúrgico, probablemente sea capaz de identificar subgrupos de pacientes con diferentes sensibilidades a la QT/NEO con diferente pronóstico.

Justificación: El infiltrado linfocitario en cáncer de mama también ha demostrado ser un potente factor predictivo de respuesta en pacientes que reciben quimioterapia neoadyuvante especialmente en el subtipo triple negativo, aunque el conocimiento a detalle de como la quimioterapia afecta la respuesta inmune en el cáncer de mama todavía no se encuentra completamente reconocida. El identificar la presencia del infiltrado linfocitario en tumores triple negativo antes del tratamiento con QT neoadyuvante, y el manejo quirúrgico, podría ser capaz de identificar subgrupos de pacientes con diferente pronóstico.

Metodología: Análisis retrospectivo de 104 pacientes (en un período comprendido de Enero 1998 - Diciembre 2008) con Cáncer de mama triple negativo localmente avanzado en las cuales se evaluó la presencia del infiltrado linfocitario en biopsias previas a QTNEO y posterior manejo quirúrgico, evaluando su asociación con la respuesta patológica.

Tipo de estudio: Estudio retrospectivo, transversal, descriptivo.

Análisis de resultados: A pesar de contar con mayor mortalidad en el grupo de ausencia de infiltrado linfocitario (93 vs 11 muertes), no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre sobrevida global con la presencia o ausencia de infiltrado linfocitario en CMTN ($p=0.953$), se obtuvo de manera global 42.3 % respuesta patológica completa vs 57.6 % de respuesta patológica incompleta, la presencia de 1-10% de infiltrado linfocitario se asoció a menor respuesta patológica completa donde 39.4% tuvo un infiltrado (peritumoral e intratumoral) vs 14.4 % estromal vs el grupo de respuesta incompleta donde se presentó el 58.6% con presencia de infiltrado (peritumoral e intratumoral) y 17.3% con infiltrado estromal.

Conclusiones: Solamente en el subgrupo de 1-10% de infiltrado linfocitario tumoral (peritumoral, intratumoral) se logró correlacionar que a menor presencia de infiltrado linfocitario se presentó menor respuesta patológica completa, sin diferencia estadísticamente significativa entre sobrevida global ($p=0.953$), período libre de enfermedad ($p=0.815$). Probablemente esto pueda ser explicado por la cantidad limitada de pacientes. Sin embargo estos resultados preliminares son la plataforma para futuros abordajes comparativos entre la presencia del ILT y su asociación con una respuesta patológica. Se requieren de más estudios para determinar el papel de pronóstico y quizás predictivo del ILT en la respuesta en pacientes que reciben QTNEO en CMTN.

Palabras clave: Infiltrado linfocítico, cáncer de mama triple negativo, respuesta patológica completa, linfocitos intratumorales, QT/NEO adyuvante, linfocitos estromales,

PRESENCIA DE INFILTRACION TUMORAL DE LINFOCITOS Y SU ASOCIACION A RESPUESTA PATOLOGICA, DESPUES DE QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN CANCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO LOCALMENTE AVANZADO.

ANTECEDENTES.

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial y en México. Entre los factores pronósticos y predictivos más importantes se encuentran la expresión de tres biomarcadores: receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) así como el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER 2). El desarrollo de terapias blanco (anticuerpos monoclonales dirigidos contra Her-2/neu) ha ocasionado una diferencia substancial tanto en la respuesta como en la supervivencia⁶.

En México, la tasa de mortalidad por cáncer de mama en el 2012 fue de 5,680 mujeres. El acceso subóptimo a estudios de tamizaje para el cáncer de mama así como una educación en salud deficiente podría justificar las altas tasas de mortalidad por cáncer de mama en nuestro país. Por lo tanto existe una necesidad imperativa de encontrar estrategias terapéuticas alternativas⁶⁻⁷

Entre los diferentes subtipos de cáncer de mama, los que son triple negativos (CMTN) para los marcadores RE, RP y Her2 comprenden el 15-20% del cáncer invasivo de mama, son biológicamente agresivos, demuestran ausencia de expresión de BCL2, contenido elevado de p53, alto grado histológico; así como mutación de BRCA1 en 10-20%³. En el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) la prevalencia de CMTN supera la descrita en la mayoría de los estudios, alcanzando el 23.1% y se asocia con una menor supervivencia en comparación con pacientes portadoras de tumores No- Triple Negativos. Recientemente en nuestro Instituto se encontró que 23% de las pacientes con CMTN tienen una mutación germinal del gen BRCA; 41 % de estas son ocasionadas por una mutación fundadora mexicana (BRCA1 ex9-12del)⁷.

En relación al tratamiento, alrededor de un tercio de las pacientes con CMTN responderán adecuadamente a la quimioterapia neoadyuvante (QT-NEO) basada en antraciclinas y taxanos y 33.6 % alcanzarán una respuesta patológica completa (rPC) la cual se ha reportado como un marcador subrogado de la sobrevida global de pacientes con CMTN. Sin embargo, alrededor de 20% de las pacientes con CMTN desarrollarán progresión durante la QT-NEO, especialmente aquellas pacientes tratadas con taxanos; siendo este un grupo de mal pronóstico. En la actualidad no existen estudios efectivos de diagnóstico (imagen, inmunohistoquímica e histológicos) que permitan distinguir entre los grupos de CMTN resistentes y sensibles al tratamiento quimioterapéutico convencional. Recientemente ha sido demostrado que >60% de las pacientes con Cáncer de mama Triple Negativo (CMTN) son portadoras de tumores *BRCA*ness positivos⁵. La terapia adyuvante de alta dosis basada en Platino tiene una mayor efectividad que la quimioterapia convencional en el tratamiento de tumores *BRCA*ness positivos, no siendo así para los tumores *BRCA*ness-negativos. No obstante, el añadir Carboplatino a la QT-NEO estándar aumenta el índice de efectos adversos, lo cual lleva a un incremento en la tasa de abandono al tratamiento así como modificación de las dosis. Consecuentemente, las sales platinadas en el tratamiento de CMTN deberán utilizarse basándose en el estado de *BRCA*ness tumoral antes que, añadirlas de una manera generalizada al tratamiento de todas las pacientes con CMTN¹⁴.

Respuesta inmune en el microambiente tumoral.

Respuestas inmune innatas y adaptativas juegan un papel importante en la inmunovigilancia tumoral, estas quizás limitan el desarrollo y crecimiento tumoral. El papel de la respuesta inmune en el cáncer de mama no se encuentra comprendido del todo, recientes observaciones sugieren el involucro de un microambiente

tumoral y un equilibrio inmune en la respuesta al cáncer de mama como factor pronóstico. En particular la quimioterapia puede desencadenar una respuesta inmune la cual contribuye a la respuesta al tratamiento¹.

El significado de la inflamación en el cáncer de mama es controversial, la inflamación representa una respuesta inmune en contra del tumor, pero hay evidencia de que esta respuesta esta alterada. La inflamación quizá también estimula el crecimiento tumoral mediante la liberación de enzimas proteolíticas y factores angiogénicos. Tres patrones de inflamación han sido observados en los carcinomas invasivos. El patrón principal es un infiltrado difuso de células T y macrófagos. Los otros dos patrones, perivascular y grupos periestromales de células B y células T, se ven particularmente en los bordes de los tumores²¹⁻²²

Para que un tumor pueda provocar una respuesta inmune adaptativa, debe tener antígenos que son reconocidos por el sistema inmune (ser antigénico) y también estimular la activación y proliferación de células inmunes relevantes (ser inmunogénico). Los tumores por lo tanto pueden potencialmente evitar una respuesta inmune ya sea por pérdida o reducción de la antigenicidad o por defectos en el proceso de activación²¹.

El cáncer de mama expresa antígenos asociados a tumores incluyendo el antígeno oncofetal 2c-erb B-23 y MUC -1, sin embargo hay una expresión reducida o ausente del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I en cerca del 50 % de los tumores. La evidencia en modelos animales sugiere que la respuesta inmune celular a los tumores es más importante que la inmunidad humoral y que esta puede causar la regresión del tumor. Los tipos celulares necesarios para mediar la respuesta inmune celular (células T, macrófagos y células dendríticas) están presentes en muchos tipos de cáncer de mama, en algunos tumores la función de estas células inmunes está deteriorada. Los linfocitos tumorales infiltrantes expresan niveles bajos de citosinas Th1, consistente con la evidencia de que la actividad citotóxica se encuentra dañada en contra de tumores autólogos. Las células dendríticas están presentes en pequeñas cantidades en el estroma de carcinomas invasivos de mama y muestra una habilidad disminuida para estimular las células T alogénicas en los tumores en los cuales estas células esta activas, sin embargo el pronóstico aparenta ser mejor¹⁷.

Las células inflamatorias asociadas al tumor, particularmente los macrófagos, puede tener numerosos efectos no inmunes en los tumores². Los macrófagos en el cáncer de mama secretan una variedad de enzimas digestivas los cuales se piensan tienen un papel importante en la invasión tumoral y la angiogénesis. Los macrófagos pueden estimular la angiogénesis directamente por la liberación de factores estimulantes de angiogénesis e indirectamente mediante la digestión de la matriz extracelular, la cual contiene factores estimulantes o por la liberación de citosinas que inducen hipoxia lo cual puede estimular en la célula tumoral la producción de factores angiogénicos.

Es así que los efectos potenciales de las células inflamatorias en el cáncer de mama son numerosos y complejos. El significado de la inflamación en el cáncer de mama no está claro. Además el análisis multivariable es esencial en estudios de pronóstico, porque la inflamación se asocia con otros factores pronósticos, en particular con el grado histológico. Incluso con análisis multivariable existen resultados contradictorios: los estudios han mostrado una asociación de la inflamación en cáncer de mama con un mejor, peor y sin relación con el pronóstico². La discrepancia en estudios previos de la importancia de la inflamación en el pronóstico puede ser debido a que la mayoría de los estudios han utilizado una medida general de inflamación en lugar de evaluar los patrones individuales. El "modelo de peligro" propone que el evento crítico en la iniciación de la respuesta inmune es la activación de las células presentadores de antígenos por el daño o señales de alarma de las células lesionadas. Experimentos in vitro muestran que las células

dendríticas son activadas por células tumorales necróticas o sus lisados, pero no por células tumorales apoptóticas²².

El modelo de peligro.

Este modelo sugiere que el sistema inmune está más enfocado con el daño o lesión que con lo extraño, y se activa a través de señales de alarma de tejidos dañados, más que por el no auto reconocimiento. En la historia parten del modelo de yo-no yo (self-nonself, SNS). En el modelo original Burnet sugirió que cada linfocito expresa múltiples copias de un solo receptor de superficie específico para una entidad extraña la señalización a través de la superficie de este anticuerpo inicia la respuesta inmune y los linfocitos auto-reactivos son eliminados de manera temprana. Sin embargo el modelo original ha cambiado adaptándose a los nuevos hallazgos. La primera modificación en 1969, después del descubrimiento de que los linfocitos B activados hipermutan, creando nuevos potencialmente células auto reactivas. Al darse cuenta de esta autoinmunidad, la cuestión era si la inmunidad requería de la cooperación de dos células, Bretscher y Cohn agregaron una nueva célula (el linfocito T) y una nueva señal (ayuda) proponiendo que la célula B moriría si se reconoce como antígeno en la ausencia del linfocito T. En 1975 Lafferty y Cunningham descubrieron que las células T responden más severamente en contra de células de su propia especie que de otras especies, añadiendo otra célula y otra señal. Proponiendo que las células T también necesitan una segunda señal (coestimulación) la cual recibe de una célula “estimuladora” (células presentadoras de antígenos) sugiriendo que esta señal es específica de especies (fig 1)²².

El modelo peligro añade otra capa de células y señales proponiendo que las células presentadora de antígenos son activadas por señales de peligro/alarma de células dañadas, al ser expuestas a patógenos, toxinas, daño mecánicos, o tumores. Señales de alarma pueden ser constitutivas o inducibles, intracelulares o secretadas, o hasta una parte de la matriz extracelular. Debido a que las células mueren por un proceso programado normal, son usualmente fagocitadas antes de su desintegración, mientras que las células que mueren necróticamente liberan su contenido, cualquier producto intracelular podría ser potencialmente una señal de daño cuando es liberada. Señales de alarma inducibles podría incluir cualquier sustancia hecha o modificada por el células dañadas. La característica más importante es que señales de alarma o daño no deben ser enviadas por las células sanas o por las células sometidas a muerte fisiológica normal. Aunque este mecanismo es el principio de estas interacciones celulares complejas, desde un punto de vista diferente en el cual lo “extraño” de un patógeno no es la característica importante que activa una respuesta, y “auto tolerancia no es garantía de tolerancia²¹⁻²².

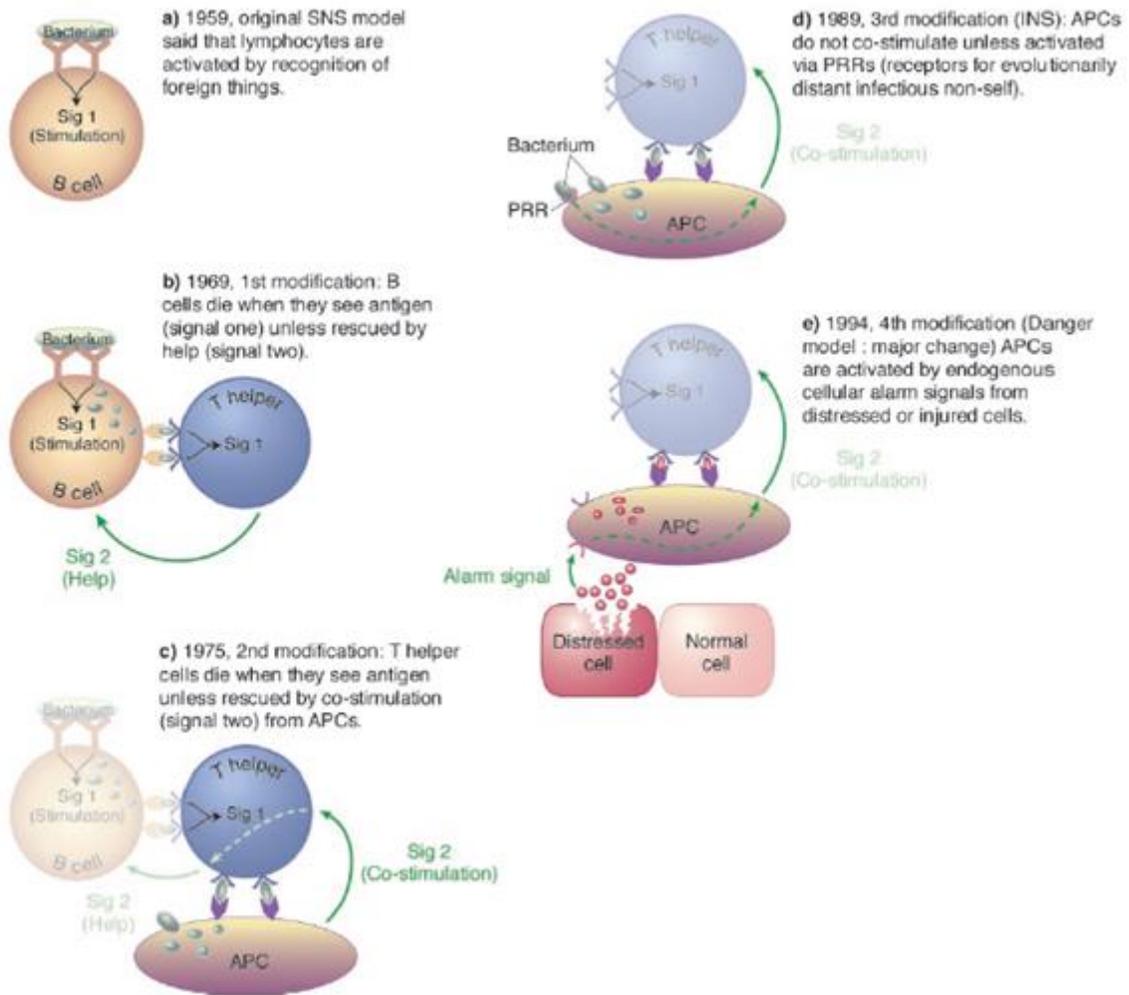


Fig 1. Historia de los modelos inmunológicos

Con base en estos principios, el sistema inmune es clave en la progresión del cáncer. Los datos preclínicos sugieren que la quimioterapia puede desencadenar una respuesta inmune anti tumoral, al causar una muerte celular inmunogénica, que permite la presentación cruzada de antígenos, la activación de las células dendríticas y células T citotóxicas tumor- específicas. Pocos estudios de generación de hipótesis sobre series pequeñas de cáncer de mama indican que la exposición a drogas citotóxicas tales como antraciclinas y taxanos podrían conducir a la atracción de linfocitos al lecho/base tumoral. La presencia de una inmunidad antitumoral en el huésped ha demostrado que influye en la respuesta a tratamientos citotóxicos²³.

