



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL Y ALTERACIONES GENÓMICAS COMO
REGULADORES DEL COMPORTAMIENTO TUMORAL DEL SUBTIPO
INMUNOMODULADOR EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
RUBÉN RODRÍGUEZ BAUTISTA

DIRECTOR DE TESIS
DR. OSCAR GERARDO ARRIETA RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

COMITÉ TUTOR
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA,
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMOCA, FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, CDMX. JUNIO 2022



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.

Agradecimientos

Esta tesis va dedicada a mis padres Miguel Ángel Rodríguez Aguilar y Norma Alicia Bautista Martínez por su apoyo incondicional en mi carrera y quienes fueron mi impulso en este intrincado trayecto, mi padre quien desde arriba sigue observando mi hazaña, a mi madre quien me sigue impulsando y le da significado a mis acciones. A LA. por estar a mi lado y forjar en mi el sentido de la ciencia, hecha con honestidad y valores hasta poner el alma en esto que nos une, pero sobretodo levantarnos con dignidad de las caídas. A mis siete hermanos por ser la mejor compañía y apoyo durante estas tres décadas. Al doctorado, a la vida por ponerme en el camino de personas que siguen forjando mi aprendizaje.

Este trabajo fue asesorado por el Dr. Oscar G. Arrieta Rodriguez a quien quiero agradecer por su disponibilidad para el desarrollo del mismo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento de este trabajo a través de la beca de doctorado (CVU 707316). Agradezco a todos los integrantes del Laboratorio de medicina personalizada en oncología del Instituto Nacional de Cancerología por toda la retroalimentación que recibí durante el desarrollo de este trabajo. A los integrantes del laboratorio del Dr. Reyes Terán, al equipo de la Dra. Claudia Rangel y al jurado revisor y evaluador de mi tesis.

Lista de abreviaturas

CM: cáncer de mama

CMTN: cáncer de mama triple negativo

IM: inmunomodulador

No-IM: no inmunomodulador

TILs: linfocitos infiltrantes tumorales

intT: Intratumoral

strml: Etromal

Tregs: células T reguladoras

FOXP3: proteína forkhead box P3 (siglas en inglés)

pCI: Puntos de control inmunológicos

NSG: Secuenciación de nueva generación (siglas en inglés)

lncRNA: ARN largo no-codificante (siglas en inglés)

lincRNA: ARN largo no-codificante intergénico (siglas en inglés)

CTLA-4: antígeno 4 del linfocito T citotóxico (siglas en inglés)

IHQ: inmunohistoquímica

RpC: respuesta patológica completa

QTx: quimioterapia

FFPE: muestras tumorales incluidas en parafina fijadas con formalina

Resumen

Introducción: El cáncer de mama triple negativo (CMTN) representa el tipo histopatológico de mayor malignidad en el cáncer de mama el cual se diferencia de otros subtipos histopatológicos en términos histopatológicos y moleculares como mutaciones puntuales en los genes BRCA1, BRCA2, PALB2, BRIP1, BARD1, RAD51C y TP53 adicionalmente a ellos, se considera una neoplasia heterogénea, tanto a nivel transcriptómico, como morfológico, con siete subtipos diferentes descritos en base a patrones de expresión génica. Este estudio presenta detalles del subtipo inmunomodulador (IM) de CMTN, describiendo su biología tumoral y comportamiento clínico.

Métodos: Se analizaron sesenta y ocho muestras tumorales incluidas en parafina fijadas con formaldehído (FFPE) de pacientes con CMTN en estadio clínico III y IV de alto riesgo, mediante microarreglos de expresión (transcriptómica), inmunohistoquímica (IHQ) y secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés).

Resultados: El subtipo IM se identificó en el 24% de las muestras de tumores CMTN, caracterizado por mayor infiltración intratumoral (*intT*) y estromal (*strml*) de células infiltrantes FOXP3+ TIL (Treg) en comparación de otros subtipos no-IM. Además, identificamos que la expresión del marcador PD-L1 + (> 1%) fue significativamente mayor, así como los niveles de CTLA-4+ *intT* y *strml* en el subtipo IM, evaluados por IHQ. La expresión diferencial y el análisis de enriquecimiento de agrupamiento de genes diferencialmente expresados identificaron procesos biológicos asociados con la respuesta inmune antitumoral. El análisis de vías de señalización mostró un enriquecimiento de la vía de señalización de β -catenina. Mientras que nuestro análisis transcriptómico de secuencias no codificantes mostró siete lincRNA [6 regulados al alza (\uparrow) y 1 regulado a la baja (\downarrow)] que se asociaron con el subtipo CMTN-IM (LINC00173 \uparrow , LINC00854 \uparrow , LINC00869 \uparrow , LINC00426 \uparrow , LINC00861 \uparrow , LINC01550 \uparrow , LINC00312 \downarrow). Finalmente, nuestro análisis por NGS destacó dos genes relevantes para las respuestas del sistema inmunológico: CTNNA1 (Catenina β -1), un componente clave de la vía de señalización Wnt canónica, e IDH1, que forma parte de la respuesta inmune innata.

Conclusión: El subtipo IM se caracteriza por niveles elevados de infiltración de células Tregs y mayor expresión de los marcadores CTLA-4+ y PD-L1+, así como alteraciones genómicas como siete lincRNAs regulados diferencialmente y mutaciones puntuales en el subtipo IM. De esta manera este estudio presenta hallazgos novedosos con respecto a la caracterización del subtipo histopatológico de cáncer de mama CMTN-IM a nivel molecular y transcriptómico como primer paso hacia la terapia de tipo inmunomoduladora en pacientes.

Contenido

1. Introducción	07
1.1 Características clínico-biológicas de cáncer de mama triple negativo.....	07
1.1.1 Complejidades biológicas con el manejo de CMTN.....	08
1.2 Sistema inmunológico tumoral en general.....	09
1.2.1 Ambiente inmunológico en CMTN.....	10
1.2.2 Expresión de puntos de control inmunológicos en CMTN.....	11
1.3 Inmunoterapia en CMTN.....	12
1.4 Estrategia de selección de pacientes para inmunoterapia	13
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo general	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. Materiales y métodos	15
3.1 Selección de muestras.....	15
3.2 Recopilación de datos clínico-patológicos.....	15
3.3 Extracción de ácidos nucleicos.....	16
3.4 Procesamiento de microarrays y análisis de datos.....	16
3.4.1 Clasificación de los pacientes con TNBC en subtipos IM y no IM.....	18
3.5 Inmunohistoquímica de secciones tumorales.....	19
3.6 Secuenciación de siguiente generación.....	20
3.7 Analisis Estadístico.....	21
4. Resultados	22
4.1 Características clínico-patológicas de los pacientes con CMTN	22

4.2 Manejo del tratamiento de pacientes con CMTN.....	22
4.3 Clasificación de los pacientes con CMTN en subtipos IM y no IM.....	24
4.4 Subpoblaciones de TILs en el subtipo IM de CMTN.....	25
4.5 Expresión de PD-1, PD-L1 y CTL-4 en el subtipo de IM de CMTN.....	27
4.6 Expresión diferencial de ARN codificantes y largos no codificantes entre los subtipos IM y no-IM en CMTN.....	29
4.7 LncRNA asociados con el subtipo de IM de CMTN.....	31
4.8 Comparación de la frecuencia de mutación entre subtipos IM y no IM.....	33
4.9 Variables y respuesta clínicas observada en los subtipos IM y no-IM en CMTN.....	35
5. Discusión	39
5.1 Limitaciones del trabajo.....	44
6. Conclusiones.....	44
7. Bibliografía	47

1. Introducción

“No hay que temer a nada en la vida, sólo tratar de comprender”

Marie Curie.