Inmunoedición.

Un papel fundamental del sistema inmune es el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos por inmunovigilancia continua y la iniciación de reacciones inflamatorias que involucran la activación coordinada de células inmunes adaptativas e innatas. La transformación neoplásica altera la estructura ordenada de los tejidos e induce respuestas inmunes que puede eliminar los tumores incipientes. En situaciones donde la eliminación es incompleta, la transformación neoplásica de las células es capaz de escapar al control inmunológico. Este proceso ha sido mejor conceptualizado por la teoría de inmunoedición del cáncer la cual

es apoyada por una gran cantidad de datos experimentales así como evidencia clínica. La inmunoedición define la progresión maligna con base en el tumor y las interacciones de células inmunes en tres fases: eliminación, equilibrio y escape. Mientras que los pacientes son más frecuentemente diagnosticados en la fase de escape, esta relación entre la inmunidad tumoral y la inmunidad huésped sigue evolucionando y con esto la magnitud de la respuesta inmune antitumoral. Incluso en etapas avanzadas, ahora los parámetros inmunológicos han sido reconocidos que influyen directamente o indirectamente en la supervivencia¹¹⁻¹².

Composición y el papel del infiltrado inmune en cáncer de mama.

El infiltrado tumoral por células inmunes es observado frecuentemente pero la composición de células implicadas en la inmunidad innata y adaptativa varía entre tipos de tumores o sitios de órganos. Los datos acumulados de estudios en humanos y murinos han asociado más subconjuntos de leucocitos con una contribución predominante a cualquiera de las actividades pro o antitumorales (**fig 2**). Los modelos murinos han identificado leucocitos de linaje mielóide, incluyendo macrófagos asociados al tumor, células dendríticas y células supresoras derivadas de células mieloides como elementos con un papel central en la configuración del microambiente a través de los factores que estos producen, ya sea hacia un medio antitumoral inmunostimulador o una reparación del daño iniciado en el microambiente tumoral. Las células T antitumorales que migran dentro de este escenario contrastante pueden por lo tanto, también ser activadas o suprimidas. A su vez, la polarización de macrófagos hacia M2 protumorigénicos o fenotipos funcionales M1 antitumorales están regulados por los linfocitos T, destacando la importancia de la diafonía en la configuración del microambiente tumoral. Además la evidencia acumulada sugiere que la inmunidad adaptativa mediada por linfocitos T y B proporciona las bases críticas para respuestas antitumorales sostenidas y efectivas. En cáncer de mama, la infiltración tumoral extensa por linfocitos T CD 8 fue fuertemente asociada con la supervivencia y la respuesta al tratamiento. La presencia de células T reguladoras CD4 (Treg) han sido asociadas con ambos, Entre las otras subpoblaciones de células T CD4, las células Th1 (principal fuente celular de interferón γ) se han asociado con resultados clínicos favorables, mientras que las células Th2 se han vinculado con la amortiguación de la respuesta antitumoral. La presencia de células auxiliares foliculares (Tfh), el más nuevo subconjunto de CD4, fue recientemente asociado positivamente con los resultados en la evolución del paciente tanto en el manejo adyuvante y neoadyuvante. El papel exacto del infiltrado tumoral por linfocito B en la actualidad no está bien definido y permanece en controversia^{10,35}

Dada la heterogeneidad funcional de los linfocitos intratumorales es intrigante que el grado de infiltración linfocítica evaluada por el simple análisis de cortes de tumor teñidos por hematoxilina y eosina (H&E) se han demostrado que tiene valor predictivo y pronóstico en el Cáncer de mama triple negativo (TNBC) y en HER 2(+) a pesar de la falta de información detallada en la subpoblaciones inmunes del infiltrado. Una posible explicación es que los reguladores inmunes negativos están presentes como parte de una vía normal de retroalimentación reactiva a una respuesta inmune antitumoral activa y continúa, por lo tanto define tumores que son más inmunogénicos. Esta consideración tiene varias implicaciones importantes, lo primero es que una evaluación enfocada a los subconjuntos individuales puede tener un valor limitado. Por ejemplo la infiltración baja o ausente de células Treg puede reflejar tumores que son ignorados por el sistema inmune mientras que las células Treg en elevada proporción en ciertos tumores puede ser señal de un activo, aunque sin éxito intento de rechazo tumoral. Segundo en el cáncer de mama con pobre o rico infiltrado linfocítico cada uno puede reflejar una biología celular distinta que es probable tenga marcada diferente susceptibilidad a la inmunoterapia. Finalmente en tumores con infiltrado de moderado a extensivo, la presencia de infiltrado linfocítico peritumoral o estromal también puede ser visto en algunos pacientes.^{23,35}

TILs in Cancer

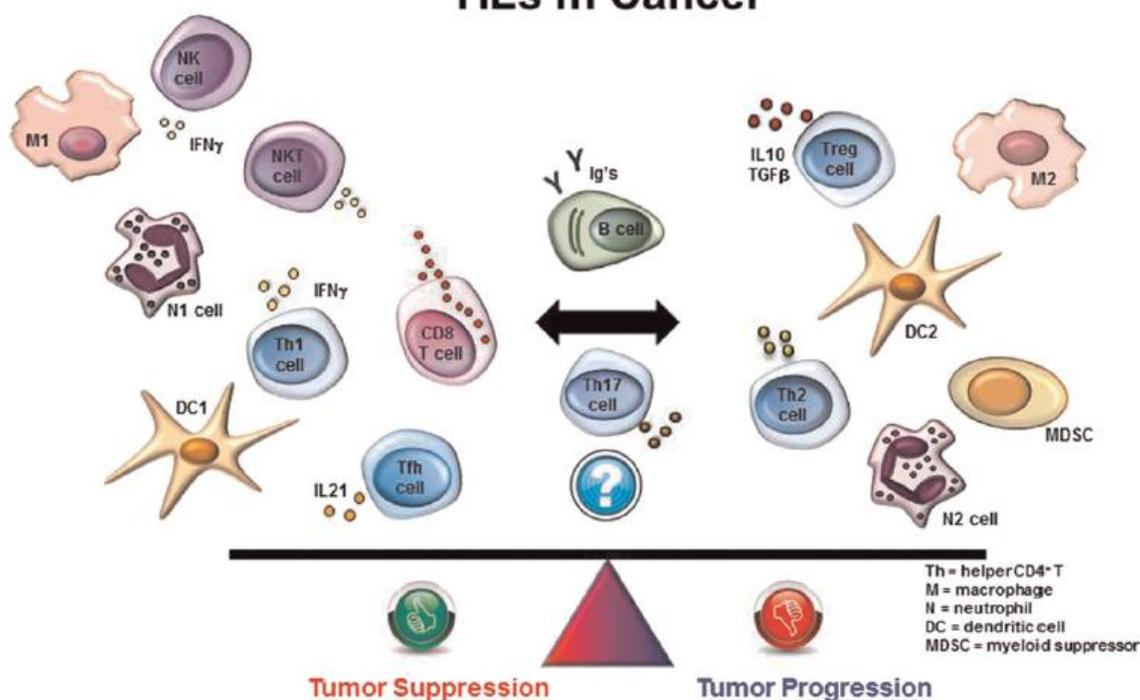


Fig 2. La diafonía celular entre los diferentes subtipos de linfocitos y su contribución predominante a actividades tanto pro o antitumorales, incluyendo leucocitos de linaje mieloide, macrófagos asociados al tumor ya sea con sus propiedades protumorigénicas (M2) o antitumorales (M1), subconjuntos de células T helper (auxiliares), células T citotóxicas, células T reguladoras, células B, células dendríticas y células supresoras derivadas de células mieloideas son mostradas. Estas células juegan un papel central en el escenario del microambiente tumoral, a través de factores que producen la conducción de actividades anti o pro tumorales mediadas por la inmunidad en el microambiente.

Por lo tanto a pesar de la inhabilidad del sistema inmune para rechazar un tumor clínicamente detectable, una respuesta inmune organizada en el sitio del tumor podría señalar la generación de una memoria inmunológica con el potencial para controlar eficazmente la enfermedad residual. También ha sido detectada cierta variabilidad dentro de tumores individuales lo que sugiere esta naturaleza de interacciones inmunidad-tumor pueden ser paralelas a la heterogeneidad tumoral¹².

Quimioterapia neoadyuvante en Cáncer de mama Triple Negativo.

La quimioterapia neoadyuvante (QTNEO) es una estrategia terapéutica cada vez más utilizada para el cáncer de mama. Además de tener la capacidad de inducir respuestas clínicas que permiten llevar a cirugías preservadoras de mama. La quimioterapia neoadyuvante es una herramienta de investigación para dar a conocer los mecanismos de resistencia al tratamiento. La respuesta patológica completa (pCR) para tumores Triples negativos, está actualmente reconocida como un criterio indirecto de evaluación del beneficio terapéutico de la quimioterapia neoadyuvante. Esquemas que incluyen antraciclinas y taxanos secuenciales logran un alto índice de pCR siendo así los esquemas preferidos de QT NEO^{16,17,50}.

En cuanto al cáncer de mama triple negativo que no responde a tratamientos específicos como trastuzumab para cáncer de mama Her2 positivo, o terapia hormonal para receptores hormono positivos; en los casos operables sólo la Quimioterapia sistémica ha demostrado ser efectiva como adyuvante o neoadyuvante.

Aunque se considera que los pacientes con cáncer de mama triple negativo son más probables que alcancen una pCR después de quimioterapia QT NEO que pacientes con subtipos luminal, esta respuesta patológica completa en varios estudios se correlaciona con un excelente resultado clínico, a diferencia de pacientes con una enfermedad residual después de QT NEO los cuales tienen un pobre pronóstico¹⁸. Sin embargo el factor que determina la sensibilidad a la quimioterapia en pacientes con triple negativo es incierto. Si el subtipo triple negativo muestra características heterogéneas a juzgar de perfiles genéticos, en consecuencia es importante investigar los factores patológicos asociados con la respuesta a la quimioterapia.²⁶

Los linfocitos infiltrantes tumorales se consideran representan una respuesta inmune del huésped en contra de los cánceres, la evidencia acumulada ha evaluado el impacto de estos infiltrados en el pronóstico dependiendo de los tipos de linfocitos, su estado funcional, localización en el tejido e interacción con los tumores y varía entre los diferentes tipos de cáncer, particularmente las células T, CD 8 linfocitos T citotóxicos (CTLs) han sido vinculados a un mejor pronóstico en cáncer de colon y ovario, los linfocitos T citotóxicos pueden ejecutar la actividad citotóxica hacia las células tumorales mediante la activación de apoptosis y se cree que son la primera línea de defensa en contra del cáncer. Varios estudios han demostrado que estos linfocitos en el cáncer de mama son una población heterogénea siendo el linfocito T el predominante presente en la mayoría de los casos sin embargo no se tiene una conclusión definitiva en relación a la correlación entre el infiltrado linfocitario de linfocitos T citotóxicos en los resultados de pacientes con cáncer de mama. Células T reguladoras FOXP3⁺ (Tregs) fueron inicialmente caracterizadas por el fenotipo de CD4⁺, CD 25⁺ y se piensan sean el principal obstáculo de la inmunidad antitumoral e inmunoterapia. Estas células efectivamente suprimen la proliferación y activación de los linfocitos citotóxicos en una forma contacto-dependiente o vía de liberación de citosinas como el factor transformante de crecimiento beta, en un modelo murino de cáncer de mama, una población de células T reguladoras enriquecidas dentro del tumor inhibieron la respuesta inmune Th1, varios estudios recientes han encontrado que la densidad del infiltrado tumoral de las células T reguladoras (Tregs), fue asociado con resultados clínicos adversos en cáncer de ovario, hepatocelular y páncreas. Debido a las acciones opuestas de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) y células T reguladoras (Tregs) en la inmunidad tumoral, no queda del todo claro cuál es el papel pronóstico de los CTLs en combinación con Tregs. Además la localización y los patrones de infiltrado de linfocitos T citotóxicos también se han identificado que fuertemente influyen en el pronóstico del tumor, hasta ahora son pocos estudios los cuales se han enfocado sobre el infiltrado linfocitario como factor pronóstico en cáncer de mama^{19,23}.

En el contexto del cáncer de mama triple negativo se han encontrado resultados mixtos para las diversas subpoblaciones de infiltrado tumoral linfocítico, tales como CD8 o Foxp3, han sido documentados en diferentes estudios. Varios grupos han extendido estas observaciones mediante el uso de inmunohistoquímica (IHC) para demostrar que niveles elevados de infiltrado por linfocitos CD 8 (linfocitos citotóxicos, CTLs) son asociados con buenos resultados en cáncer de mama. Lo contrario sin embargo parece ser cierto del infiltrado por linfocitos FOXP3. FOXP3 es un factor de transcripción de la familia que es esencial para el desarrollo y función de las células T reguladoras (Tregs) que son operacionalmente identificadas por la expresión de CD4, CD25, y FOXP3, este último es el único marcador más utilizado, bajo condiciones normales las células Tregs son supresores esenciales de respuestas inmune inapropiadas por lo que así mantienen la tolerancia inmunológica hacia los tejidos huésped, su supresión de la inmunidad antitumoral es considerada perjudicial. De hecho la presencia del infiltrado por linfocitos FOXP3 se ha asociado con pobre resultados clínicos en una amplia variedad de tipos de cáncer, alentando la especulación de que la depleción de linfocitos reguladores (Tregs) en pacientes con cáncer pudiera tener efectos terapéuticos benéficos. Sin

embargo un creciente número de estudios han demostrado que el infiltrado por linfocitos FOXP3 puede también ser asociado con un pronóstico favorable, aunque esta discordancia no es actualmente comprendida, es posible que este impacto del infiltrado por linfocitos FOXP3 en el pronóstico dependa de las características moleculares de un tipo específico de tumor²⁴.

Hasta la fecha varios estudios en cáncer de mama han mostrado una asociación consistente entre el infiltrado por linfocitos FOXP3 y pobres resultados clínicos, aunque ninguno de estos estudios se enfocó en subtipos moleculares o tipos histológico específicos de cáncer de mama, el infiltrado por linfocitos FOXP3 muestra una asociación consistente con tumores RE (receptores de estrógenos) negativos los cuales son biológicamente y clínicamente distintos de RE positivos, estos linfocitos FOXP3 se han demostrado asociarse con buen resultado principalmente en tumores con RE negativos, asociándose intrínsecamente con la negatividad de RE.

Con respecto al perfil de ILT pretratamiento, la mayoría de los estudios han evaluado ya sea la infiltración linfocítica en su conjunto o de un limitado conjunto de subpoblaciones de ILT como predictores de pCR. Sin embargo ninguna serie clínica en el tratamiento neoadyuvante ha incluido un espectro más amplio de las subpoblaciones de ILT y marcadores de macrófagos. Los cambios inducidos por la quimioterapia en las poblaciones con infiltrado linfocítico y el perfil inmunológico del tumor residual, es decir, la resistencia por parte del tumor a la quimioterapia, son aún menos conocidos, a pesar de que podrían ser más relevantes para determinar el pronóstico. Algunos reportes muestran un incremento en ILT (especialmente CD8) en pacientes respondedores, y otros datos apuntan a una disminución de algunas subpoblaciones TIL tales como Foxp3 pero de nuevo no hay evaluaciones integrales de QT NEO induce cambios en las subpoblaciones inmunes que estén disponibles, al final el impacto en el pronóstico del cambio en el perfil de infiltrado linfocitario, no se ha evaluado formalmente, y sólo se han hecho estudios en tumor residual de pacientes con cáncer de mama triple negativo, y no incluye datos relativos a los diferentes conjuntos de linfocitos. Si el cáncer de mama triple negativo muestra características heterogéneas, es importante investigar los factores patológicos asociados con la respuesta a la quimioterapia en pacientes con este tipo de cáncer²⁵.

La quimioterapia basada en antraciclinas (regímenes que involucran antraciclinas tales como doxorubicinas y epirubicina) han sido utilizadas clínicamente por más de dos décadas y regímenes de primera generación las han suplantado en gran medida como CMF (Ciclofosfamida, Metotrexate, 5 FU), se consideran que las antraciclinas ejercen sus efectos a través de una variedad de mecanismos, incluyendo la intercalación del DNA, el entrecruzamiento de DNA a las proteínas y la generación de radicales libres. Sin embargo la precisión de los mecanismos por los cuales ejercen su efecto terapéutico in vivo sigue sin estar del todo claro, tampoco se ha avanzado significativamente en el establecimiento de biomarcadores predictivos para identificar a los pacientes que puedan beneficiarse del tratamiento basado en antraciclinas. La atención se ha enfocado recientemente en el pronóstico y papel potencial predictivo de las respuestas inmunes antitumorales, detectadas indirectamente a través de la expresión de firmas genéticas derivadas del infiltrado de linfocitos tumorales (ILT) o directamente a través de la tinción inmunohistoquímica del infiltrado de estos linfocitos tumorales. Sin embargo no hay muchos estudios realizados específicamente con RE negativos, esto es importante por dos razones: primero, la respuesta patológica completa a QT NEO, definida como la ausencia completa de células tumorales invasivas en la mama y los ganglios linfáticos después del tratamiento, se producen casi exclusivamente en tumores con RE negativos. Segundo, se ha documentado que los tumores con RE negativos normalmente cuenta con niveles más altos de ILT que los tumores con RE positivos^{25,27}.

Aunque la quimioterapia neoadyuvante ha mejorado significativamente el manejo, una limitación fundamental de este enfoque es que muchos pacientes fallan al beneficio de la terapia y con frecuencia no es posible predecir las respuestas de los pacientes de manera individual a un régimen dado. Como tal en años recientes mucho del esfuerzo se ha dirigido hacia identificar características predictivas clínicas y biológicas que mejoren las terapias dirigidas a las necesidades individuales de los pacientes¹⁷⁻¹⁸.

En este contexto una respuesta inmune antitumoral más fuerte dirigida a una gama más amplia de antígenos en el cáncer de mama tendría potencialmente una mayor probabilidad de controlar la heterogeneidad de la población de células malignas presente en tumores primarios grandes y con metástasis emergentes. Esta hipótesis es apoyada por varios estudios mostrando que el grado de infiltración linfocítica es predictivo de una mejor respuesta local al tratamiento neoadyuvante y pronóstico del control de la enfermedad a largo tiempo¹⁹.

Datos actuales en la validación clínica y utilidad del infiltrado linfocitario en cáncer de mama.

Diversos estudios han evaluado el infiltrado linfocitario, en la mayoría de estos estudios, tanto el infiltrado intratumoral y estromal han sido evaluados, con la evaluación del compartimiento estromal ha demostrado ser más reproducible entre los estudios. Algunos estudios se enfocan en ILT mediante inmunohistoquímica, mientras que otros evalúan marcadores moleculares usando inmunohistoquímica y análisis de expresión de genes^{12,21}

JUSTIFICACIÓN:

La respuesta inmune en el cáncer de mama ha sido recientemente reconocida como un mecanismo mediador potencial de la progresión tumoral potencial y respuesta al tratamiento. El análisis de la línea de base del infiltrado linfocitario de tumores (ILT) parece ser un sustituto probable del equilibrio inmune en el microambiente tumoral en algunos reportes teniendo un valor pronóstico demostrado. Sin embargo la contribución de las diferentes subpoblaciones ILT a la clínica y al comportamiento biológico del tumor no se encuentra completamente claro.

La infiltración linfocitaria en cáncer de mama también ha demostrado ser un potente factor predictivo de respuesta en pacientes que reciben QT NEO, aunque el conocimiento a detalle de como la quimioterapia afecta la respuesta inmune en el cáncer de mama todavía no se encuentra completamente reconocida. Nuestra hipótesis se basa en si la presencia de mayor infiltrado linfocitario en muestras de Cáncer de mama triple Negativo localmente avanzado se asocia a una respuesta patológica mejor posterior al manejo con QT NEOadyuvante convencional.

El análisis del patrón de células inmunes en el tejido tumoral residual posterior a quimioterapia puede que aporte una mejor estratificación pronóstica de este grupo de mal pronóstico y contribuya a identificar subgrupos de pacientes susceptibles a estrategias terapéuticas dirigidas a la respuesta inmune del tumor. La identificación de estos pacientes de alto riesgo, especialmente en el grupo de enfermedad residual voluminosa, podría dar lugar a tratamientos adyuvantes inmunes dirigidos.

HIPOTESIS:

El tratamiento con QT neoadyuvante, induce cambios en los infiltrados inmunes en el ambiente tumoral, con impacto en el pronóstico y supervivencia especialmente en pacientes con cáncer de mama triple negativo. Una respuesta inmune activa se ha asociado con un pronóstico favorable. La presencia del infiltrado linfocitario en el tumor (ILT) ha emergido como un fuerte factor pronóstico especialmente en el subtipo triple negativo, pocas hipótesis generadas de estudios en series pequeñas de cáncer de mama indican que la exposición a drogas citotóxicas tales como antraciclinas y taxanos puede llevar a la atracción de linfocitos al lecho tumoral. La presencia de una inmunidad antitumoral ha demostrado que influye en la respuesta al tratamiento de citotóxicos.

A mayor presencia de infiltrado linfocitario (peritumoral, intratumoral y estromal) puede presentar mejor respuesta patológica posterior al tratamiento con QT NEOadyuvante en Cáncer de mama triple negativo localmente avanzado. El identificar la presencia del infiltrado linfocitario en tumores triple negativo antes del tratamiento con QT neoadyuvante, y el manejo quirúrgico, podría ser capaz de identificar subgrupos de pacientes con diferente pronóstico.

En el tratamiento con antraciclinas y taxanos, las pacientes con CMTN que presenten menor cantidad de infiltrado linfocitario (ILTumoral e ILEstromal) se asociarán a menor respuesta patológica completa, en comparación con aquellas que tengan mayor cantidad de infiltrado linfocítico, apoyando el que la quimioterapia induce cambios en la distribución de las subpoblaciones de linfocitos, con mejor respuesta patológica en los grupos que expresen mayor cantidad de infiltrado linfocítico pretratamiento con quimioterapia.

Apoyando el infiltrado linfocítico como potencial biomarcador pronóstico para el cáncer de mama triple negativo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Conocer si la presencia del infiltrado linfocitario (intratumoral, peritumoral y estromal) se asocia a una mejor respuesta patológica al tratamiento con QT Neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama Triple negativo localmente avanzado.

OBJETIVO PRIMARIO:

Determinar el papel del infiltrado linfocítico en el microambiente tumoral, y su repercusión como potencial marcador indirecto de respuesta patológica a la Quimioterapia neoadyuvante de pacientes con Cáncer de mama Triple negativo localmente avanzado.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- Determinar el período libre de enfermedad (PLE) en pacientes con CMTN.
- Determinar el intervalo libre de tratamiento (ILT) en pacientes con CMTN
- Conocer los esquema de quimioterapia administrada Neoadyuvante en pacientes con CMTN
- Determinar el tipo de tratamiento quirúrgico en pacientes con CMTN posterior a QT NEOadyuvante.
- Analizar la respuesta patológica en pacientes con CMTN bajo tratamiento con QT NEOadyuvante.
- Determinar el papel del infiltrado linfocitario se asocia a una mejor respuesta patológica al tratamiento convencional con QT Neoadyuvante

GRUPOS DE ESTUDIO:

Grupo 1: Pacientes con CMTN localmente avanzado tratadas con QT-Neo convencional.

TAMAÑO MUESTRAL:

Estudio retrospectivo de pacientes con diagnóstico de CMTN localmente avanzado tratadas con QT-NEO convencional entre Enero 1998 – Diciembre 2008, con un seguimiento mínimo de 5 años posterior a la QT-NEO La base de datos para este período y se cuenta con 104 pacientes con CMTN localmente avanzado tratadas con QT-NEO convencional.

TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO:

Estudio retrospectivo, transversal.

METODOLOGÍA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

La medida de **PLE** fue definida como el período de tiempo entre el inicio del primer tratamiento (QT-NEO) y la fecha de primer recurrencia. La fecha de primera recurrencia (**PR**) fue definida como el primer signo de progresión de enfermedad basada en estudios de imagen según criterios de RECIST. La **SG** se calculó desde la fecha de inicio de tratamiento (QT-NEO) hasta la fecha de muerte de la paciente debido a cáncer de mama (tiempo cuantificado en meses) para pacientes con CMTN y etapa clínica (**EC**) mediante la prueba de Kaplan-Meier log Rank.

Odds ratio será realizado utilizando regresión logística multivariada y aplicando el modelo proporcional odd para valorar la evidencia de no asociación entre infiltrado linfocítico y otros parámetros clínicos (edad, grado histológico y etapa clínica) en el análisis de sobrevida. Todos los análisis estadísticos serán realizados utilizando el software R. Se define como intervalo libre de tratamiento (**ILT**) como el tiempo entra cada línea de tratamiento y esto fue calculado desde la fecha del último ciclo de quimioterapia de primera línea hasta la fecha del primer ciclo de quimioterapia de segunda línea.

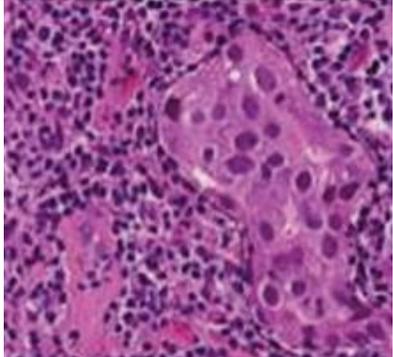
1. **Selección de pacientes:** Se incluirán pacientes que hayan sido tratadas con QT-NEO basada en Antraciclinas y/o Taxanos con diagnóstico de Cáncer de Mama Triple Negativo. Para cada paciente se registrarán los datos clínicos, asociados con las modalidades de tratamiento, calidad de respuesta terapéutica, así como seguimiento a largo plazo durante al menos 5 años. La respuesta al tratamiento será recabada de cada expediente y se obtendrán respuestas patológicas para cada paciente.
2. **Obtención de tejido tumoral:** Se utilizará un fragmento de tejido tumoral preservado en laminillas y bloques de parafina. El procedimiento de la toma de la muestra se realizará conforme al protocolo aprobado por el comité de ética y el comité científico Las muestras tumorales serán examinadas por dos patólogos capacitados (Dr. Manuel Pérez Sánchez/Dra Fanny Porras) para evitar la presencia de contaminación con tejido no tumoral.
3. **Evaluación patológica:** La expresión de los receptores de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y HER2 fue determinada en biopsias pretratamiento o en especímenes quirúrgicos si la IHQ no había sido previamente realizada. El efecto terapéutico patológico fue evaluado para tumores primarios resecados después de Quimioterapia Neoadyuvante, la **Respuesta completa patológica (pCR)** fue definida como la ausencia de toda enfermedad invasiva en el tumor primario de acuerdo al *National Surgical Adjuvant breast and Bowel Project (NSABP)*. La evaluación histopatológica de factores predictivos fue realizada tomando en cuenta parámetros como grado histológico, tipo histológico, presencia de linfocitos intratumorales y su correlación de estos con la respuesta patológica completa. El grado histológico fue asignado con base en los criterios de Elston y Ellis
4. **Análisis Histopatológico:** El análisis del infiltrado linfocitario se realizó en laminillas con cortes de 4-5 μm consideradas como óptimas con secciones marcadas en hematoxilina y eosina, utilizando microscopio de magnificación usualmente con magnificación de x200-400 (ocular x 10 con un objetivo de x20-x40) estandarizado. Evaluando:
 - 4.1. **Linfocitos intratumorales (iT_u-Ly)** definidos de acuerdo a **recomendaciones por el Grupo internacional TILs 2014**, ³⁵*Denkert Et. Al²* como células mononucleares intraepiteliales dentro de

los nidos de células tumorales y se informaran como el porcentaje de nidos epiteliales de tumor que contiene linfocitos infiltrantes. Sólo se evaluaron las células mononucleares que estaban en el epitelio de los nidos de células tumorales invasivas o en contacto directo con las células tumorales individuales. Cualquier infiltrado de carcinoma intraductal no se incluyó. El infiltrado debe consistir de células mononucleares (linfocitos o células plasmáticas) cualquier infiltrado de granulocitos en el área de necrosis del tumor no fue incluida.

Agrupados en porcentajes donde la ausencia de infiltrado fue considerada 0%, 1-10%, 11-30 %, 31-60 % \geq 61%

- 4.2. **Linfocitos del estroma (Str-Ly):** se define como el porcentaje del área de estroma tumoral que contiene un infiltrado linfocítico sin contacto directo con las células tumorales (ocupado por células inflamatorias mononucleares sobre el total del área de estroma tumoral). Sólo el estroma tumoral del carcinoma invasor fue incluido; el infiltrado estromal adyacente al carcinoma intraductal no fue incluido, además cualquier infiltrado inflamatorio alrededor del tejido mamario normal adyacente al tumor no fue incluido. Agrupados en porcentajes donde la ausencia de infiltrado fue considerada 0 %, 1-10%, 11-30 %, 31-60% y del \geq 61%, no tomando en el número de células del estroma².
- 4.3. **Predominio linfocitario:** se define como la presencia de infiltrado de linfocitos intratumorales en > 60% de los nidos celulares o linfocitos en > 60% de la superficie estromal².
- 4.4. **Sin infiltrado linfocitario:** definido como la ausencia de células mononucleares en los nidos de células tumorales y en el estroma tumoral².
- 4.5. **Infiltrado focal:** la detección de células mononucleares, pero en menos del 60% de predominio de Str-Ly o iTu-Ly².

Se excluyeron TILs en zonas de tumor con artefactos por aplastamiento, necrosis, hialinización regresiva.

Morfología	Definición y relevancia biológica ³⁵	Porcentaje de evaluación
Predominio de linfocitos		
	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de infiltrado de linfocitos intratumorales en > 60% de los nidos celulares. • Presencia de infiltrado de linfocitos en > 60 % de la superficie estromal. 	\geq60 %

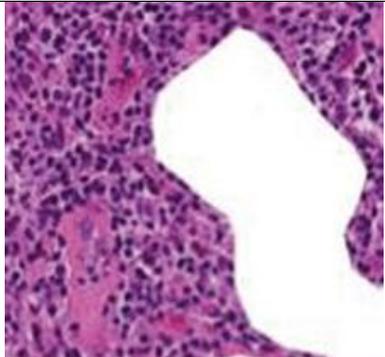
Infiltrado linfocitario estromal (Str-Ly)		
	<ul style="list-style-type: none"> • Área de estroma tumoral que contiene un infiltrado linfocitario sin contacto directo con las células tumorales. • Indicador de aumento en la acumulación de células inmunes en el tejido tumoral 	<p style="text-align: center;"> 0 % 1-10 % 11-30% 31-60 % >61 % </p>
Infiltrado linfocitario intratumoral (iTU-Ly)		
	<ul style="list-style-type: none"> • Sólo células mononucleares que están en el epitelio de los nidos de células tumorales invasivas o en contacto directo con las células tumorales individuales. 	<p style="text-align: center;"> 0 % 1-10 % 11-30% 31-60 % >61 % </p>

Tabla 1. Cáncer de mama triple negativo: Definiciones y morfología.