1.1 Características clinico-biológicas de cáncer de mama triple negativo

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) se caracteriza por la ausencia de expresión de los receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), combinada con la falta de sobreexpresión o amplificación del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (1–3). Por ende, dada la insensibilidad a la terapia endocrina y los anticuerpos anti-HER2, el tratamiento convencional para la enfermedad temprana y localmente avanzada incluye esquemas de quimioterapia (QTx) que solo contienen antraciclinas y taxanos (4,5). Sin embargo, aunque los pacientes inicialmente responden favorablemente a estos tratamientos, solo el 30% logra una respuesta patológica completa (RpC) (6,7). Además, el CMTN tiene una alta probabilidad de recaída y tasas de supervivencia global (SG) cortas, con una mortalidad a los cinco años que alcanza el 40% (8,9) en gran medida por la alta probabilidad a desarrollar metástasis a distancia en los primeros 3-5 años después del diagnóstico (10).

Aunque los tumores CMTN son inmunohistoquímicamente simples, son intrínsecamente heterogéneos. De tal manera, los tumores de CMTN exhiben diversas morfologías, expresión génica y diferentes vías de señalización activas (11). Molecularmente el CMTN se caracteriza por tener una tasa de mutación general de 14.6%, con un 8.5% con mutaciones en BRCA1, un 2.7% en BRCA2 y un 3.7% adicional con mutaciones en otros genes como PALB2 (1.2%), BRIP1, BARD1 y RAD51C entre otros (12). También se documenta una alta frecuencia mutacional de p53, un alto índice de proliferación y expresión de genes de tipo basal, de esta forma, es el tumor más heterogéneo en CM (13,14). Adicionalmente los

modelos matemáticos sugieren una tasa mutacional de aproximadamente 13 veces mayor en CMTN comparado con células normales de tejido mamario. Sumada la deficiencia de mecanismos de recombinación homóloga (RH) que también se ha asociado a los casos de cáncer de mama esporádico en CMTN en un 50%, y los mecanismos sugeridos incluyen metilación del promotor BRCA1, mutación en genes relacionados con RH, incluidas mutaciones somáticas en BRCA1 y BRCA2, entre otros mecanismos epigenéticos (15).

1.1.1 Complejidades biológicas con el manejo de CMTN

Evidencias actuales sugieren que la diversidad intratumoral de CMTN no solo es un factor patogénico, sino también de resistencia al tratamiento, metástasis y mal pronóstico (16). Diversos estudios muestran que una subpoblación menor de células CMTN es responsable de la diseminación metastásica y que la evolución clonal dentro del tumor primario es un detonante de este proceso, así como de las metástasis multisitio donde la implantación multiclonal de clones individuales son identificados en el tumor primario (17). Este proceso ha sido atribuido a un proceso de evolución puntuada de las variaciones del número de copias durante la progresión tumoral, seguida de la expansión de un subclon dominante (18). Por otro lado, más allá de las complejidades inherentes del tumor, los pacientes con CMTN a menudo se presentan con compromiso visceral y típicamente muestran una progresión rápida y, por ende, una limitada ventana de tratamiento (19). Sin embargo, en un esfuerzo por descubrir dianas terapéuticas y con el subsecuente desarrollo de fármacos, los tumores de CMTN se han estratificado en subtipos moleculares basado en perfiles transcriptómicos. De tal manera Lehmann ha documentado subtipos moleculares distintos dentro de CMTN, que incluye dos de tipo basal (BL1/2), uno inmunomodulador (IM), uno mesenquimatoso (M), uno de tipo de células madre mesenquimatosas (MES) y un receptor de andrógenos luminal (LAR) como se describe en la **figura 1**. Con el propósito de trasladar este conocimiento para identificar estrategias de tratamiento personalizadas, debido a que cada subtipo ha mostrado un valor predictivo y pronóstico propio (20). Sin embargo en este estudio recalcamos la importancia del estudio a detalle del subtipo IM, el cual se caracteriza por mostrar una respuesta inmunitaria a la alza por el incremento en el infiltrado de células inmunitarias como linfocitos y células presentadoras de antígenos, factores de transcripción

de regulación inmunitaria y desregulación de las vías de señalización inmunitarias (20,21). Y de este conocimiento se deriva una posible implicación de este subtipo para personalizar su terapia mediante la modulación de su medio inmunológico (22,23).

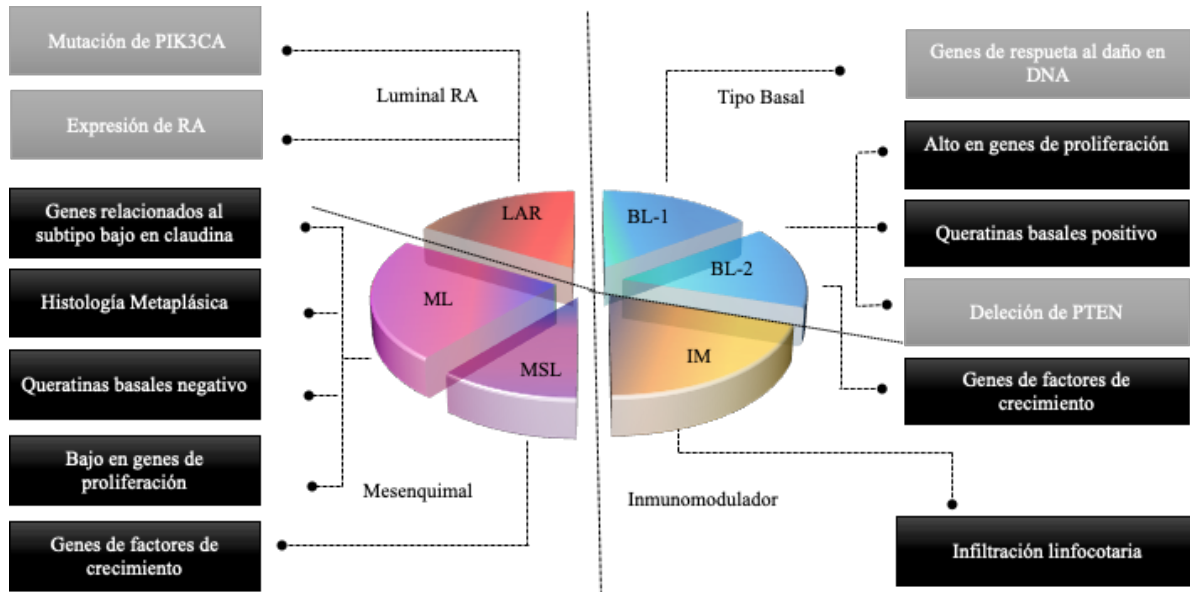


Fig. 1. Heterogeneidad de cáncer de mama triple negativo, muestra los 6 subtipos principales de CMTN estratificados por perfiles transcriptómicos a través del algoritmo desarrollado por Lehmann y cols. 2011, con sus distitivas moleculares. Adicionalmente existe un grupo de pacientes que no puede ser estratificado bajo este algoritmo (no se muestra en la figura). La gráfica de pastel muestra las proporciones aproximadas en las que puede identificarse cada subgrupo bajo el mismo algoritmo. Tipo basal (BL1/2), inmunomodulador (IM), mesenquimatoso (M), Tipo de células madre mesenquimatosas (MES), Receptor de andrógenos luminal (LAR), receptor de androgeno (RA)