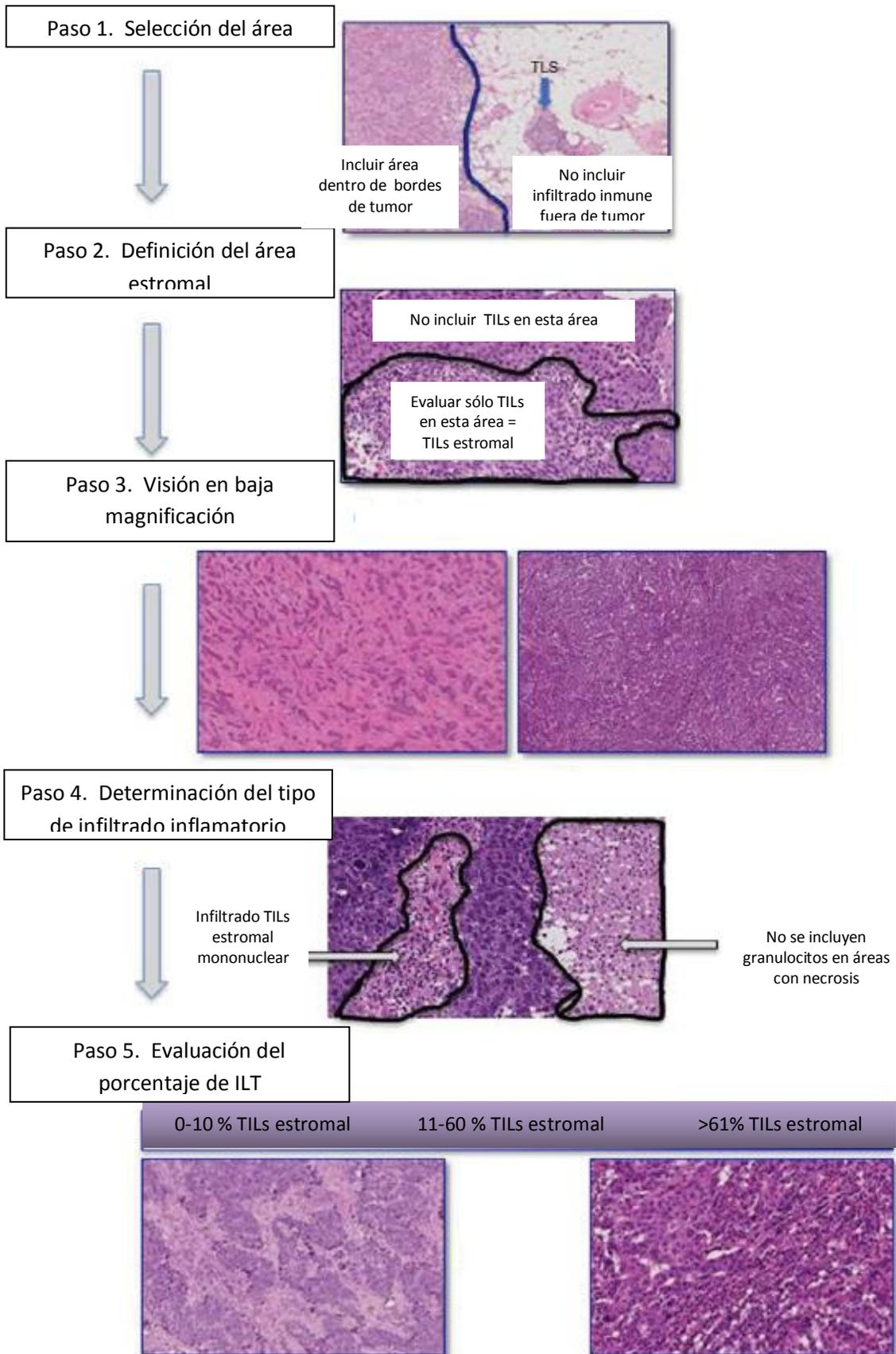


Figura 3. Abordaje estandarizado para la evaluación del infiltrado linfocitario (ILT) en cáncer de mama

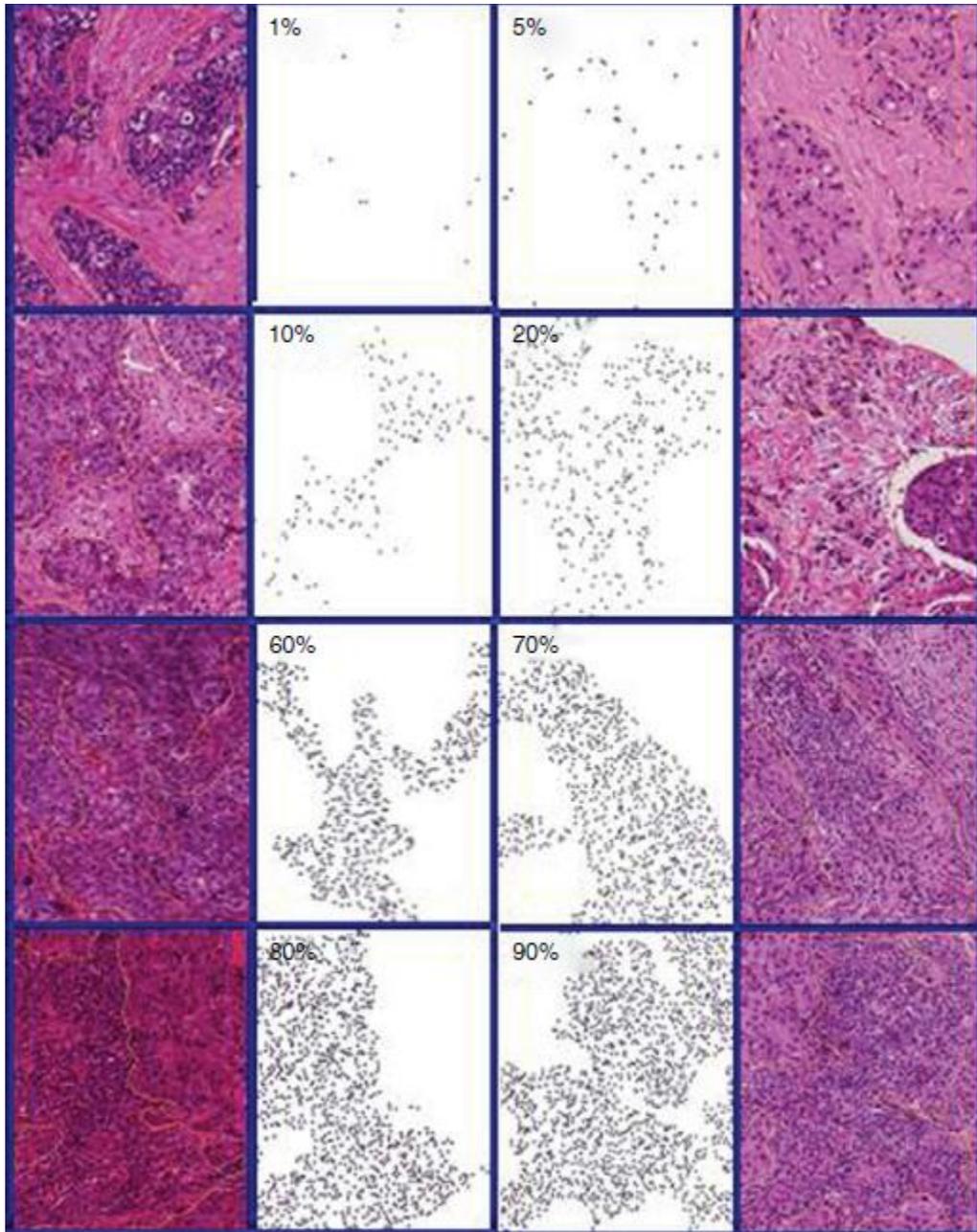


Fig 4. Porcentaje de infiltrado linfocitario, (ILT estromales), las imágenes fueron seleccionadas de manera representativa de diferentes niveles de ILT basado en los resultados de los patólogos así como el análisis de imágenes.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Pacientes con diagnóstico de CMTN localmente avanzado tratadas con QT-NEO y llevadas a cirugía posterior al tratamiento neoadyuvante entre Enero 1998 – Diciembre 2008 en el Instituto Nacional de Cancerología.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Pacientes con perfil molecular diferente a Triple Negativo, pacientes que no hayan sido tratadas con QT-NEO.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

Pacientes con expedientes incompletos en donde no se encuentre un registro adecuado de las variables por analizar

ANALISIS DE VARIABLES:

1. Edad al momento de diagnóstico
2. Tamaño tumoral
3. Tipo Histológico
4. Grado de Scarff-Bloom Richardson (SBR)
5. PR, SG, PLE , ILT
6. Tipo de Quimioterapia neoadyuvante administrada
7. Respuesta patológica completa
8. Manejo quirúrgico (Cirugía conservadora vs Mastectomía)
9. Presencia de márgenes positivos
10. Ganglio centinela vs disección radical axilar

VALIDEZ INTERNA Y EXTERNA: Buen nivel.

RESULTADOS ESPERADOS:

- Determinar si la presencia del infiltrado linfocitario puede asociarse con una respuesta completa patológica al tratamiento con QT-NEO basada en Antraciclinas, Taxanos y cisplatino en pacientes con CMTN localmente avanzado.
- Redacción de al menos un artículo para enviarse a publicación en una revista indexada relacionada a cáncer de mama y/o ginecología oncológica.

PERIODO DE REALIZACION DE LA INVESTIGACION: Pacientes con diagnóstico de CMTN localmente avanzado, tratadas con QT-NEO convencional entre Enero 1998 – Diciembre 2008, con un seguimiento mínimo de 5 años posterior a la QT-NEO.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES:

Primer cuatrimestre: Se analizarán la cantidad del infiltrado linfocitario tumoral, como controles se emplearán muestras tumorales en bloques de parafina pre tratamiento de quimioterapia y posterior a tratamiento de quimioterapia, las áreas a tomar para el análisis serán predominantemente indicadas por un patólogo como las áreas de mayor cantidad tumoral de acuerdo a las definiciones establecidas por (*Denkert et al*) Para la inmunohistoquímica se tomarán cortes de 4µm fr tejido tumoral, desparafinado rehidratado y procesado con métodos estándar usando un equipo automatizado. Para el estudio de ILT, se establecerán por el análisis en porcentaje de los linfocitos que infiltran el tejido tumoral y se establecerán de acuerdo a las definiciones previas tres grupos de predominio de linfocitos intratumorales (**iTu-Ly**) y linfocitos estromales (**str-Ly**), una vez estandarizados estos protocolos de las técnicas de laboratorio y análisis de patología, se comenzarán a emplear para obtener los datos en porcentaje del infiltrado linfocítico, establecer los grupos de estudio

Segundo cuatrimestre: Se continuarán los análisis de los datos reunidos. En esta etapa se realizará la comparación de los resultados obtenidos en laboratorio con las características clínicas para cada paciente y se registrarán los resultados del estudio.

Tercer Cuatrimestre: En esta última etapa del proyecto consolidaremos los resultados experimentales con los datos clínicos, para posteriormente concentrarnos en la redacción de los manuscritos, presentación de resultados y el envío del manuscrito final para su publicación en una revista internacional con factor de impacto.

RECURSOS DISPONIBLES:**Recursos humanos**

Dra Maybelline Robles Estrada

Responsable de la investigación

Residente de tercer año de la subespecialidad Cirugía Oncológica

Instituto Nacional de Cancerología.

Función: Coordinación, seguimiento y responsable de la investigación.

Dr. Javier Cesar Mejía Gómez

Residente de tercer año de la subespecialidad Ginecología Oncológica

Instituto Nacional de Cancerología.

Función: Coordinación, y seguimiento de la investigación.

Investigadores asociados:

Dr Juan Enrique Bargalló Rocha

Cirujano Oncólogo

Jefe de departamento de tumores mamarios

Instituto Nacional de Cancerología.

Función: Tutor de proyecto e investigador asociado.

Dr. Víctor Manuel Pérez Sánchez

Jefe del departamento de Patología Quirúrgica

Investigador Nacional (SIN I)

Co Tutor de Proyecto de investigación.

Dra Fanny Iris Porras Reyes

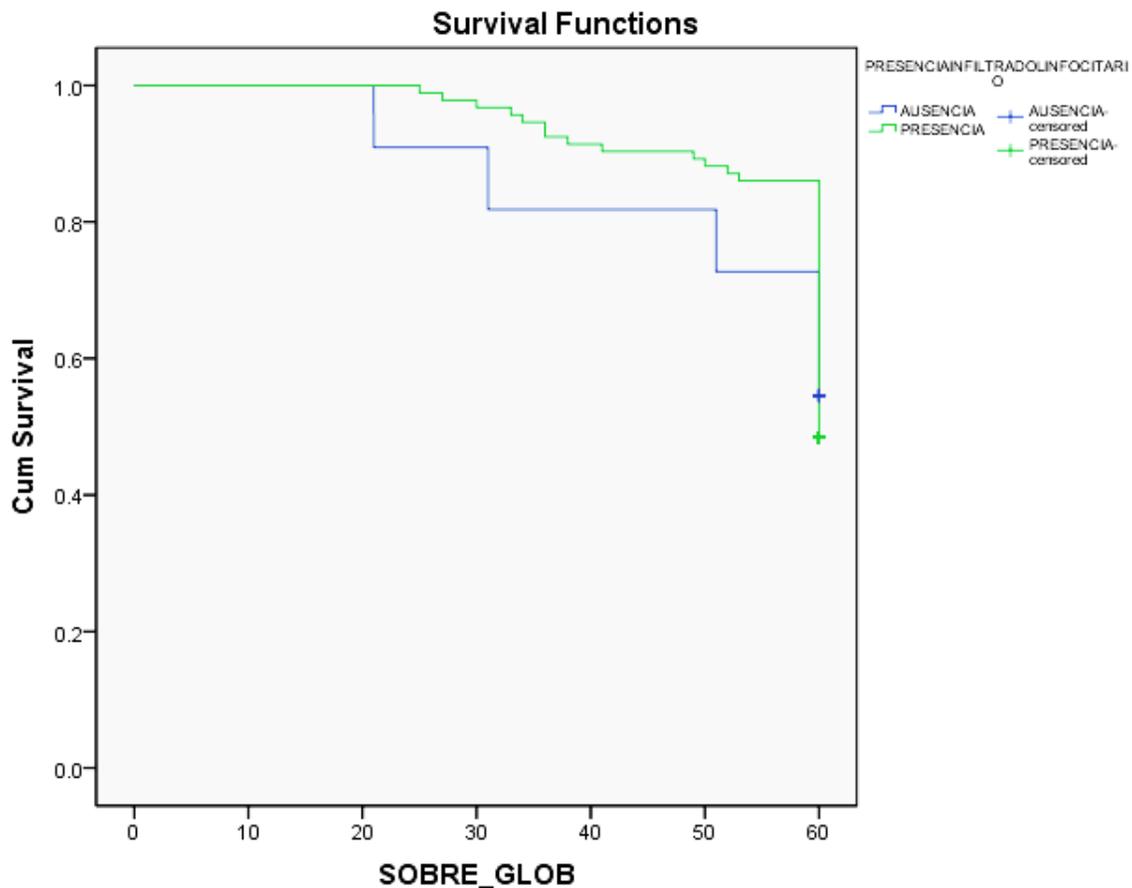
Patóloga oncóloga

Instituto Nacional de Cancerología.

RESULTADOS

SOBREVIDA GLOBAL

El análisis de sobrevida se realizó en 104 casos de cáncer de mama triple negativo localmente avanzado manejados con QT neoadyuvante convencional basada en (Antraciclinas y taxanos) o platino en un período comprendido del 2007-2010. Se obtuvo al compararlos contra la presencia o ausencia de infiltrado linfocitario



- Pacientes con presencia de infiltrado tumoral total, representado por la suma de infiltrado peritumoral + infiltrado tumoral y estromal. Se encontró un total de 11 muertes en el grupo de pacientes con CMTN.
- Pacientes con ausencia de infiltrado tumoral, es decir sin presencia de infiltrado peritumoral, intratumoral y estromal. Se encontró un total de 93 muertes en el grupo de pacientes con CMTN.

Comparación de Sobrevida global en pacientes con CMTN con presencia o ausencia de infiltrado linfocitario

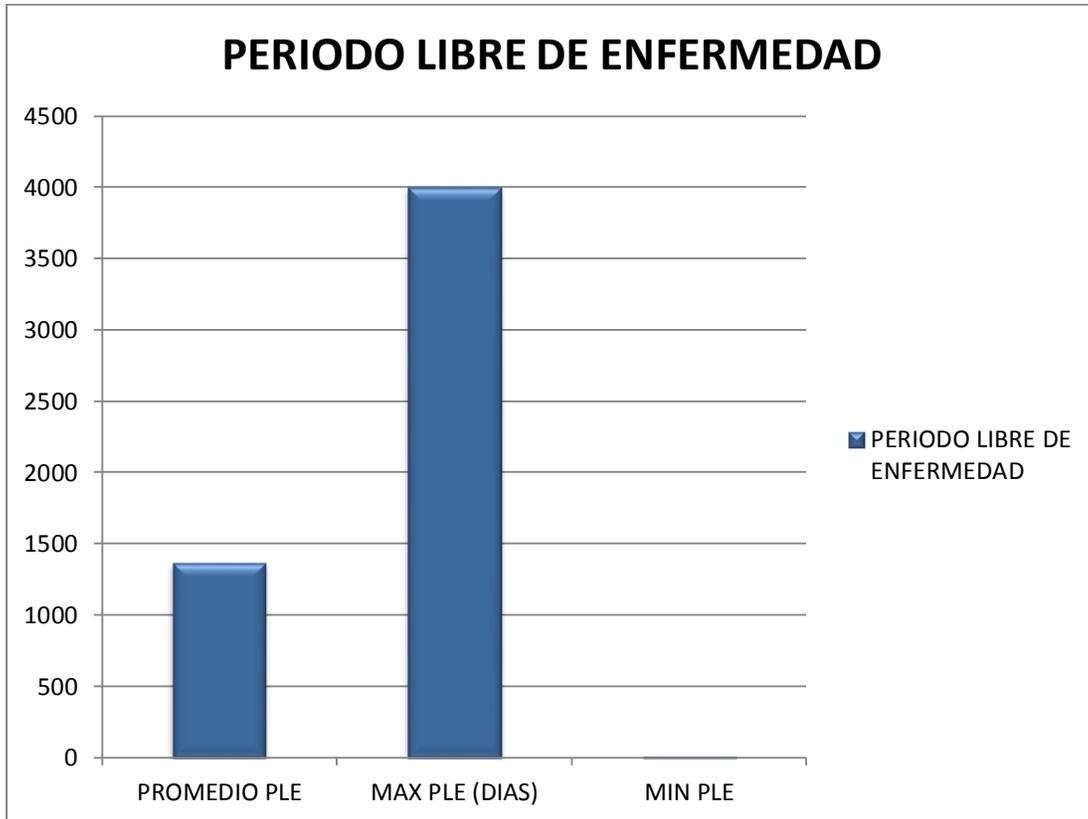
Al realizar el análisis comparativo ante la presencia o ausencia de infiltrado linfocitario y la sobrevida global entre ambos grupos de pacientes con CMTN, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la sobrevida global ($p=0.953$).

Este resultado es obtenido probablemente por la baja cantidad de pacientes en nuestra muestra (n=104)

PERIODO LIBRE DE ENFERMEDAD

Al realizar el análisis de período libre de enfermedad comparando los dos grupos ante presencia o ausencia de infiltrado linfocitario tumoral

No se observó una diferencia estadísticamente significativa en el período libre de enfermedad entre aquellas pacientes que tuvieron infiltrado linfocitario tumoral y el grupo de pacientes sin presencia de infiltrado linfocitario (p=0.815) Este resultado al igual que sobrevida global puede estar explicado probablemente por la baja cantidad de pacientes en nuestra muestra (n=104).

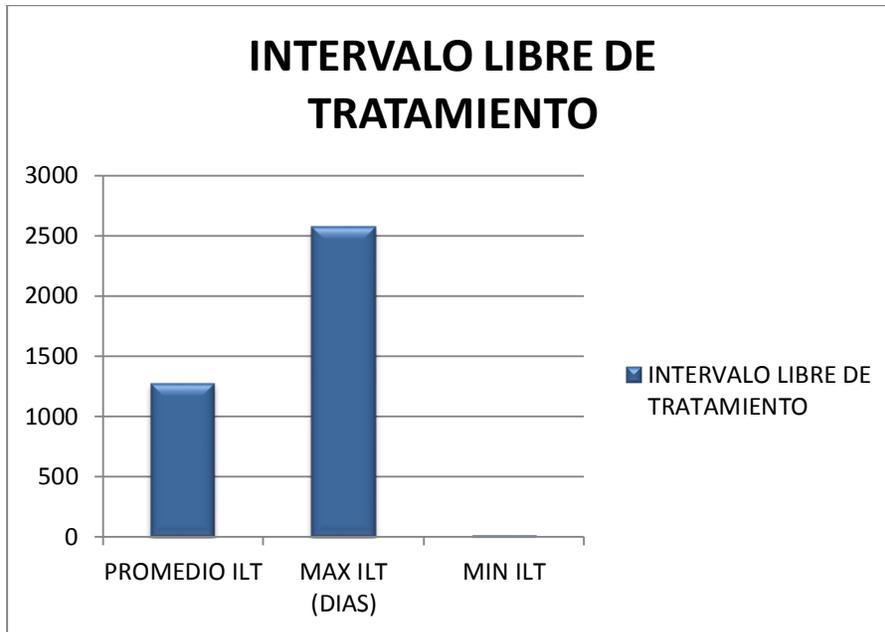


Análisis de período libre de enfermedad (PLE) con cáncer de mama triple negativo	
Variable	Meses
Promedio PLE	45.7
Máximo PLE	133.3
Mínimo PLE	0.06

El promedio de período libre de enfermedad fue de 45.7 meses, el mínimo período libre de enfermedad encontrado en toda la muestra fue de 15 días vs el máximo de 13.3 meses.

INTERVALO LIBRE DE TRATAMIENTO

En cuanto al período libre de tratamiento se obtuvo en el análisis de 104 pacientes con CMTN tratados con QT Neo adyuvante un promedio de 42.5 meses de intervalo libre de tratamiento, siendo el máximo alcanzado de 85.5 meses vs 15 días.



Análisis de intervalo libre de tratamiento (ILT) con cáncer de mama triple negativo	
Variable	Meses
Promedio ILT	42.5
Máximo ILT	85.5
Mínimo ILT	0.06

EDAD AL MOMENTO DE DIAGNOSTICO

En una muestra de 104 pacientes con Cáncer de mama triple negativo se encontró en relación a la edad promedio al momento de diagnóstico fue de 54.8 años con una edad mínima de 26 años vs 79 años como la edad más alta al momento de diagnóstico

Análisis de edad al momento de diagnóstico de Cáncer de mama triple Negativo	
Variable	Años
Edad promedio	54.8
Edad mínima	26
Edad máxima	79

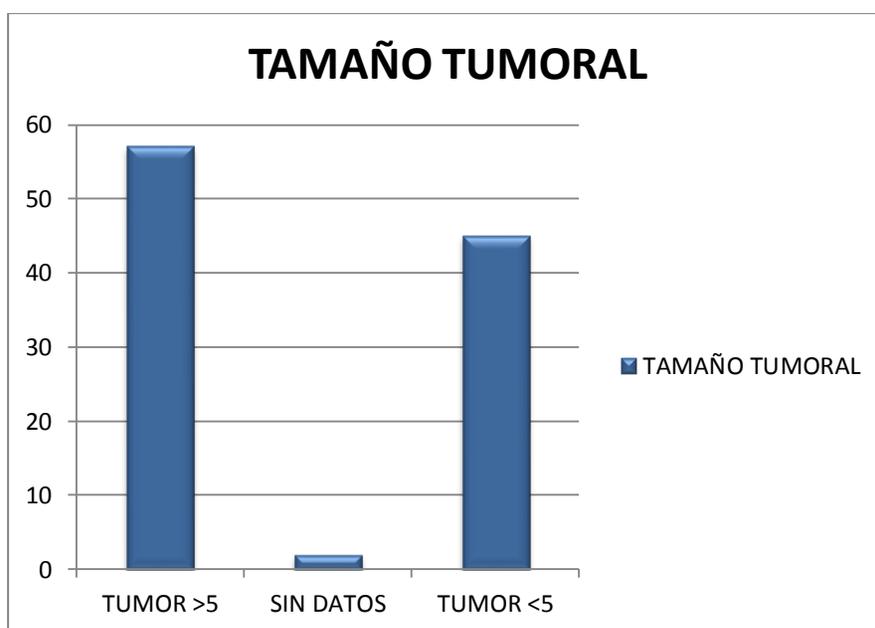
INDICE DE SCARFF-BLOMM RICHARDSON (SBR)

Se encontró que en el análisis de 104 pacientes con CMTN, el 84.6% (88 pacientes) tuvieron G3 de acuerdo al índice de Scarff Blomm Richardson (SBR), solo 12.5 % (13 pacientes) fueron G1 y G2 y en 3 pacientes no se contaron con el dato para el análisis.

Análisis de SBR	
SBR	No. Pacientes
G1 Y G2	13
G3	88
Sin datos	3

TAMAÑO TUMORAL

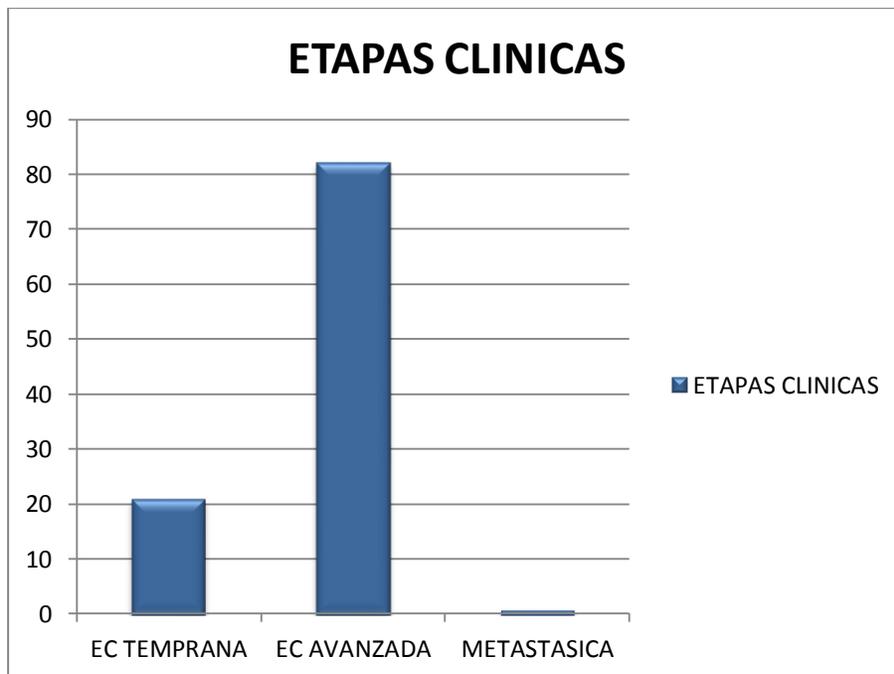
En cuanto al tamaño tumoral en la muestra de 104 pacientes con CMTN se encontró que el 54.8% (57 pacientes) tuvieron un tamaño inicialmente determinado por clínica mayor de 5cm al momento de ser valoradas por primera vez en la consulta de tumores mamarios. vs 43.2% (45 pacientes) menor de 5cm, en dos pacientes no se encontró datos referidos con respecto a tamaño tumoral.



Análisis de tamaño tumoral en cáncer de mama triple negativo	
Variable	No pacientes
Tamaño de tumor >5cm	57
Tamaño de tumor <5cm	45
Sin datos	2

ETAPA CLINICA

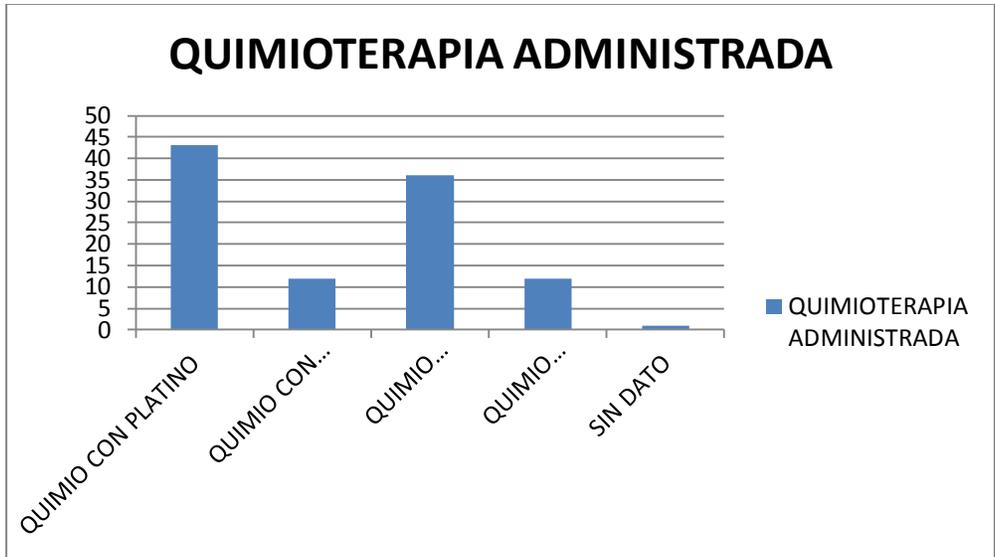
Con respecto a la etapa clínica que se encontró en 104 pacientes con CMTN con manejo QT Neoadyuvante se encontró reportadas 21 pacientes con EC temprana (I-IIB1), 82 pacientes con EC Avanzada (IIB2-IIIc) y 1 paciente con EC IV (metastásica).



Análisis de Etapa Clínica en cáncer de mama triple negativo	
Variable	No pacientes
EC Temprana (I-IIB1)	21
EC Avanzada (IIB2-IIIc)	82
Metastásica (IV)	1

QUIMIOTERAPIA ADMINISTRADA EN CANCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

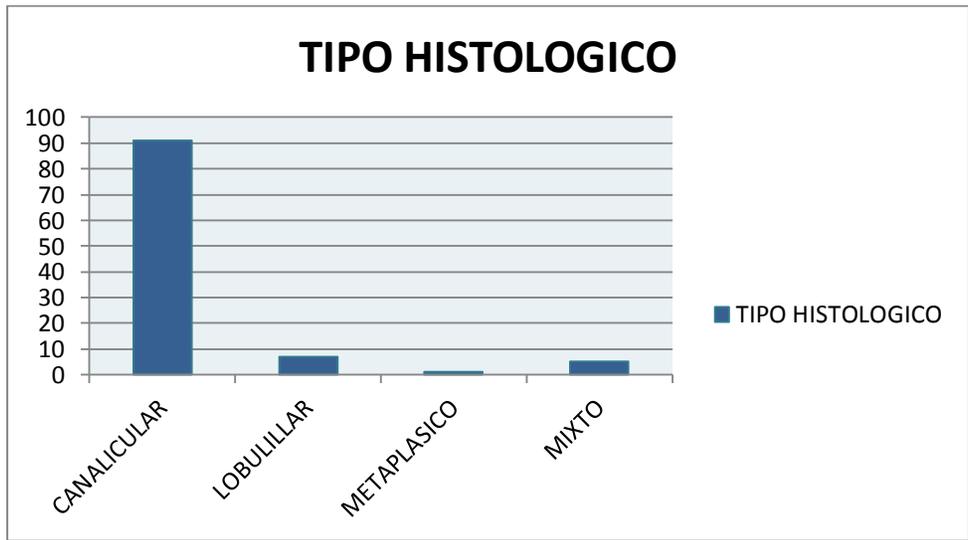
Al respecto de que tipo de esquema de quimioterapia fue administrado en la muestra de 104 pacientes con Cáncer de mama triple negativo se encontró que el 52.8% (55 pacientes) recibieron esquemas que incluían Cisplatino de las cuales 12 pacientes se integró Radioterapia, y 46.1 % (48 pacientes) recibieron esquema de quimioterapia convencional a base de taxanos y antraciclinas de los cuales 12 pacientes incluían radioterapia, sólo en una paciente no se encontró documentado que tipo de esquema recibió.



Análisis de Esquema de quimioterapia en cáncer de mama triple negativo	
Variable	No pacientes
EC Temprana (I-IIb1)	21
EC Avanzada (IIb2-IIIc)	82
Metastásica (IV)	1

ESTIRPE HISTOLOGICO

Se encontró que 91 pacientes tuvieron un predominio de tipo histológico canalicular, 7 pacientes fueron de tipo lobulillar 1 paciente con metaplasico y 5 pacientes se determinó tipo mixto.



Análisis de tipo histológico en cáncer de mama triple negativo	
Variable	No pacientes
Canalicular	91
Lobulillar	7
Metaplasico	1
Mixto	5

TRATAMIENTO QUIRURGICO.

Con respecto al manejo quirúrgico en 104 pacientes con Cáncer de mama triple negativo se encontró que 98% pacientes fueron manejadas con Mastectomía Radical Modificada, y sólo 1.9% pacientes fueron tratadas con cirugía conservadora.