1.2 Sistema inmunológico tumoral en general

El sistema inmunológico no solo juega un papel en la iniciación y progresión del tumor, sino que también participa en el reconocimiento y destrucción de las células cancerosas. La respuesta inmune antitumoral frena el desarrollo/progresión a través de respuestas dirigidas contra el tumor que involucran a los linfocitos T citotóxicos (Th1) (24,25). Sin embargo esta respuesta antitumoral citotóxica puede ser evadida por el tumor a través de diversos mecanismos, lo cual es un sello distintivo del tipo de cáncer y puede implicar la activación crónica de la inmunidad humoral (linfocitos B), infiltración por células T (TILs) cooperadores (Th2), células inflamatorias innatas polarizadas protumorales, regulación a la

baja de antígenos específicos del tumor, expresión de puntos de control inmunitarios (pCI) por parte de los tumores, y la ausencia de complejos principales de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células tumorales (24–26). Otros mecanismos incluyen, elaboración de citocinas inmunosupresoras, reclutamiento de células inmunosupresoras e inmunoedición, este último entendido como el proceso mediante el cual los tumores evolucionan o se seleccionan para escapar de la inmunidad antitumoral del huésped (27–29). Sin embargo, el hecho de que los TILs no destruyan las células tumorales adyacentes ofrece tanto un desafío como una vía potencial para la intervención terapéutica. Los TILs son principalmente células T que expresan puntos de control inmunológicos (pCI) como PD-1 y CTLA-4, lo cual implica una exposición crónica al antígeno seguido de una pérdida progresiva de las funciones de las células T, receptores inhibidores elevados y producción alterada de citocinas lo que resulta en la incapacidad de dirigirse a las células tumorales incluso en proximidad (30–32). Este fenotipo de células T "exhaustas" podría reflejar la etapa final de la inmunoedición. Se cree que la inmunoedición comienza temprano en el desarrollo del cáncer a medida que los subclones tumorales altamente inmunogénicos se eliminan o adoptan un perfil menos inmunogénico en respuesta a las células T antitumorales (32).

1.2.1 Ambiente inmunológico en CMTN

En CM, varios estudios en la última década han demostrado que los TILs se asocian a respuesta patológica completa (RpC), respuesta a QTx neoadyuvante y baja probabilidad de progresión (27–29,33,34). Los linfocitos pueden intercalarse entre las células tumorales (*intT*-TILs) o infiltrarse en el tejido estromal circundante (*stroml*-TILs). Sin embargo solo la evaluación de *stroml*-TILs ha sido altamente reproducible y de mayor valor pronóstico/predictivo (31). No obstante en CM, solo un subconjunto de tumores ha mostrado una cantidad significativa de *stroml*-TILs, con una mediana de porcentaje de infiltrado de 10% para RE +/HER2 -, 15% para HER2 + y 20% para CMTN. Aunado a lo anterior, la presencia de TILs también sirve como marcador predictivo de la respuesta a la inmunoterapia, por lo que en CMTN es de particular importancia la caracterización en el microambiente tumoral (35). Tan solo pequeños incrementos en TILs están asociados a una supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG) más larga en CMTN (36). Existen diferentes

mecanismos que regulan la infiltración de TILs, entre los que se han descrito en la literatura: la influencia de los macrófagos asociados a tumores (37). Así como también la activación de la vía de señalización de Ras/MAPK que puede suprimir la expresión de MHC-I y MHC-II, tanto intrínsecamente como las inducidas por IFN γ , el cual está encargado de regular la presentación de antígenos tumorales (38,39). Por otro lado, datos recientes han demostrado que la QTx per se también regula positivamente el sistema inmunológico tumoral activando la respuesta de TILs-CD8⁺ (Th1), a través de un mecanismo aún desconocido. Así mismo, los tumores con TILs más altos responden mejor a QTx, lo que influye positivamente en la supervivencia de los pacientes con cáncer (40–44). De la misma manera, los CD4-TIL (Th2) más altos se han asociado con resultados más favorables, al contrario de la relación CD4/CD8 donde una relación más alta se traduce en un peor pronóstico. (44,45). Aunado a lo anterior, la expresión de CD45RO en linfocitos está asociado al riesgo de metastásis en CMTN. De esta manera en CMTN no ha sido posible una evaluación meticulosa de las subpoblaciones de células inmunes que predominan en el microambiente del subtipo TNBC-IM, lo cual permitiría direccionar la inmunoterapia en este subtipo y de esta manera mejorar las tasas de respuesta a este tratamiento.

1.2.2 Expresión de puntos de control inmunológicos en CMTN

Los pCI actualente constituyen biomarcadores no solo pronósticos sino predictivos. La evidencia sugiere un 20-50% de expresión de PD-L1 en células tumorales y TILs, y la expresión de PD-1 particularmente a CD8 y CD4-TILs entre otras subpoblaciones de células inmunitarias (34,46,47). Se ha documentado que en CMTN una subpoblación de T-CD8 de memoria residente (CD8⁺ T_{RM}) asociado a una mejor supervivencia en etapa temprana y como reguladores de inmunovigilancia y posibles blanco de tratamientos como pCI (48). De igual forma una alta infiltración de *strml*-TILs CD3⁺, CD8⁺ y CD20⁺ fue asociada a un buen curso clínico en pacientes con CMTN (49), y un bajo infiltrado se asoció a un bajo RpC (50). Un estudio reciente muestra a un subgrupo de CMTN donde la estrategia terapéutica de inhibidores de pCI pudiera resultar benéfica, el cual se caracteriza por presentar baja infiltración de TILs pero alta expresión de PD-L1 debido a que es un subgrupo de alto riesgo y pobre curso clínico (51). Del mismo modo, el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-

4) expresado en linfocitos T tuvo un papel funcional crítico en los TIL que modulan la respuesta inmune en CMTN (52). De esta forma, cada pCI modula las respuestas inmunitarias específicas de antígeno de forma particular, que depende del tipo de tumor en estudio (53). Un estudio reciente basado en un análisis de ARNm del The Cancer Genome Atlas, indicó que el subtipo IM podría ser un candidato potencial para el empleo de inmunoterapia debido a la alta expresión de pCI (54). De esta manera uno de los objetivos del estudio es conocer la expresión de pCI en CMTN-IM mediante estudios de IHQ que muestren su grado y localización.ç

1.3 Inmunoterapia en CMTN

La inmunoterapia ha mejorado considerablemente el pronóstico de algunas neoplasias sólidas (55). Es de notar la respuesta que se ha conseguido en melanoma, debido a sus características intrínsecas como una alta carga mutacional o su alto grado de infiltración celular inmune en el microambiente tumoral (“T cell inflamed” or “hot tumor”, como se describe en inglés) caracterizado por alta infiltración de CD8, células B, macrófagos, células FOXP3 e IFN (interferón) tipo I y II (56,57). Sin embargo, en CMTN todavía se requiere una comprensión de cómo el sistema inmunológico regula el comportamiento biológico tumoral; esto hace que, a mejor comprensión del microambiente inmunológico-tumoral, mejores beneficios de dicha terapia (58). Los principales componentes regulados por la inmunoterapia son las células inmunitarias que rodean el tumor; los más estudiados son los TILs descritos previamente, que están estrechamente relacionados con el pronóstico y la respuesta al tratamiento estándar en algunas neoplasias (59). CMTN es el subtipo que ha mostrado una intensa infiltración de TIL, mejorando la respuesta a la quimioterapia (QTx) estándar y prolongando la supervivencia global (60–64). Recientemente, se han evaluado agentes anti-PD1/PD-L1 (ligando 1 de muerte programada) en CM, especialmente en el subtipo CMTN; donde, se han observado resultados positivos ya sea como monoterapia o en combinación con tratamientos convencionales.

Debido a los resultados en ensayos clínicos aleatorizados fase 3, atezolizumab y pembrolizumab más CTx se han incorporado como el tratamiento de primera línea preferido

en los CMTN positivos para PD-L1 avanzados, mejorando así su pronóstico (65,66). Además, la inmunoterapia combinada con QTx ha aumentado la respuesta patológica completa (pCR) como tratamiento neoadyuvante en la etapa inicial de la enfermedad (67,68).

1.4 Estrategia de selección de pacientes para inmunoterapia

La selección de pacientes que puedan beneficiarse para determinada terapia sigue siendo un desafío. Tal es el caso en CMTN, donde es preciso definir el subconjunto de pacientes que se beneficiarán de los inhibidores de puntos de control inmunitarios (IpCI). De esta forma, el uso de biomarcadores, documentado en otros tumores, podría mejorar las respuestas observadas en los últimos ensayos clínicos de CMTN con inmunoterapia; por lo que, anteriormente hemos sugerido algunos biomarcadores que podrían funcionar en este sentido (69,70). El uso de valores de TILs ha sido propuesto como biomarcador para el uso de inmunoterapia, sin embargo, los valores de corte numéricos utilizados en múltiples estudios varían, lo que sugiere una falta de consenso, lo que contribuye a la falta de incorporación de una puntuación de TILs en la evaluación patológica de rutina en CMTN (71,72). Se han propuesto adicionalmente estrategias moleculares para la selección de pacientes en inmunoterapia como la vía de Ras/MAPK que se encarga de la supresión de la expresión de MHC-I y MHC-II a través de IFN γ , de esta manera el bloqueo de MEK y PD-L1 podría mejorar la respuesta a la inmunoterapia (38,39)

De esta manera, este estudio se centró en caracterizar la biología tumoral y el comportamiento clínico del subtipo IM en pacientes que fueron atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de la Ciudad de México. Dependiendo de la disponibilidad de muestras tumorales de pacientes diagnosticadas con CMTN se determinaron los niveles de los principales TILs; incluyendo CD4+ (Th2), CD8+ (Th1) y FOXP3+ (Treg). Se evaluaron sincrónicamente los niveles de pCI principales (PD-L1, PD -1 y CTLA-4) que se utilizan actualmente para diagnosticar y tratar neoplasias sólidas mediante IHQ. Además, estudiamos la asociación de algunos biomarcadores por NGS que pudieran ayudar en un futuro a identificar con precisión al subtipo IM.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el microambiente tumoral y las alteraciones genómicas reguladoras del compartamiento tumoral del subtipo inmunomodulador (IM) en pacientes con cáncer de mama triple negativo

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Caracterizar el tipo de infiltrado linfocitario tumoral de las siguientes poblaciones de linfocitos del subtipo IM en CMTN

- CD4
- CD8
- FOXP3

2.2.2 Determinar los niveles de expresión de los siguientes puntos de control inmunológico del subtipo IM en CMTN

- PD1
- PDL-1
- CTLA-4

2.2.3 Analizar los lncRNAs que se expresan diferencialmente en el subgrupo IM de CMTN

2.2.4 Evaluar mutaciones puntuales asociadas al subtipo IM de CMTN

2.2.5 Caracterizar clínica y patológicamente al subtipo IM de CMTN

3. Materiales y métodos

3.1 Selección de muestras

El comité de revisión institucional del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de México aprobó el siguiente estudio. Para el estudio fueron incluidas muestras de tejido embebidas en parafina fijadas con formalina (FFPE, por sus siglas en inglés) de 68 pacientes con CMTN tratados en el Departamento de CM del mismo instituto, que se archivaron entre 2007 y 2010. Todas las muestras fueron confirmadas de diagnóstico de CMTN. El CMTN se definió como RE-negativo, RP-negativo y HER-2 negativo por inmunohistoquímica, evaluado de acuerdo con las guías de ASCO/CAP de 2018 utilizando un ensayo aprobado por la FDA. El subtipo histológico y el grado se determinaron de acuerdo con la clasificación de la organización mundial de la salud (OMS) y el sistema de clasificación histológico de Nottingham, respectivamente. El consentimiento informado se obtuvo de todos los pacientes. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki. Los pacientes fueron excluidos si la información clínico-patológica o el material/muestra no estaban disponibles o estaban incompletos. Antes de la inclusión, los patólogos de mama revisaron los portaobjetos teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) de las muestras de tumores para evaluar el porcentaje de células tumorales y áreas necróticas. Fueron descartadas las muestras que por inspección estaban presentes menos del 60% de células tumorales ó >40% de área necrótica, y en aquellas muestras seleccionadas para el estudios, las regiones de interés se marcaron con un círculo en los portaobjetos teñidos con H&E. De esta manera, las áreas correspondientes de las secciones de tejido de FFPE sin teñir se macro diseccionaron manualmente para el enriquecimiento del tumor (Se incluye un consorte para la selección de muestras de pacientes para cada análisis en **figura 1**).

3.2 Recopilación de datos clínico-patológicos

Revisamos la base de datos del expediente electrónico Inc@net del INCan para identificar pacientes con TNBC; Los datos de interés clínico se extrajeron de las historias clínicas

electrónicas para generar una base de datos. Se recopilieron datos demográficos como edad, estadio, estado hormonal, tipo de mastectomía, fecha de diagnóstico, fecha de recaída, sitios de recurrencia y fecha de muerte (si corresponde). También se recogieron las características del tumor, que incluyen histología, grado nuclear, pCR, antígeno carcinoembrionario (CEA), Ki67 y CA15-3. También se registraron las variables de tratamiento, incluido el tratamiento sistémico neo o adyuvante, la radioterapia y el tipo de quimioterapia. Los cursos clínicos clínicos, incluida la supervivencia global (SG), se definió como la fecha del diagnóstico hasta la muerte; La supervivencia libre de progresión (SLP) se definió como la fecha de tratamiento hasta la primera evidencia de progresión del tumor o muerte por cualquier causa.

3.3 Extracción de ácidos nucleicos

El ARN y el ADN totales se aislaron de las muestras de tejido FFPE usando el kit AllPrep ADN/ARN FFPE de Qiagen. Brevemente, las secciones de parafina se colocaron en tubos de microcentrífuga estériles de 1.5 ml, se desparafinaron con xileno al 100% y se lavaron dos veces con etanol al 100%. El tejido desparafinado se digirió con proteinasa K a 56 ° C durante 15 min y luego se incubó a 80 ° C durante otros 15 min para revertir parcialmente la reticulación de los ácidos nucleicos. Para la purificación del ARN, las muestras se trataron con DNasa y eluyeron en 30 µl de agua libre de RNasa, y para la purificación del ADN, las muestras se trataron con RNasa y se eluyeron en 30 µl de tampón ATE. La concentración de ADN/ARN total se determinó espectrofotométricamente usando absorbancia total a 260 nM, y la pureza se cuantificó usando la relación A260/A280. En este estudio se incluyeron muestras de ARN con relaciones A260/A280 de 1,9±0,2.

3.4 Procesamiento de microarrays y análisis de datos

Los perfiles transcripcionales se analizaron usando el Affymetrix GeneChip™ Human Gene 2.0 ST Array, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, ~ 200 ng de ARN total se convirtieron en ADN complementario (c) y se marcaron con el kit SensationPlus™ FFPE Amplification and WT Labeling® (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.) Y se hibridaron

en la matriz, que detecta tanto ARNm como lncRNA. Las matrices se lavaron, tiñeron y escanearon usando un GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix). Los datos crudos se