Análisis de tratamiento quirúrgico en cáncer de mama triple negativo	
Tratamiento	No pacientes
Mastectomía Radical Modificada	102
Cirugía conservadora	2

TRATAMIENTO QUIRURGICO CON DISECCION RADICAL DE AXILA VS GANGLIO CENTINELA

Se documentó que 57.6 % de las pacientes fueron tratadas con Ganglio centinela y sólo 42.3% pacientes fueron manejadas con Disección Radical de axila.

Análisis de tratamiento quirúrgico en cáncer de mama triple negativo	
Tratamiento	No pacientes
Disección Radical de Axila	44
Ganglio Centinela	60

MARGENES QUIRURGICOS EN PIEZA PATOLOGICA.

En el análisis de las piezas quirúrgicas se encontró que el 94.2 % fueron reportados como márgenes quirúrgicos como negativos y sólo 5.7 % fueron reportados como positivos.

Análisis de márgenes quirúrgicos en pieza patológica en cáncer de mama triple negativo	
Márgenes	No pacientes
Negativos	98
Positivos	6

RESPUESTA PATOLOGICA

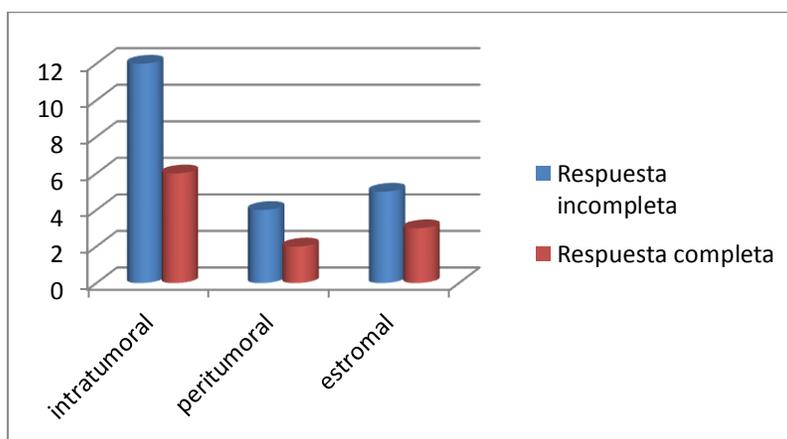
Se documentó en expediente como respuesta patológica completa a 42.3 % (44 pacientes) con diagnóstico de Cáncer de Mama Triple Negativo posterior a QT Neoadyuvante vs 57.6 % (60 pacientes) que fueron reportados como respuesta incompleta posterior al manejo con QT Neoadyuvante.

Análisis de Respuesta Patológica en cáncer de mama triple negativo posterior a QT Neoadyuvante	
Respuesta patológica	No pacientes
Completa	44
Incompleta	60

INFILTRADO LINFOCITICO Y RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE

Con base en los resultados del análisis de 104 pacientes al revisar las biopsias tumorales y correlacionar la presencia de infiltrado con respuesta patológica completa vs incompleta se obtuvo lo siguiente:

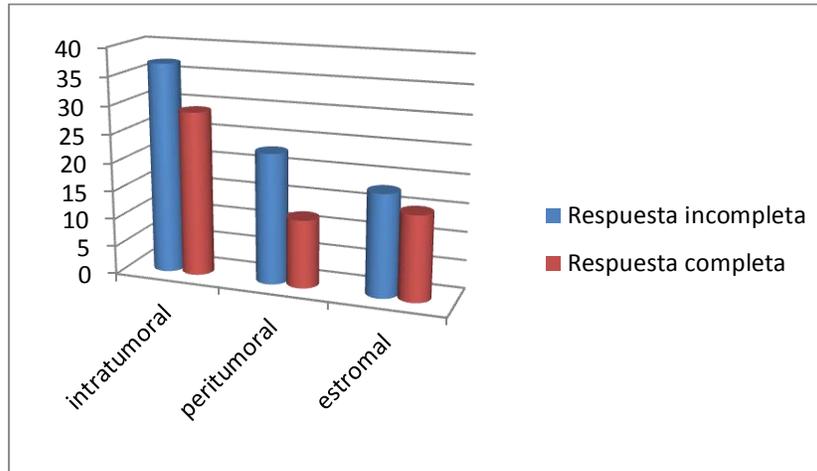
Ante el 0% de infiltrado linfocitario (peritumoral y tumoral) se encontró que 7.6% (8 pacientes) tuvieron respuesta completa y vs 2.8 % (3 pacientes) en infiltrado estromal a diferencia de 15.3 % (16 pacientes) con infiltrado tumoral y respuesta incompleta vs 4.8% (5 pacientes) con infiltrado estromal y respuesta incompleta



Análisis de 0 % de infiltrado linfocitario, con respuesta completa vs incompleta post QTNeoadyuvante en Cáncer de mama Triple Negativo			
Respuesta patológica	TILs intratumoral (No pacientes)	TILs Peritumoral (No pacientes)	TILs Estromal (No pacientes)
Completa	6	2	3
Incompleta	12	4	5

1-10 % de infiltrado linfocitario

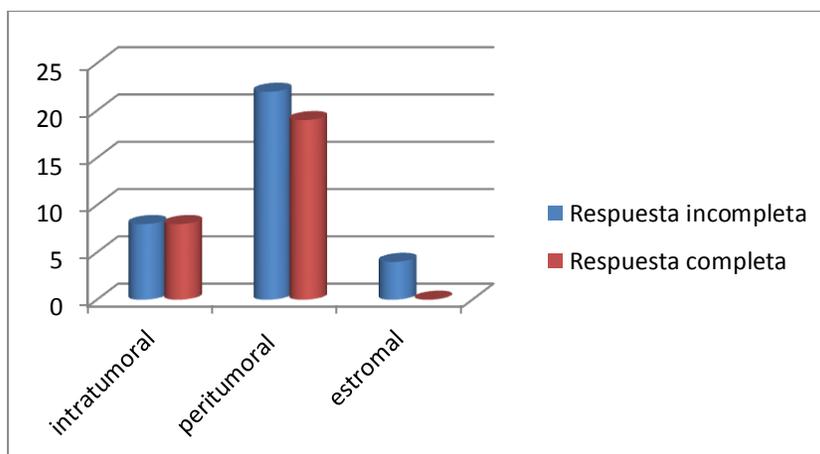
Al realizar el análisis en cuanto al grupo de 1-10% de infiltrado linfocitario tumoral (peritumoral e intratumoral) se obtuvo que el 39.4% (41 pacientes) vs 14.4% (15 pacientes) con infiltrado estromal tuvieron respuesta patológica completa vs 58.6% (61 pacientes) con infiltrado tumoral (peritumoral e intratumoral) que tuvieron respuesta incompleta y 17.3% (18 pacientes) con infiltrado estromal.



Análisis de 1-10 % de infiltrado linfocitario, con respuesta completa vs incompleta post QTNeoadyuvante en Cáncer de mama Triple Negativo			
Respuesta patológica	TILs intratumoral (No pacientes)	TILs Peritumoral (No pacientes)	TILs Estromal (No pacientes)
Completa	29	23	15
Incompleta	37	12	18

11-30 % de infiltrado linfocitario

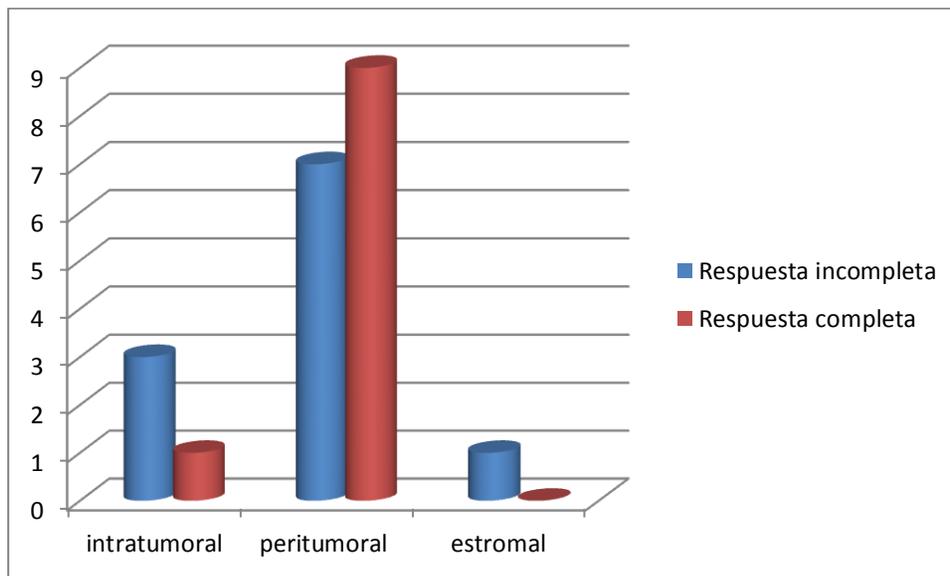
Ante la presencia de 11-30 % de infiltrado linfocitario se encontró que 25.9 % (27 pacientes) vs 0 pacientes tuvieron infiltrado estromal con respuesta completa a tratamiento de QT Neoadyuvante. Y con respuesta incompleta se obtuvo que el 28.8 % (30 pacientes) tuvieron un infiltrado tumoral vs 3.8% (4 pacientes) con infiltrado estromal.



Análisis de 11-30 % de infiltrado linfocitario, con respuesta completa vs incompleta post QTNeoadyuvante en Cáncer de mama Triple Negativo			
Respuesta patológica	TILs intratumoral (No pacientes)	TILs Peritumoral (No pacientes)	TILs Estromal (No pacientes)
Completa	8	19	0
Incompleta	8	22	4

31-60 % infiltrado linfocitario

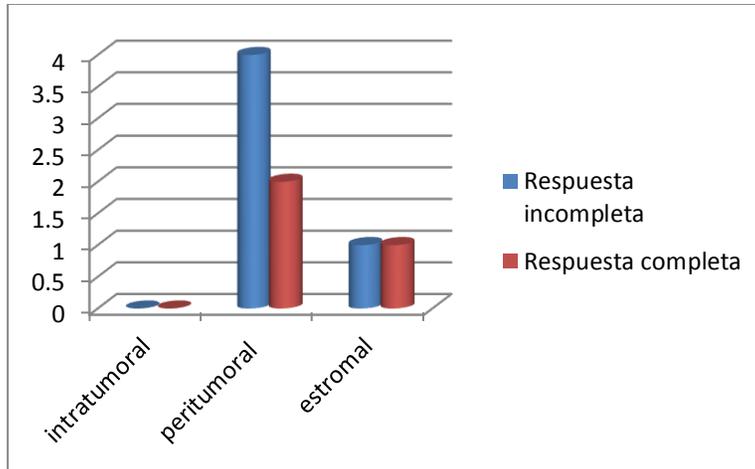
En cuanto al infiltrado intratumoral y peritumoral se encontró en un 31-60 % en 9.6% (10 pacientes) vs 0 pacientes con infiltrado estromal y respuesta completa a manejo Neoadyuvante vs en el grupo de respuesta incompleta el 10.5 % (11pacientes) con infiltrado intratumoral y peritumoral y un paciente (0.9%) con infiltrado estroma.



Análisis de 31-60% de infiltrado linfocitario, con respuesta completa vs incompleta post QTNeoadyuvante en Cáncer de mama Triple Negativo			
Respuesta patológica	TILs intratumoral (No pacientes)	TILs Peritumoral (No pacientes)	TILs Estromal (No pacientes)
Completa	1	9	0
Incompleta	3	7	1

Mayor a 61% de infiltrado linfocitario

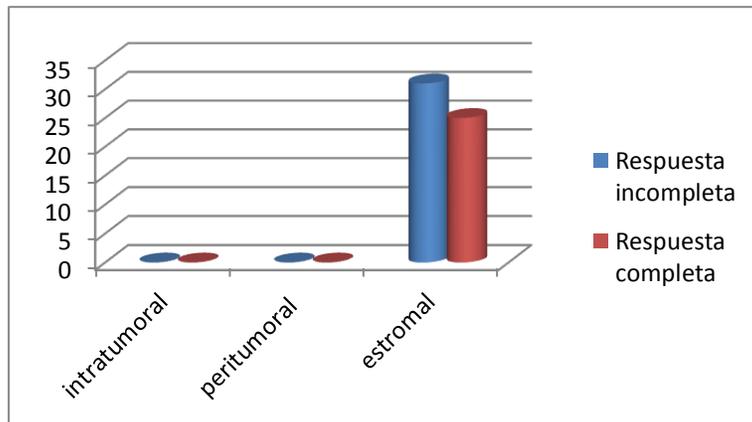
Sólo se identificó que el 3.8 % (4 pacientes) en el grupo de respuesta completa con infiltrado peritumoral, sin presencia de infiltrado tumoral y un paciente (0.96%) con infiltrado estromal.



Análisis de >61% de infiltrado linfocitario, con respuesta completa vs incompleta post QTNeoadyuvante en Cáncer de mama Triple Negativo			
Respuesta patológica	TILs intratumoral (No pacientes)	TILs Peritumoral (No pacientes)	TILs Estromal (No pacientes)
Completa	0	4	1
Incompleta	0	2	1

Infiltrado linfocitario No valorable

Se identificó que el 29.8 % (31 pacientes) con infiltrado estromal únicamente en el grupo de respuesta incompleta vs 24% (25 pacientes) en el grupo de respuesta completa esto puede ser debido a que la muestra en laminilla podría estar sustituida en su totalidad con linfocitos tumorales vs necrosis, o el tejido en analizar era muy escaso por lo que no pudo identificarse más infiltrado estromal.



DISCUSION:

a) Subtipos del cáncer de mama triple negativo

El CMTN es una enfermedad clínicamente, patológicamente y molecularmente heterogénea. Lehmann y colaboradores identificaron seis diferentes subtipos de CMTN, mediante el análisis de expresión genética de 386 casos; cada uno de ellos demostrando características biológicas únicas.³⁹ Es de vital importancia buscar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de cada uno de estos subtipos, ya que menos del 30% de las pacientes con CMTN metastásico tienen una supervivencia mayor o igual a 5 años. La supervivencia media de las pacientes con CMTN metastásico es de 13 meses, y prácticamente todas las pacientes con CMTN metastásico mueren de su enfermedad a pesar del tratamiento sistémico.⁴⁰ A la fecha no existe terapia blanco para el tratamiento del CMTN y la quimioterapia sistémica sigue siendo el estándar de tratamiento.

A pesar que los términos Triple Negativo y Tipo Basal (Basal Like) no son sinónimos, aproximadamente 80% del CMTN (RE/RP/HER2 negativo) se clasifican como Tipo Basal.

Los seis subtipos de CMTN incluyen: dos Tipos Basales (BL1 y BL2), un tipo Inmunomodulador, un Mesenquimal (M), así como un tipo Células Madre Mesenquimales (MSL), y finalmente un subtipo Receptor de Andrógeno Luminal (LAR) este último se caracteriza por la presencia de receptores de andrógeno.³⁹

SUBTIPOS DE CANCER DE MAMA			
SUBTIPO	CARACTERÍSTICAS	TB POTENCIALES	TASA DE RPC ³
BASAL LIKE 1	Ciclo Celular Elevado. Expresión de genes de respuesta de daño al ADN.	Platino Inhibidores del PARP	0.52
BASAL LIKE 2	Enriquecido en señalización de factores de crecimiento así como genes mioepiteliales.	Inhibidores de mTOR	0
INMUNOMODULADOR	Compuesto por antígenos inmunes y genes involucrados en las vías inmunes centrales y de citoquina, de señalización y transducción. Infiltrado linfocitario tumoral.	Inhibidores de PD-1 / PDL-2	0.3
MESENQUIMAL	Expresión elevada de genes involucrados en la transición epitelial-mesenquimal y vías de factor de crecimiento.	Inhibidores de Tirocin-quinasa (dasatinib) / mTOR	0.31

CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	Expresión elevada de genes involucrados en la transición epitelial-mesenquimal y vías de factor de crecimiento. Expresión disminuida de genes involucrados en la proliferación.	Inhibidores de PI3K / mTOR	0.23
RECEPTOR DE ANDRÓGENO LUMINAL	Expresión genética luminal Activado por el Receptor de Andrógeno (RA). Crecimiento lento.	Antagonistas de RA (bicalutamida) Inhibidores de PI3K	0.1

TB: TERAPIA BLANCO, RPC: RESPUESTA PATOLÓGICA COMPLETA AL TRATAMIENTO CON QT/NEO CONVENCIONAL BASADA EN ANTRACICLINAS Y TAXANOS

Recientemente en un trabajo publicado por el grupo de Masuda y colaboradores, realizó un análisis retrospectivo de 130 pacientes con CMTN tratadas con QT/NEO basada en Adriamicina/Taxol.⁴¹ La tasa de RPC fue del 28% sin embargo esta tasa demostró una variación significativa respecto al subtipo de CMTN. Se encontró hasta 52% de RPC para BL1; sin embargo los subtipos BL2, LAR y MSL tuvieron la tasa de RPC más baja (0%, 10% y 23%, respectivamente). Estos hallazgos, así como futuros estudios prospectivos, deberán servir como guías en la selección del tratamiento quimioterapéutico de pacientes con CMTN en un afán de encontrar terapias blanco efectivas.