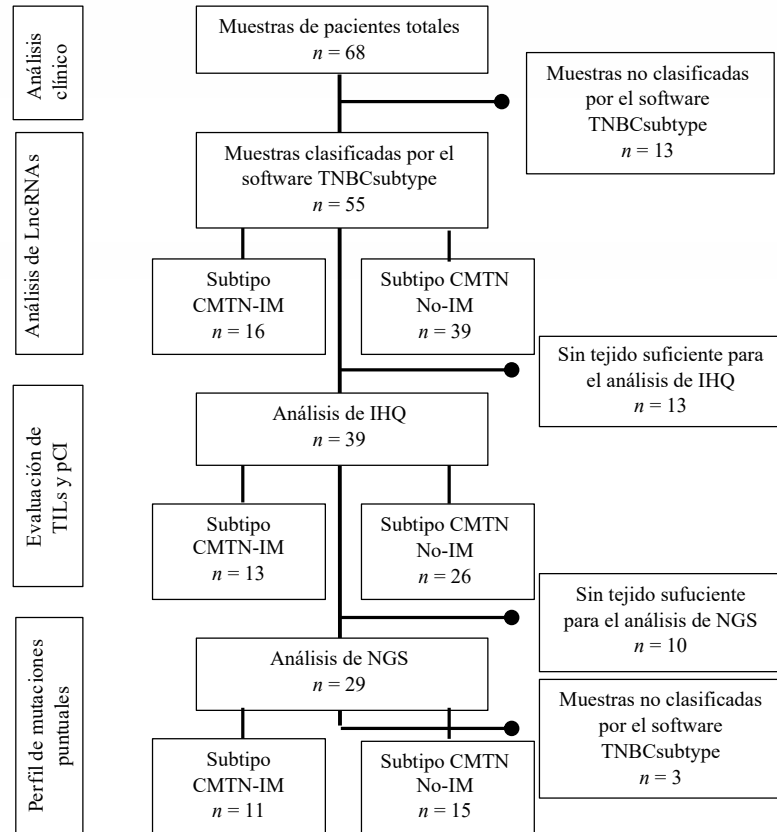


Figura 1. Digrama de trabajo para en análisis de pacientes con CMTN

corrigieron del ruido de fondo, utilizando el promedio robusto de múltiples matrices (73) y se normalizaron con el método de normalización de cuantiles. La expresión diferencial se determinó utilizando modelos estadísticos lineales con coeficientes arbitrarios, y se analizó un contraste de interés utilizando la biblioteca de bioconductores limma (74). La corrección de múltiples hipótesis se aplicó utilizando la tasa de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés) (75). Los genes se seleccionaron basándose en un valor absoluto para el cambio de veces $|FC| > 2$ y un valor de $p < 0,0002$. Los datos sin procesar y normalizados están disponibles en el repositorio de genes de expresión omnibus (GEO) con el número de acceso GSE176128. Los datos de expresión génica se utilizaron para clasificar las muestras

de acuerdo con el algoritmo de tipo TNBC y para analizar la expresión diferencial. El análisis de enriquecimiento del conjunto de genes se realizó utilizando MetaCore Clarivate™ (El número de muestras de pacientes para este análisis se especifica en la **figura 1**)

3.4.1 Clasificación de los pacientes con TNBC en subtipos IM y no-IM

Se utilizó el algoritmo de TNBCsubtype, disponible en la web (<http://cbc.mc.vanderbilt.edu/tNBC/>) para identificar los subtipos de CMTN a través de la expresión de ARNm. Basado en centroides previamente identificados, el método establece seis firmas diferentes para subtipos dentro de CMTN: dos de tipo basal (BL1 y BL2), inmunomodulador (IM), mesenquimatoso (M), tipo mesenquimal de células madre (MSL) y receptor de andrógenos luminal (LAR). Las 68 muestras se incluyeron en el algoritmo, el cual clasificó 55 muestras en alguno de los subtipos antes mencionados; Se etiquetaron 11 muestras como no clasificadas. De este subconjunto de 55 muestras se agruparon en el subtipo IM (n = 16) y el subtipo no-IM (n = 39) que se utilizaron subsecuentemente para los análisis de expresión diferencial en regiones codificantes y no codificantes transcriptómicos como se muestra en la figura 1. Dentro del grupo no-IM, la clasificación de la muestra incluyó los subtipos BL1 y BL2 (n = 20), M (n = 12), MSL (n = 1) y LAR (n = 6) [**Figura 2**].

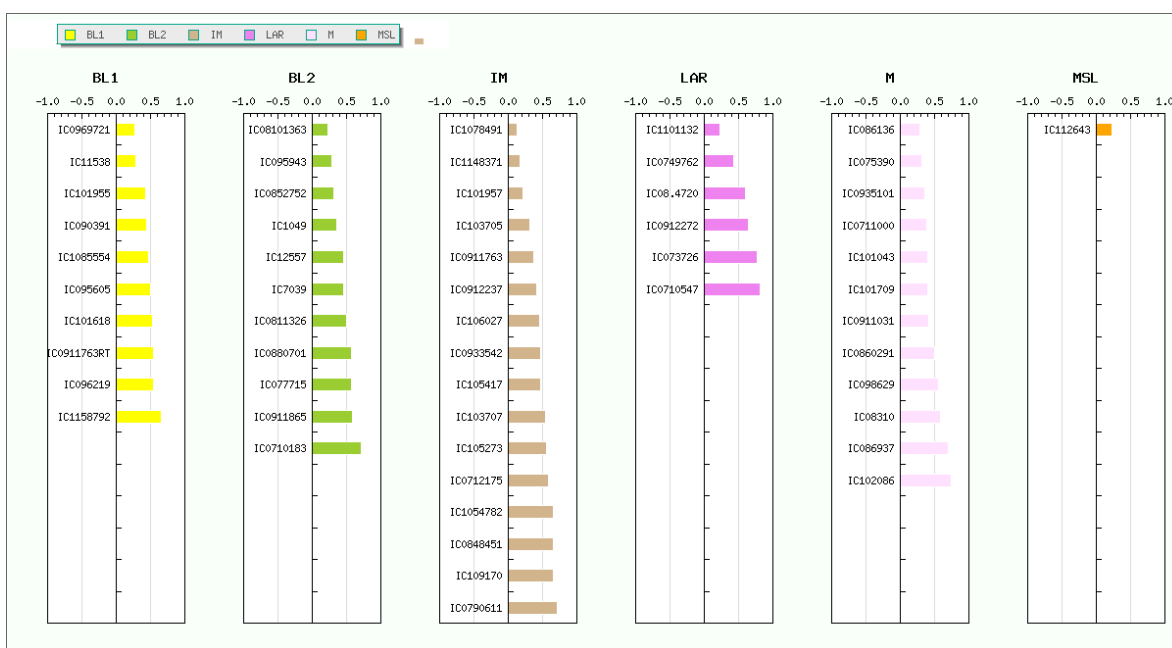


Figura 2. Distribución de los subtipos de Vanderbilt (basado en la clasificación de Lehmann) en mujeres

mexicanas con cáncer de mama triple negativo (TNBC) (n = 68): basal-like 1 (BL1), basal-like 2 (BL2), inmunomodulador (IM), receptor de andrógenos luminal (LAR) , mesenquimales (M) y mesenquimales en forma de tallo (MSL). Este software (no presentado) no pudo identificar otras 11 muestras con un nivel de confianza significativo.

3.5 Inmunohistoquímica de secciones tumorales.

Para corroborar el diagnóstico de CMTN por IHQ , utilizamos los siguientes anticuerpos: ER (clona 1D5, Dako, Dinamarca, Carpinteria, CA, EE. UU.), PR (clona PgR636, Dako, Dinamarca), HER2 (clona K5204, Dako, Dinamarca), y Ki67 (clona D5/16B4, Dako, Dinamarca). El análisis histopatológico de la infiltración linfocítica *strml* e *intrT* se realizó en secciones teñidas con hematoxilina y eosina (HE) de cara completa de acuerdo con Salgado et al. (76). Los TIL intratumorales (*intrT*) se definen como linfocitos en contacto directo de célula a célula con las células tumorales sin estroma intermedio. Por el contrario, los TILs estromales (*strml*) están dispersos o agrupados entre las células/grupos de carcinoma en el estroma y no interactúan directamente con las células tumorales. La evaluación no incluyó áreas de mama normal adyacente, carcinoma in situ, necrosis o fibrosis. Se cortaron microarrays de tejido (TMA) de 5 mm en secciones de 2 µm con el uso de un micrótopo rotatorio (RM2125 RTS, Leica Biosystems, Alemania) y se colocaron en portaobjetos de vidrio adhesivo TOMO IHC (Ventana, EE. UU.). Las secciones de FFPE (2 µm) de las muestras de CMTN se desparafinaron con xileno, se rehidrataron con una serie de etanol graduado (100%, 95%, 70%) con agua destilada de acuerdo con los protocolos de IHQ estándar. La especificidad de la tinción se determinó mediante IHQ en un conjunto de tejidos tumorales en secciones enteras, procesadas utilizando los mismos métodos de fijación y procesamiento que las muestras de CMTN analizadas en el estudio (77). La concentración óptima de cada anticuerpo se estableció mediante la realización de titulaciones en serie en secciones de FFPE. Las condiciones de recuperación de antígenos y los métodos de detección también se optimizaron para cada anticuerpo para mejorar la sensibilidad y la relación señal/ruido. Brevemente, la recuperación de antígeno inducida por calor se realizó colocando portaobjetos en tampón Tris-EDTA (pH 9) o citrato (pH 6) durante 20 minutos a 98°C usando un baño de agua. Las secciones de tejido se enfriaron en el tampón durante 20 minutos antes del tratamiento con el reactivo de bloqueo de peroxidasa (Dako) durante 10 minutos. Luego,

los portaobjetos se incubaron con Background Sniper (Biocare) durante 20 minutos y luego con anti-CD4 (1:30, clona BC/IF6, Dako), anti-CD8 (1:50, clona SP16, Dako), anti-FOXP3 (1:100, clona 86D, Biocare), anti-PD-1 (1:200, clona NAT105, Abcam), anti-PD-L1 (1:20, clon 28-8, Abcam), anti-CTLA-4 (1:20, clona F-8, Santa Cruz) anticuerpos monoclonales primarios. Después de lavar en PBS, se utilizaron sistemas DAKO Envision (Dako) o MACH 1 Universal HRP Polymer (BioCare) y diaminobencidina (DAB; BioCare) para la inmunodetección cromogénica, seguido de contratinción con hematoxilina. Se utilizaron portaobjetos de control negativo sin anticuerpos primarios y controles positivos para cada marcador para cada serie de inmunotinción. Brevemente, se revisó cada sección con un aumento reducido. Los linfocitos positivos en el estroma tumoral se contaron en tres campos de alta potencia (HPF; $\times 40$; Olympus BX53), que representan el espectro de tinción visto en la descripción general inicial de toda la sección y se muestra como el número promedio de células teñidas por HPF. Un patólogo de mama, que no conocía las características y los resultados de la paciente, evaluó de forma independiente los análisis de TIL y IHC (El número de muestras de pacientes para este análisis se especifica en la **figura 1**).

3.6 Secuenciación de nueva generación.

Se generaron bibliotecas genéticas para secuenciación para cada muestra de ADN con el panel de enriquecimiento basado en hotspots de la plataforma comercial Solid Tumor Solution STS_v1 (Sophia Genetics, Saint Sulpice, Suiza). La secuenciación se realizó utilizando un secuenciador Illumina MiniSeq (Illumina, Foster City, CA, EE. UU.). Se llevaron a cabo corridas multiplex, que incluían 15 bibliotecas cada uno, utilizando kits de alto rendimiento MiniSeq de 300 ciclos (Illumina). Los archivos fastq se analizaron para determinar su calidad con FastQC, datos disponibles: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> y se filtraron con trimmomatic (78) antes de alinearlos con el genoma de referencia (GRCh38). Se evaluaron los exones de codificación dirigidos y las uniones de empalme de genes anotados RefSeq que codifican proteínas conocidas para una profundidad promedio de cobertura, con una profundidad mínima de 30X requerida para su inclusión en el análisis posterior. La realineación local alrededor de los sitios de inserción-delección y las regiones con mala calidad de mapeo se

realizó utilizando GATK HaplotypeCaller (79), realizando una recalibración de la puntuación de calidad base. También se identificaron llamadas variantes utilizando GATK HaplotypeCaller. Las variantes se filtraron según los patrones de herencia, el tipo de variante, el panel de genes, el fenotipo y las frecuencias en la población. El panel de la plataforma SOPHiA DDM (Sophia Genetics, Lausanne, Suiza) evalúa exhaustivamente las regiones objetivo en 42 genes asociados con el cáncer [Tabla 1]. Los recursos incluidos son HGMD, 1000 Genomes database, RefSeq Genes 109.20201120 v2, NCBI, Transcript Interactions RefSeq Genes 109.20201120 v2, NCBI, gnomAD Exomes Variant Frequencies 2.0.1, Broad Institute of Harvard & MIT NHLBI GO Exome Sequencing Project, OMIM, PubMed, ClinVar y GenVisR (80).

Tabla 1. Panel de genes asociados a cáncer.

Genes
<i>AKT1</i> (3), <i>ALK</i> (21-25), <i>BRAF</i> (11,15), <i>CDK4</i> (2), <i>CDKN2A</i> (1*,2,3), <i>CTNNA1</i> (3), <i>DDR2</i> (18), <i>DICER1</i> (24,25), <i>EGFR</i> (18-21), <i>ERBB2</i> (8,17,20), <i>ERBB4</i> (10,12), <i>FBXW7</i> (8-12), <i>FGFR1</i> (13,15), <i>FGFR2</i> (7,12,14), <i>FGFR3</i> (7,9,14,16), <i>FOXL2</i> (1*), <i>GNAI1</i> (4,5), <i>GNAQ</i> (4,5), <i>GNAS</i> (8), <i>H3F3A</i> (2*), <i>H3F3B</i> (2*), <i>HIST1H3B</i> (1), <i>HRAS</i> (2-4), <i>IDH1</i> (4), <i>IDH2</i> (4), <i>KIT</i> (8-11,13,17,18), <i>KRAS</i> (2-4), <i>MAP2K1</i> (2,3), <i>MET</i> (2,14-20), <i>MYOD1</i> (1), <i>NRAS</i> (2-4), <i>PDGFRA</i> (12,14,18), <i>PIK3CA</i> (2*,3,6*,8,10,21), <i>PTPN11</i> (3), <i>RAC1</i> (3), <i>RAF1</i> (7,10,12,13*,14*,15*), <i>RET</i> (11,13,15,16), <i>ROS1</i> (38*,41*), <i>SF3B1</i> (15-17), <i>SMAD4</i> (8-12), <i>TERT</i> (promoter*,1*,8*,9*,13*), <i>TP53</i> (full coding region)

Número de exon en parentesis, *solo hotspots.

3.7 Análisis estadístico

Para las variables continuas se presentaron media, mediana y rango, y para las variables categóricas se presentó la frecuencia. Para la aplicación de la varianza de la distribución se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. También se aplicó la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher para la evaluación de la frecuencia. Se realizaron análisis univariados y multivariados con SLP y la SG mediante el modelo de riesgo proporcional de Cox. También se utilizó Kaplan-Meier para analizar los criterios de valoración. Se encontró que los resultados eran significativos si el valor de p era <0.05. Los análisis se realizaron utilizando los softwares SPSS V26 y R.

4. Resultados

4.1 Características clínico-patológicas de los pacientes con CMTN

En este estudio se incluyeron un total de 68 pacientes con CMTN con una mediana de edad de 49.5 años en el momento del diagnóstico y una proporción igual de muestras pre y posmenopáusicas. La clasificación clínica más frecuente en el momento del diagnóstico fue el estadio III (83.8%; n=57) según el Manual de estadificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC) (octava edición). Se informó al menos una característica clínico-patológica de alto riesgo para todos los pacientes en estadio clínico III. Se identificaron tumores de alto grado en el 88% (n=60) de las muestras. La histología ductal estuvo presente en el 87% de los pacientes. Se observó infiltración vascular en el 47% (n=32), y más de la mitad de la cohorte (55.9%; n=38) tenía un nivel alto (> 20%) de Ki67 (**Tabla 2**).