Liedtke y colaboradores establecieron que aquellas pacientes con cáncer de mama que logren alcanzar una RPC (ausencia de enfermedad residual en mama y axila) posterior al tratamiento con QT/NEO tienen un buen resultado a largo plazo.¹⁹ Por el contrario, una alta carga tumoral residual (CTR) encontrada en la pieza quirúrgica y posterior al tratamiento ha demostrado una elevada correlación con recurrencia y muerte.⁴³⁻⁴⁴ De manera más específica, al menos 40% de las pacientes con CMTN que no logran alcanzar una RPC post QT/NEO basada en Antraciclinas y Taxanos tendrán una recurrencia en los siguientes 36 meses.⁴⁵ Sin embargo, aproximadamente 30% del CMTN tratado con QT basada en Antraciclinas y Taxanos tendrá una RPC posterior al tratamiento; el lograr una RPC al tratamiento con QT/NEO en este grupo de pacientes ha demostrado ser un fuerte factor pronóstico positivo. Las pacientes con CMTN quienes completan QT/NEO y carecen de evidencia clínica de enfermedad metastásica posterior al tratamiento quirúrgico, sin importar la CTR usualmente se dejan en vigilancia sin algún tipo de tratamiento adyuvante. Esta conducta puede que no sea apropiada para las pacientes que se encuentran en un riesgo muy elevado de recurrencia temprana tales como aquellas con una alta CTR quimio-resistente. Sin embargo, el tratamiento apropiado para aquellas pacientes es aún desconocido, y las estrategias terapéuticas individualizadas utilizando quimioterapia neoadyuvante molecularmente dirigida a dianas tumorales específicas se requieren con urgencia.

El grupo de Burstein y colaboradores⁴⁵ han subclasificado al CMTN mediante un análisis transcripcional con un menor número de pacientes (N: 84), en comparación con el utilizado por Lehmann. La clasificación del Baylor College of Medicine del CMTN, los divide en cuatro grupos: Receptor de Andrógeno Luminal (LAR), Mesenquimal (MES), Tipo Basal Inmuno-Suprimido (BLIS), Tipo Basal Inmuno-Activado (BLIA). De manera similar al estudio publicado por Lehmann, las pacientes con CMTN con tumores que expresan características de componente inmune tuvieron el mejor resultado. Al comparar los dos estudios existe una evidente correlación entre los subtipos: MSL y MES, IM y BL1 con BLIA, M con BLIS y los dos subtipos LAR. El grupo

Francés encabezado por Jezequel y colaboradores,⁴⁶ publicaron la subclasificación del CMTN más reciente (N: 107) y la dividieron en tres diferentes tipos: C1, C2 y C3 los cuales se correlacionan con los subtipos propuestos por Lehmann y Burstein.

ESTUDIOS QUE AVALAN LA SUBCLASIFICACIÓN DEL CMTN		
JEZEQUEL N=107	LEHMANN N=386	BURSTEIN N=84
C1	LAR	LAR
C2	BL1 / M	BLIS
C3	IM	BLIA
	MSL	MES
	BL2	

La identificación de los diferentes subtipos del CMTN, caracterizados por diversas vías biológicas así como diferentes tipos de respuesta a la quimioterapia sistémica es fundamental para lograr la administración de un tratamiento personalizado en el CMTN. En conclusión, los datos presentados respecto a la subclasificación del CMTN demuestran que:

- A) Existen al menos de 3 a 6 subtipos de CMTN.
- B) Los subtipos transcripcionales son reproducibles.
- C) Los subtipos del CMTN muestran diferentes tasas de respuesta a la QT/NEO estándar.
- D) El CMTN con RA (+) tiene una mala respuesta a la QT/NEO estándar y potencialmente son sensibles a los inhibidores de PI3K.
- E) A medida que se aumente la cantidad de pacientes analizados en la muestra, así aumentará la cantidad de subtipos encontrados.

Basándonos en estos resultados, postulamos que es completamente inapropiado tratar de manera uniforme a todas las pacientes con CMTN.

b) Uso de Sales Platinadas en el cáncer de mama

Las sales platinadas incluyen Carboplatino y Cisplatino, estas ejercen su mecanismo de acción ocasionando rupturas de doble cadena del DNA, las cuales pueden ser especialmente importantes en células con deficiencia en el mecanismo de la RH tales como células con BRCA mutado y CMTN. Poniendo este concepto en la práctica clínica, Rocca y colaboradores¹⁰ realizaron un estudio retrospectivo en donde se analizaron biopsias trucut de pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en cisplatino y demostraron que la administración del Cisplatino sin Antraciclinas brindó una mayor tasa de RPC en pacientes con tumores p63 positivos.

Recientemente, evidencia sólida ha sido publicada respecto a la actividad del Platino en el CMTN, esta evidencia fue presentada en dos grandes estudios aleatorizados fase II en pacientes tratadas con QT/NEO: el

estudio GeparSixto,⁴⁸ en el subgrupo de pacientes con CMTN, se comparó el Paclitaxel neoadyuvante, Doxirubicina, y Bevacizumab con (159 pacientes) o sin (161 pacientes) Carboplatino. La tasa de RPC mejoró de 37.9% hasta 58.7% cuando se añadió Carboplatino. El segundo estudio es el CALGB40603 (NCT00861705) es un estudio aleatorizado fase II en el cual se valoró el añadir Carboplatino \pm Bevacizumab a un régimen neoadyuvancia con Paclitaxel semanal seguido de AC en dosis densas en 443 pacientes con CMTN etapas II/III.⁵⁰ La tasa de RPC aumentó de 41% hasta 54% cuando se adicionó el Carboplatino; el Bevacizumab no brindó ningún beneficio. Es importante saber que ninguno de los dos estudios previamente mencionados, valoró el impacto de la RPC obtenida en el Período Libre de Enfermedad (PLE) ni la Sobrevida Global (SG).

Podemos concluir que el añadir agentes platinados al régimen de QT/NEO, en pacientes con CMTN resulta en una tasa más elevada de RPC.⁴⁹ El Carboplatino ha demostrado su actividad en pacientes con CMTN y mutaciones germinales de *BRCA1/2*.

c) Respuesta patológica a quimioterapia neoadyuvante

Diversos estudios han examinado el fenotipo de cáncer de mama Triple negativo con respecto a la respuesta a quimioterapia neoadyuvante y su supervivencia, indicando que el índice de respuesta patológica completa es más alto en triple negativo que en subtipos con receptores positivos. Lo más importante es que también han demostrado que pacientes quienes alcanzan una respuesta patológica completa tuvieron mejor supervivencia con respecto a las pacientes con receptores positivos, pero pacientes con Cáncer de mama triple negativo con enfermedad residual después de quimioterapia neoadyuvante tuvieron resultados peores con supervivencia global más corta, así como menor supervivencia post recurrencia que pacientes con cáncer residual no triple negativo^{17,25}.

Sin embargo otros estudios han reportado diferencias en la respuesta patológica completa entre los subtipos de cáncer de mama después de quimioterapia primaria²⁵. *Rouzier et al*²⁷ reportó que la tasa de respuesta patológica completa (pCR) después de quimioterapia con antraciclinas y taxanos en pacientes con subtipos luminal fue de 6%, mientras que los pacientes tanto con el subtipo basal like y HER 2 (+) tuvieron un índice de respuesta patológica de 45 %. *Carey et al*²⁸ también reportó diferencias en la quimiosensibilidad de los subtipos de cáncer de mama cuando son clasificados por inmunohistoquímica, las tasas de pCR después del tratamiento con antraciclinas ya sea sola o en combinación con taxanos fueron 27, 36 y 7 % para TNBC, Her2 (+) y subtipos luminal respectivamente

En el presente estudio encontramos que el 52.8 % de las pacientes recibieron esquemas que incluían Cisplatino y 46.1 % recibieron esquemas con quimioterapia convencional a base de taxanos y antraciclinas obteniendo en un 42.3% una respuesta patológica completa vs 57.6 % una incompleta, sin correlacionar si el tipo de esquema de QTNEO se asocia a una mayor o menor respuesta patológica, se espera un análisis futuro sobre si existe o no una correlación.

Nuestro estudio tiene varias limitantes, la exclusión de pacientes debido a la ausencia de información completa en el expediente clínico, a su vez la escasas en ocasiones del tejido en laminillas de pacientes que fueron biopsiadas fuera del instituto y que no contaban con nueva biopsia dentro del instituto o que esta se encontraba extraviadas.

Es posible que la expresión génica asociada con la quimiosensibilidad y el pronóstico difiera entre los subtipos de cáncer de mama, *Terschendorff et al.*³¹ También informó que un alto nivel de expresión de genes representando una respuesta inmune se correlacionó con un mejor pronóstico en pacientes con cáncer de mama con RE negativos, de hecho en otro estudio²⁷ se demostró que los genes predictivos diferían entre los subtipos basal like y HER2 (+). Además *Desmedt et al.*²⁶ reveló que los módulos de expresión de genes asociados con resultados clínicos difieren entre tumores con RE negativos, HER 2(-) y HER(+), en el primero sólo en genes de respuesta inmune y en el segundo ambos genes tanto de invasión tumoral como de respuesta inmune.

La apoptosis definida como una muerte celular programada, es generalmente no acompañada de inflamación y liberación de citosinas, se cree que la apoptosis es independiente de ILT sin embargo *Lake et al.*³² demostró que la muerte celular tumoral inducida por la quimioterapia puede promover la respuesta de los linfocitos T citotóxicos que confieran una inmunidad antitumoral permanente sin embargo se requiere agregar otras metodologías para identificar el papel de la apoptosis desde otro ángulo.

d) Infiltrado linfocitario

En el microambiente tumoral el infiltrado linfocitario (ILT) son los principales actores en la respuesta contra las células cancerosas y pueden ser que constituyan marcadores indirectos de equilibrio inmune entre el huésped y el tumor. En el cáncer de mama, los resultados de los estudios que abordan el tema de infiltración celular inmune tumoral han demostrado de forma consistente que una alta infiltración linfocítica predice un mejor pronóstico y una mejor respuesta a la quimioterapia neoadyuvante²⁹. Aunque este beneficio puede estar restringido a algunos subtipos de tumor, del mismo modo existe una relación entre algunos subtipos de infiltrado linfocítico y una mejor supervivencia en cáncer de mama. Sin embargo existen resultados contradictorios, en relación al valor pronóstico o predictivo exacto del infiltrado celular inmune.

Se ha demostrado que un alto infiltrado tumoral de linfocitos al momento del diagnóstico es asociado con una elevada posibilidad de respuesta completa patológica después de quimioterapia neoadyuvante². El papel pronóstico de este infiltrado linfocitario tumoral basal (ILT) es asociado con un alto nivel proliferativo y grado alto en tumores con receptores estrógeno negativo, representando un fuerte factor pronóstico para ciertos subtipos de cáncer de mama, principalmente para triples negativos. Además sólo unos pocos estudios hasta ahora han evaluado el valor del ILT en la predicción de la sensibilidad a los tratamientos convencionales.

Aunque se han reportado resultados contradictorios estudios anteriores revelan una relación entre el alto infiltrado y un buen pronóstico. Sin embargo los subtipos de cáncer de mama no se tuvieron en cuenta en algunos de estos. *Kreike et al.*²⁹ demostró que una gran cantidad de infiltrado linfocitario fue un indicador significativo de un largo periodo libre de metástasis a distancia y de supervivencia en pacientes con triple negativo. En varios estudios, el cambio en el porcentaje de ILT en un cierto subconjunto de células T demostró que se correlaciona con una respuesta patológica completa a quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama.

En cuanto a nuestros resultados, se encontró que la ausencia de infiltrado linfocitario tumoral se correlaciona con mayor respuesta incompleta 15.3 % para infiltrado intratumoral y peritumoral y un 4.8 % para estromal. A diferencia en el otro grupo que sólo el 7.6 % tuvieron una respuesta completa con 0% de infiltrado tumoral

Estudios en adyuvancia en cáncer de mama triple negativo.

El infiltrado linfocítico ha sido evaluado en cerca de más de 1300 casos de cáncer de mama triple negativo, y más de 3 500 casos de cáncer de mama con receptores hormonales positivos al momento del diagnóstico. Este infiltrado fue encontrado positivo como un biomarcador pronóstico en 297 casos de cáncer de mama triple negativo, pero no en los subtipos luminal. Esta correlación fue reportada por primera vez usando muestras basales del estudio **BIG 2-98**³³ y posteriormente confirmado de forma independiente en 481 muestras de cáncer de mama triple negativo recolectadas prospectivamente durante dos estudios fase III aleatorizados en cáncer de mama con manejo adyuvante (**United States Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2197 y 1199**)³⁴. Por lo tanto en cáncer de mama triple negativo a mayor infiltrado linfocítico estromal que tiene un paciente al diagnóstico, es mejor el resultado después de quimioterapia adyuvante basada con antraciclinas. De acuerdo a Simon et al³⁶. Los resultados para el valor pronóstico del infiltrado linfocítico en cáncer de mama triple negativo podría considerarse nivel de evidencia I. Sin embargo, dada la falta de información sobre el pronóstico de paciente con triple negativo no tratadas con quimioterapia, el infiltrado linfocítico no debe utilizarse como un biomarcador para la respuesta a quimioterapia.

Estudios en neoadyuvancia

Hasta la fecha, cerca de más de 3000 biopsias de pacientes han sido evaluadas investigando la correlación entre marcadores inmunes y respuesta a quimioterapia neoadyuvante, incluyendo cohortes institucionales, sino también biomateriales a partir de ensayos clínicos. En resumen datos moleculares así como histológicos indican que los parámetros inmunológicos incluyendo el infiltrado linfocítico son asociados con elevados índices de respuesta patológica completa (pCR), independiente de otros factores pronósticos clinicopatológicos o regímenes de quimioterapia. Se ha informado una interacción entre el infiltrado linfocítico estromal y cierto beneficio al agregar carboplatino en el escenario de neoadyuvancia aunque el mecanismo biológico sigue siendo poco claro³⁷.

Actualmente en el escenario de neoadyuvancia la metodología para determinar del infiltrado linfocítico no se encuentra validada, tomando cuenta las recomendaciones del grupo internacional TILs 2014, en este trabajo se agruparon por porcentajes. Esto con la finalidad de hacer más relevante la información cuando se analizó como una variable continua, permitiendo más precisión en el análisis estadístico. Sin embargo en la práctica diaria muchos patólogos raramente reportan en porcentajes como 13.5%. Por lo tanto el infiltrado linfocítico debe evaluarse como un parámetro continuo. El porcentaje del infiltrado estromal para esta evaluación es un parámetro semicuantitativo, por ejemplo 60% de infiltrado estromal significa que el 60% del área estromal muestra un denso infiltrado mononuclear. Para la evaluación de los valores porcentuales, la disociación de los patrones de crecimiento de los linfocitos necesita ser tomada en cuenta, los linfocitos típicamente no forman agregados celulares sólidos, por lo tanto la anotación de "infiltrado linfocítico estromal del 60%" seguirá permitiendo algo de espacio vacío en los tejidos entre los linfocitos individuales ^{35,38}.

Continua sin estar claro si los TILs causan una susceptibilidad a la quimioterapia neoadyuvante, o si son un simple marcador de quimiosensibilidad. Se ha informado que TILs es un predictor de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama, este último reporta que la infiltración de CD3, linfocitos T CD83 y células dendríticas fueron correlacionados con la eficacia de la quimioterapia primaria evaluada como respuesta patológica completa (pCR).^{2,37} En un estudio se demostró que la expresión de los marcadores CD3D y CXCL9 relacionados con células T se asociaron significativamente con la respuesta patológica completa. Varios estudios sugieren posibles mecanismos de inmunidad tumoral en respuesta a la

quimioterapia². *Ladoire Et al*³⁰ encontró que la respuesta patológica completa a la quimioterapia neoadyuvante se asocia con un perfil inmunológico que combina la ausencia de la inmunosupresión por células T reguladoras (Foxp3) y la presencia de un alto número de linfocitos T CD8 y células citotóxicas. Estos informes sugieren subconjuntos de TILs como causantes de la susceptibilidad a la quimioterapia.