4.2 Manejo del tratamiento de pacientes con CMTN

Todos los pacientes con enfermedad localmente avanzada (83,8%; n=57) recibieron quimioterapia neoadyuvante; de ellos, solo 14 (24,6%) tuvieron RpC y 43 (75,4%) se sometieron a mastectomía radical modificada. El tratamiento neoadyuvante preferible fue un régimen de quimioterapia basado en antraciclinas y taxanos; tenga en cuenta que 42 (61,8%) pacientes recibieron platino como tercer agente. A los pacientes con estadio clínico IV se les administró una quimioterapia basada en antraciclinas o taxanos. Es de recalcar que, no se administró inmunoterapia, ni en el entorno localmente avanzado ni en el entorno metastásico, principalmente debido a las barreras de acceso.

Tabla 2. Características Clínicas y Patológicas Base de las Pacientes (n=68).

Variables	% n/N
Edad (años) mediana (min-max)	49.5 (30-80)
≥40	85.3 (58/68)
<40	14.7 (10/68)
Estatus hormonal	
Premenopausia	50 (34/68)
Postmenopausia	50 (34/68)
Etapa Clínica	
III	83.8 (57/68)
IV	16.2 (11/68)

Mastectomía	
Si	75.4 (43/57)
No	24.6 (14/57)
Histología	
Ductal	86.8 (59/68)
Lobular	7.4 (5/68)
Otra	5.9 (4/68)
Grado histológico	
G3	88.2 (60/68)
G2	11.8 (8/68)
Infiltración vascular	
Si	47.1 (32/68)
No	52.9 (36/68)
Respuesta Patológica Completa	
Si	24.6 (14/57)
No	50.9 (29/57)
No evaluado	24.6 (14/57)
Tratamiento Sistemático	
Neo/Adyuvancia	83.8 (57/68)
Paliativo	16.2 (11/68)
Radioterapia	
No	25 (17/68)
Si	75 (51/68)
Ki67(%)	
<14	1.5 (1/68)
14-20	2.9 (2/68)
>20	55.9 (38/68)
ND	39.7 (27/68)
ACE (ng/ml)	
<3.38	79.4 (54/68)
>3.38	19.1 (13/68)
ND	1.5 (1/68)
CA 15-3 (U/ml)	
<12.32	20.6 (14/68)
>12.32	77.9 (53/68)
NA	1.5 (1/68)
Tipo de Quimioterapia	
A+T	22.0 (15/68)
A+T+Cis	61.8 (42/68)
A o T	16.2 (11/68)

Abreviaciones: ACE antígeno carcinoembrionario, CA 15-3 (Carbohydrate antigen, siglas en ingles) 15-3, A+T Adriamicina + taxano, A+T+C Adriamicina + taxano + cisplatino.

De la cohorte de 57 pacientes con enfermedad en estadio clínico III, el 70,2% no respondió al tratamiento. Cuarenta pacientes tienen al menos una característica patológica de alto riesgo (ganglios linfáticos axilares positivos, grado histológico 3, índice Ki-67 > 20% o invasión linfovascular) en la que los patrones de recurrencia fueron los siguientes: 25 (43,9%) tenían

afectación del sistema nervioso central (SNC), 21 (36,8%) metástasis pulmonares, 12 (21,1%) metástasis óseas y 11 (19,3%) desarrollaron metástasis hepáticas (**Tabla 3**).

Tabla 3. Tipo del Sitio de Recurrencia de las Paccintes en Estadio III (n=57).

Recurrencia	%(n/N)
No	29.8 (17/57)
Si	70.2 (40/57)
Recurrencia a SNC	43.9 (25/57)
Metástasis a otros sitios no SNC	
Visceral	29.8 (17/57)
No Visceral	5.3 (3/57)
Ambos	14.0 (8/57)
Metástasis a Pulmón	36.8 (21/57)
Metástastais a Hígado	19.3 (11/57)
Metástasis a Hueso	21.1 (12/57)

SNC: Sistema Nervioso Central.

4.3 Clasificación de los pacientes con CMTN en subtipos IM y no IM

Según los subtipos de Lehmann, de las 68 muestras de tumores, 55 se clasificaron entre los subtipos IM y no-IM (**Tabla 4**). El subtipo IM fue el más común en nuestra cohorte de paccintes con CMTN, encontrándose en 16/68 (23,5%) de las muestras examinadas, seguido de los subtipos BL1 y BL2 encontrados en el 20% de los casos. La **Figura 2** muestra el análisis completo por muestra basado en los subtipos de Lehmann. El diagrama de flujo de trabajo en el material complementario describe más detalles sobre el análisis completo de muestras de tumores (**Figura 1**).

Table 4 Subtipos moleculares según Lehmann y cols.

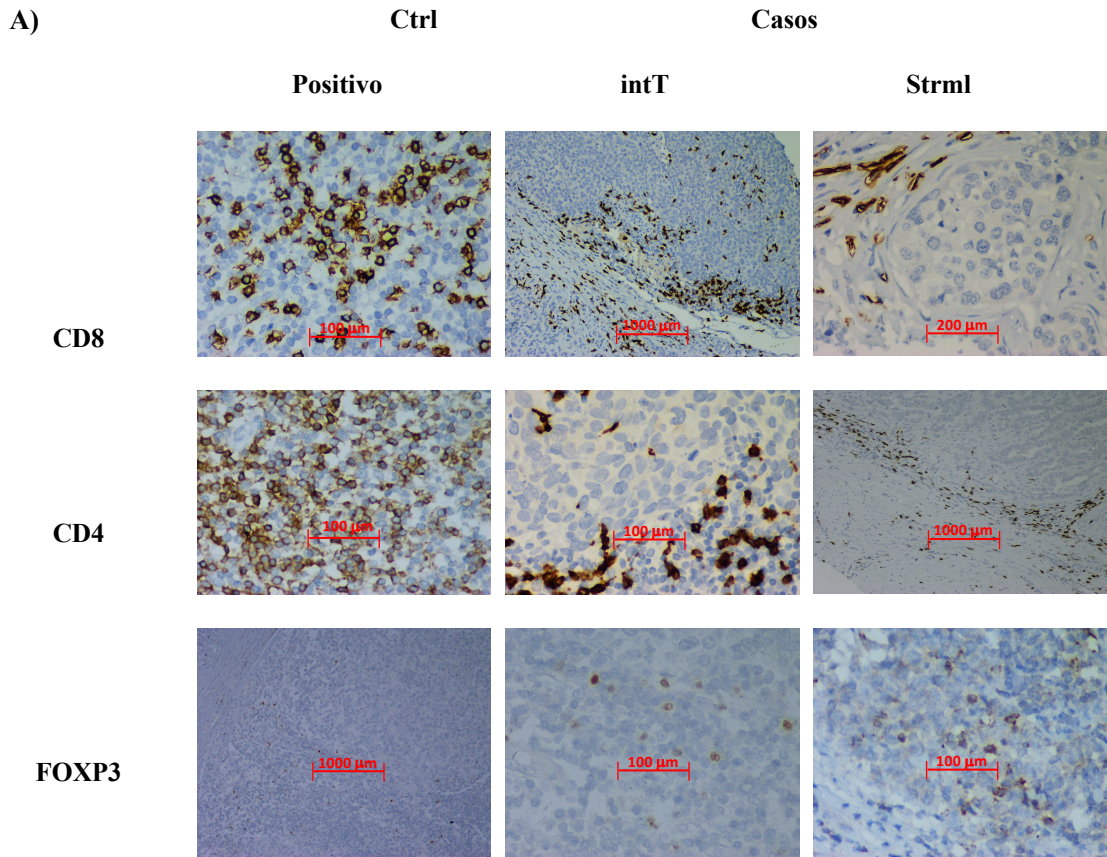
IM y no-IM	Subtipo	% (n/N)
IM	IM	23.5 (16/68)
non-IM 57.3 (39/68)	BL1	14.7 (10/68)
	BL2	14.7 (10/68)
	LAR	8.8 (6/68)
	M	17.6 (12/68)
	MSL	1.5 (1/68)
	UNS	19.1 (13/68)

Immunomodulador (IM), tipo basal1/2 (BL1/2), mesenquimatoso (M), Tipo células madre mesenquimatoso (MSL), Receptores de andrógeno luminal (LAR), No clasificables (UNS).