En este estudio se ha tratado de integrar información sobre la presencia o ausencia de infiltrado linfocitario tumoral en muestras de biopsias previas a tratamiento NEOadyuvante y su asociación a mejor respuesta patológica, no se logró demostrar que pudiera estar asociado a una mejor supervivencia ($p=0.953$) o período libre de enfermedad ($p=0.815$) sin significancia estadística sin embargo debido tamaño limitado de la muestra ($n=104$)

Cabe destacar que este análisis es preliminar en cuanto a resultados esperados a futuro, es decir esperamos poder correlacionar si existe o no una asociación entre respuesta patológica y presencia o ausencia del infiltrado en ciertos tipos de esquemas de QTNEO, esto en un análisis futuro.

Recomendaciones de la metodología en la evaluación del infiltrado linfocítico

Ninguna recomendación formal se ha hecho para un umbral de infiltrado clínicamente relevante. El consenso actual intenta validar una metodología más que enfocarse en cuestiones de umbrales para uso clínico, que se esperan sean determinadas una vez que una metodología sólida esté en su lugar. Hasta ahora el término cáncer de mama con predominio de linfocitos puede ser usado como un término descriptivo para tumores que contienen “más linfocitos que células tumorales”. Sin embargo los umbrales varían entre un 50-60% de linfocitos³⁵.

Varios estudios utilizan técnicas de inmunohistoquímica para evaluar la importancia clínica de subtipos de linfocitos CD45, CD 8, CD3 y varios otros marcadores expresados en células linfoides han sido aprobados mientras la inmunistoquímica puede mejorar la precisión en la actualidad ningún valor agregado de estos marcadores está claro. El consenso de trabajo TILs, no recomienda usar inmuistoquímica para detectar subpoblaciones específicas fuera del escenario de investigación, hasta que más evidencia esté disponible³².

En cuanto a un método para determinar un score resulta prometedor, no se han publicado grandes series con metodología consistentes, este enfoque representa una importante área para más estudios^{35,38}.

Los estudios iniciales han evaluado los infiltrados linfocíticos estromales e intratumorales separadamente, dado que ambos se localizan en la región definida como tejido tumoral, se debe enfatizar que ambas categorías representan verdaderos infiltrado linfocíticos. Además de que como infiltrado de linfocitos son capaces de moverse dentro del microambiente tumoral, la distinción por lo tanto puede ser algo artificial en relación con la situación estática en los cortes histológicos que son utilizados para la evaluación diagnóstica.³⁵⁻³⁸

En Nuestro estudio en este sentido contó con varias limitantes el extravío de muestras hizo que se redujera importantemente el número de pacientes, así como la escases de material para su análisis en algunas de ellas, a pesar de contar con la experiencia de patólogos experimentados en el análisis de estas muestras.

Sin embargo la evidencia reciente indica que el escenario de CMTN con manejo quimioterapia neoadyuvante y a pesar del razonamiento metodológico anterior, tanto el infiltrado linfocítico estromal como el intratumoral son predictivos de la respuesta patológica a la quimioterapia neoyuvante basada en platino. Además, el

análisis por inmunohistoquímica del infiltrado por linfocitos intratumorales CD3 o CD8 puede potencialmente convertirse tan fácil de detectar como el infiltrado estromal. Sin embargo la recomendación actual es evaluar el infiltrado linfocítico estromal como el parámetro principal en estudios futuros, permitiendo la evaluación sencilla de un solo parámetro³⁵⁻³⁸.

La metodología más utilizada es la evaluación global de los cortes en laminillas por un patólogo entrenado, con una media de la puntuación reportándose como porcentaje del infiltrado basado en la examinación de todo el tejido disponible para el análisis. En caso de que este sea cuestionable es necesario discutir el caso con un segundo patólogo. No se recomienda centrarse en los “puntos calientes”, definidos como pequeñas áreas con mayor concentración de TILs. Así mismo no hay evidencia actual que demuestre que los TILs en el borde tumoral invasor son funcionalmente diferentes a los TILs en el centro del tumor. Basado en esta ausencia de conocimiento, se sugiere en algunos estudios evaluar el porcentaje de TILs en el borde invasor como un parámetro independiente del localizado en el estroma vs intratumoral. de acuerdo a las recomendaciones no debe ser hecha una distinción y todo el infiltrado linfocítico dentro de los límites tumorales incluyendo el borde invasor debe ser evaluado junto como TILs estromal³⁵

Futuras direcciones

Uno de los objetivos en la evaluación visual de los cortes en laminillas teñidas con hematoxilina y eosina, utilizando un enfoque estandarizado para la medición del porcentaje del infiltrado linfocítico estromal e intratumoral, en muestras de cáncer de mama triple negativo localmente avanzado prequimioterapia neoadyuvante, fue proporcionar una plataforma para la evaluación estandarizada en futuros estudios, facilitando el uso del infiltrado linfocítico como un biomarcador en entornos de investigación y ensayos clínicos creando un lenguaje común que puede incentivar su determinación de forma habitual^{35,38}.

Mientras que podría argumentarse que los TILs son un factor pronóstico robusto en cáncer de mama triple negativo con manejo adyuvante basado en antraciclinas, tres estudios prospectivos publicados recientemente aportan nivel de evidencia clínica I para esta validación clínica, aún no se aboga por que las decisiones de tratamiento adyuvante se basen en el nivel de TILs en muestras basales de Cáncer de mama triple negativo ni en muestras de cáncer HER2(+) por que la validez analítica y utilidad clínica de TILs en estos subtipos de cáncer sigue siendo aún indeterminada con firmeza³⁵.

Todavía tenemos pendiente determinar si TILs será un factor predictivo de respuesta a regímenes inmunoterapéuticos, en particular la inhibición puntual de las células T, las cuales en última instancia quizás puedan tener utilidad clínica³⁴. En nuestro estudio a pesar de contar con más muertes en el grupo de ausencia de infiltrado (93 pacientes) esto no fue estadísticamente significativo ($p=0.953$),

Mientras el infiltrado linfocítico se ha medido morfológicamente y ha demostrado agregar información pronóstica predominantemente, siguen abiertas ciertas preguntas en cuanto a la evaluación metodológica más adecuada. La medición en laminillas teñidas con hematoxilina y eosina como fue realizado en este estudio representa el esfuerzo inicial para crear una plataforma base en su evaluación futura³⁵.

La enorme complejidad de los linfocitos tanto desde el punto de vista del tipo de célula y su activación sugiere que la caracterización molecular de este infiltrado puede añadir mayor sensibilidad y especificidad al valor predictivo definido morfológicamente. Por lo tanto se debe abrir este campo, hacia la introducción de métodos moleculares. Sin embargo en este momento estos métodos moleculares continúan en fase experimental y no hay evidencia suficiente para su introducción en la práctica estándar. Más cuestiones subyacen a la patología

del cáncer de mama asociado con niveles elevados de TILs al momento del diagnóstico, la relevancia de los subtipos de infiltrado linfocítico y que se puede hacer clínicamente para mejorar las respuestas inmunes del huésped no han sido abordadas en la actualidad³⁸.

En México como en Latinoamérica no se cuenta con ningún estudio similar que explore el papel del infiltrado linfocitario y su asociación a una respuesta patológica posterior a QT Neoadyuvante, considerando que en nuestra población el Cáncer de mama triple negativo se encuentra reportado en un 23,1 %, siendo una cifra superior a los reportado por otras series, es prioritario realizar más estudios que puedan mejorar el manejo en este subtipo de cáncer.^{6,7}

A medida que nuestra comprensión evoluciona y la evidencia clínica se acumula, se obtendrán mejores resultados que impacten en el manejo del cáncer de mama localmente avanzado especialmente triple negativo, una entidad heterogénea donde la respuesta inmune parece influir en la respuesta a la quimioterapia. Más estudios se requieren para determinar los mecanismos involucrados en el escenario de la quimiosensibilidad y la respuesta inmune.^{35,38}

CONCLUSIONES

Con base en el análisis de 104 biopsias de pacientes con CMTN y manejo con QTNEO adyuvante se logra correlacionar que a menor presencia de infiltrado linfocitario se presentó menor respuesta patológica completa, sin diferencia estadísticamente significativa entre sobrevida global ($p=0.953$), y período libre de enfermedad ($p=0.815$).

La presencia de 1-10% de infiltrado linfocitario fue el de manera global el de mayor frecuencia ante la presencia de este infiltrado se obtuvo 39.4% de respuesta patológica completa vs 58.6 % de forma incompleta, en el grupo de 11-30% 28.8 % presentó respuesta incompleta vs 25.9% respuesta completa, en el grupo de 31-60 % se tuvo 9.6 % con respuesta completa vs 10.5% con respuesta incompleta, y en el grupo de >61% sólo el 3.8 % presentaron una respuesta completa y estos exclusivamente mostraron presencia de infiltrado peritumoral más que intratumoral o estromal. En cuanto a respuesta incompleta se encontró que el 1.9 % tuvo presencia de infiltrado peritumoral más que intratumoral.

Esto probablemente pueda ser explicado por la cantidad limitada de pacientes ($n=104$) aún nos queda pendiente un análisis detallado de esta asociación. Sin embargo estos resultados preliminares son la plataforma para futuros abordajes comparativos entre la presencia del ILT y su asociación con una respuesta patológica. Se requieren de más estudios para determinar el papel de pronóstico y quizás predictivo del ILT en la respuesta en pacientes que reciben QTNEO en CMTN

Referencias Bibliográficas:

1. García Martínez E, Ginéz Luengo G, Chaves Benito A, González Billaalabeitia E, Vicente Conesa M, García García T, García-Garre E, Vicente V, Ayala de la Peña F. Tumor- infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014 16:488
2. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller B, Komor M, Budczies J, Et al. Tumor- Associated lymphocytes as an independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer *J. Clin Oncol* (2013) 28:105-113
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; **136**(5): E359-86.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015; **65**(1): 5-29.
5. Stevens KN, Vachon CM, Couch FJ. Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2013; **73**(7): 2025-30.
6. Lara-Medina F, Perez-Sanchez V, Saavedra-Perez D, Blake-Cerda M, Arce C, Motola-Kuba D, et al. Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity. *Cancer.* 2011; **117**(16): 3658-69.
7. Villarreal-Garza C, Weitzel JN, Llacuachqui M, Sifuentes E, Magallanes-Hoyos MC, Gallardo L, et al. The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations among young Mexican women with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015.
8. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet.* 2014; **384**(9938): 164-72.
9. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, Ficarra G, Mathieu MC, Delaloge S, Curigliano G, Andre F, Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple- negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann of Oncology* 2014; 25:611-618
10. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, Gallagher WM, Et al. Leukocyte Complexity Predicts Breast Cancer Survival and Functionally regulates Response to Chemotherapy. *Cancer Discov* 2011, 1: 54-67
11. Stagg J, Allard B, Immunotherapeutic approaches in triple negative breast cancer: latest research and clinical prospects. *Ther Adv Med Oncol* 2013, 5(3) 169-181
12. Yuan Y. Modelling the spatial heterogeneity and molecular correlates of lymphocytic infiltration in triple negative breast cancer. *J. R Soc Interface* 12: 2014 1153
13. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* 2012; **30**(15): 1796-804.

14. Rummel S, Varner E, Shriver CD, Ellsworth RE. Evaluation of BRCA1 mutations in an unselected patient population with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; **137**(1): 119-25.
15. Akashi-Tanaka S, Watanabe C, Takamaru T, Kuwayama T, Ikeda M, Ohyama H, et al. BRCAness Predicts Resistance to Taxane-Containing Regimens in Triple Negative Breast Cancer During Neoadjuvant Chemotherapy. *Clin Breast Cancer.* 2015; **15**(1): 80-5.
16. Elston C.W. Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19(5):403-410
17. Ono M, Shimizu C, Yamamoto H, Tsuda H, Shibata T. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple- negative breast cancer. *Breast Cancer Res treat* 2012, **132**:793-805
18. Dieci M. V, Mathieu M.C. Guarneri V, Conte P, Delaloge S, Andre F, Goubar A, Prognostic and predictive value of tumor infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Annals of oncol.* 2015 May 20
19. Liedtke C, Mazouni C, Hess K, André F, Et al. Response to Neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2008 **26**:1275-1281
20. Cannon GB, Pomerantz R. Cell-mediated immune responses- prognostic indicators of survival from breast cancer *Int J Cancer* 1989 Dec 15; **44**(6):995-9
21. Lee AH, Gillet Ce, Ryder K, Fentiman IS, Miles DW, Millis RR. Different patterns of inflammation and prognosis in invasive carcinoma of the breast. *Histopathology* 2006 May; **48**(6):692-701
22. Matzinger P. The danger model:a renewed sense of self. *Science* 2002 Apr 12; **296** (5566)301-5
23. 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 Nov;**130**(2):645-55
24. West NR, Kost SE, Martin SD, Et al. Tumour –infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer* 2013 Jan 15;**108**(1):155-62
25. West NR, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor- infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011; **13**(6):R126
26. Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buyse M, Larsimont D, Bontempi G, Delorenzi M, Piccart M, Sotiriou C. Biological process associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res* (2008) Aug 15;**14**(16):5158-65
27. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005 Aug15;**11**(16):5678-85

28. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 2007 Apr 15;13(8):2329-34
29. Kreike B, Van Kouwenhove M, Horling H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, Van de Vijver MJ. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2007;9(5)
30. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, Fumoleau P, Ghiringhelli F. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2008 Apr 15;14(8):2413-20
31. Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE, Ellis IO, Caldas C. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol* 2007;8(8)
32. Lake RA, Robinson BW. Immunotherapy and chemotherapy- a practical partnership. *Nat Rev Cancer* 2005 May; 5(5):397-405
33. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eeno F. Et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy:BIG 02-98. *J Clin Oncol* 2013 Mar 1;31(7):860-7
34. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN Et al. Prognostic value of tumor –infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol* 2014 Sep 20;32(27):2959-66
35. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F Et al. The evaluation of tumor- infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an international TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 2015 Feb;26(2):259-71
36. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst* 2009 Nov 4;101(21):1446-52
37. Horychova H, Melichar B, Tomsova M, Mergancova J, Urminska H, Ryska A. Tumor –infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer Invest* 2008 Dec, 26(10):1024-31
38. Ibrahim EM, AL-Foheidi ME, Al-Mansour MM, Kazkaz GA. The prognostic value of tumor- infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2014 Dec;148(3):467-76
39. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011; 121(7): 2750-67.

40. Kassam F, Enright K, Dent R, Dranitsaris G, Myers J, Flynn C, et al. Survival outcomes for patients with metastatic triple-negative breast cancer: implications for clinical practice and trial design. *Clin Breast Cancer*. 2009; **9**(1): 29-33.
41. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2013; **19**(19): 5533-40
42. Jones RL, Salter J, A'Hern R, Nerurkar A, Parton M, Reis-Filho JS, et al. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; **116**(1): 53-68.
43. Guarneri V, Piacentini F, Ficarra G, Frassoldati A, D'Amico R, Giovannelli S, et al. A prognostic model based on nodal status and Ki-67 predicts the risk of recurrence and death in breast cancer patients with residual disease after preoperative chemotherapy. *Ann Oncol*. 2009; **20**(7): 1193-8.
44. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012; **30**(15): 1796-804.
45. 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.
46. Jezequel P, Loussouarn D, Guerin-Charbonnel C, Campion L, Vanier A, Gouraud W, et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res*. 2015; **17**: 43.
47. Rocca A, Viale G, Gelber RD, Bottiglieri L, Gelber S, Pruneri G, et al. Pathologic complete remission rate after cisplatin-based primary chemotherapy in breast cancer: correlation with p63 expression. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008; **61**(6): 965-71.
48. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2014; **15**(7): 747-56.
49. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, 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**(1): 13-21.
50. Yamaguchi R, Tanaka M, Yano A, Tsee GM, Yamaguchi M. Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Hum Pathol* 2012 Oct; **43**(10):1688-94