4.4 Subpoblaciones de TILs en el subtipo IM de CMTN

Se dispuso de 39 muestras para el análisis de subpoblaciones de TILs: 13 muestras pertenecían al subtipo IM y 26 al subtipo no-IM (**Figura 3**). Observamos una mayor infiltración *intT* de CD8-TILs (Th1) en el subtipo IM, 20% (95 % IC, 9.4-38.6) frente al 10% (IC 95%, 7.16-15.45), en comparación con el subtipo no-IM, $p=0.058$. No se observaron diferencias significativas entre los subtipos IM y no-IM en la infiltración *strml* de CD8-TIL. En CD4-TILs (Th2), ni la infiltración *intT* ni *strml* no se asoció con ningún subtipo. El fenotipo de TILs más predominante en las muestras de CMTN fue FOXP3-TILs (Treg). Cabe destacar que Tregs se detectó con mayor frecuencia en el citoplasma y pocos casos en el núcleo. Las células FOXP3-TILs mostraron diferencias estadísticas entre los subtipos IM y

no-IM, en ambos, 15% *intT* (95% CI, 8.49-23.21; $p=0.004$) y 40% *strml* (95% CI, 26.80-58.27; $p=0.001$) [Figura 3].



B)

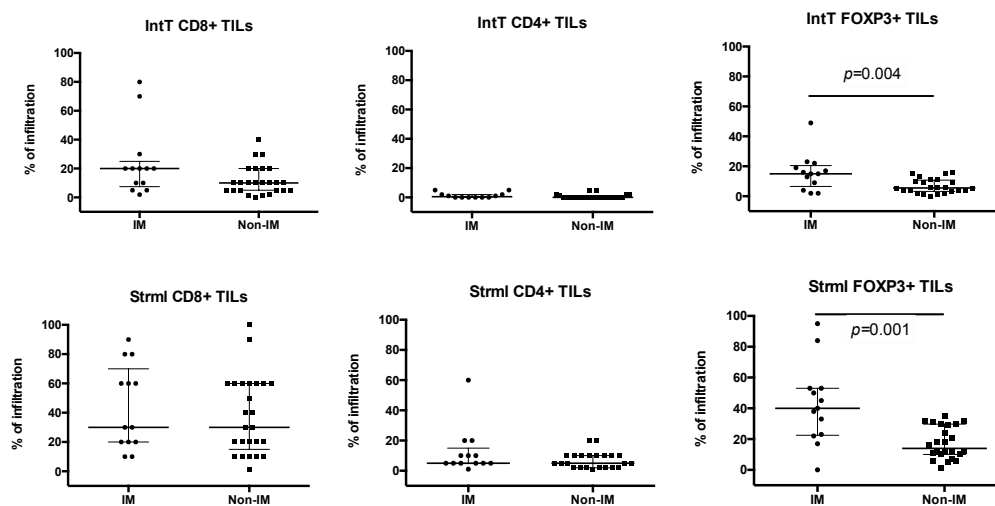


Figura 3. Infiltración tumoral de linfocitos en subtipo IM vs. subtipo no-IM. (A) Inmunohistoquímica de subpoblaciones de linfocitos infiltrados [CD4+ (ctrl x40, intT x40, strml x4); CD8+ (ctrl x40, intT x4, strml x20), and FOXP3+ (ctrl x4, intT x40, strml x40)] tanto intratumorales (intT) como estromales (strml) en biopsias de CMTN. (B) Los diagramas de dispersión (en porcentaje) comparan la mediana y la distribución de datos entre subtipos IM y no IM, tanto intT como strml por subpoblación de linfocitos (con barras de rango intercuartílico y la mediana); Los resultados del análisis estadístico por contraste obtenido por la prueba U de Mann-Whitney, solo se mostraron estadísticamente significativos.

4.5 Expresión de PD-1, PD-L1 y CTL-4 en el subtipo de IM de CMTN

Aunque los TILs PD-1+ se encontraron en el 97,4% de las muestras tumorales en el subtipo IM, la expresión de PD-1+ no difirió significativamente en las células tumorales. Sin embargo, observamos una tendencia hacia un mayor infiltrado *intT* de TILs PD-1+, 10% (95% CI, 4.07-16.54) en el subtipo IM versus 2% en el subtipo no-IM (95% CI, 2.13-7.10), $p=0,051$ (**Figura 4**). Por el contrario, la infiltración *strml* de TIL PD-1+ no se asociaron con el subtipo de IM. Por otro lado, la expresión de PD-L1+ se detectó tanto en células tumorales como en células de membrana de TILs, donde la expresión de PD-L1 fue significativamente mayor en tumores IM (20% [IC 95%, 7,83-43,42]) que tumores no-IM (5% [IC del 95%, 2,57-11,98; $p=0,004$]). Finalmente, para TILs CTLA-4+, se evaluó la tinción *intT* y *strml*, y ambas fueron mayores en el subtipo IM (9%; IC del 95%, 5,89-19,8) y (30%; IC del 95%, 13,18-36,07), en comparación con [3%, IC del 95%, (2,4-4,6); $p<0,001$] y [8%, IC del 95%, (6,99-12,76); $p=0,006$], respectivamente.

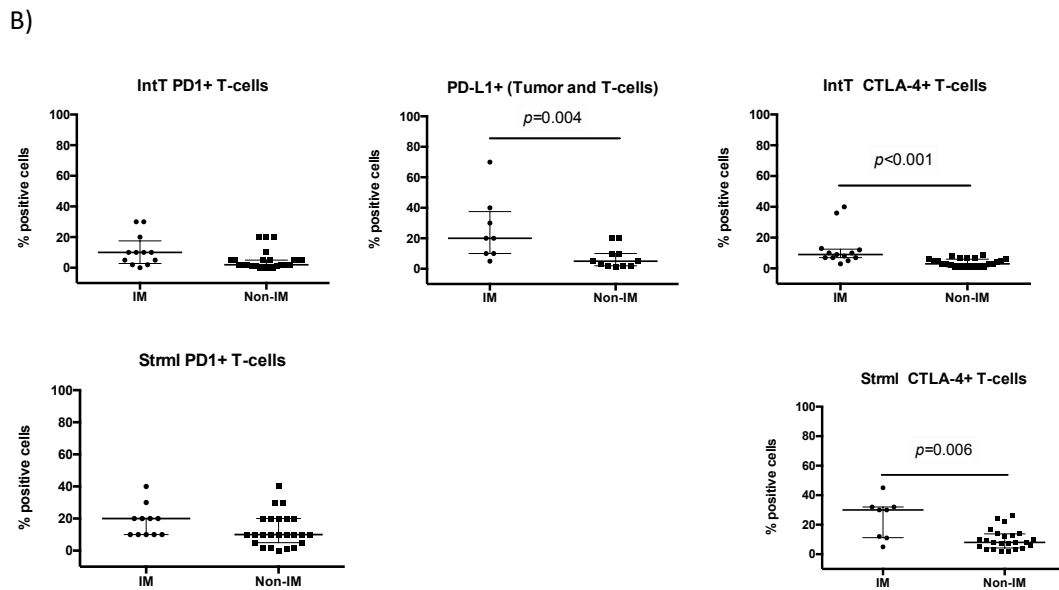
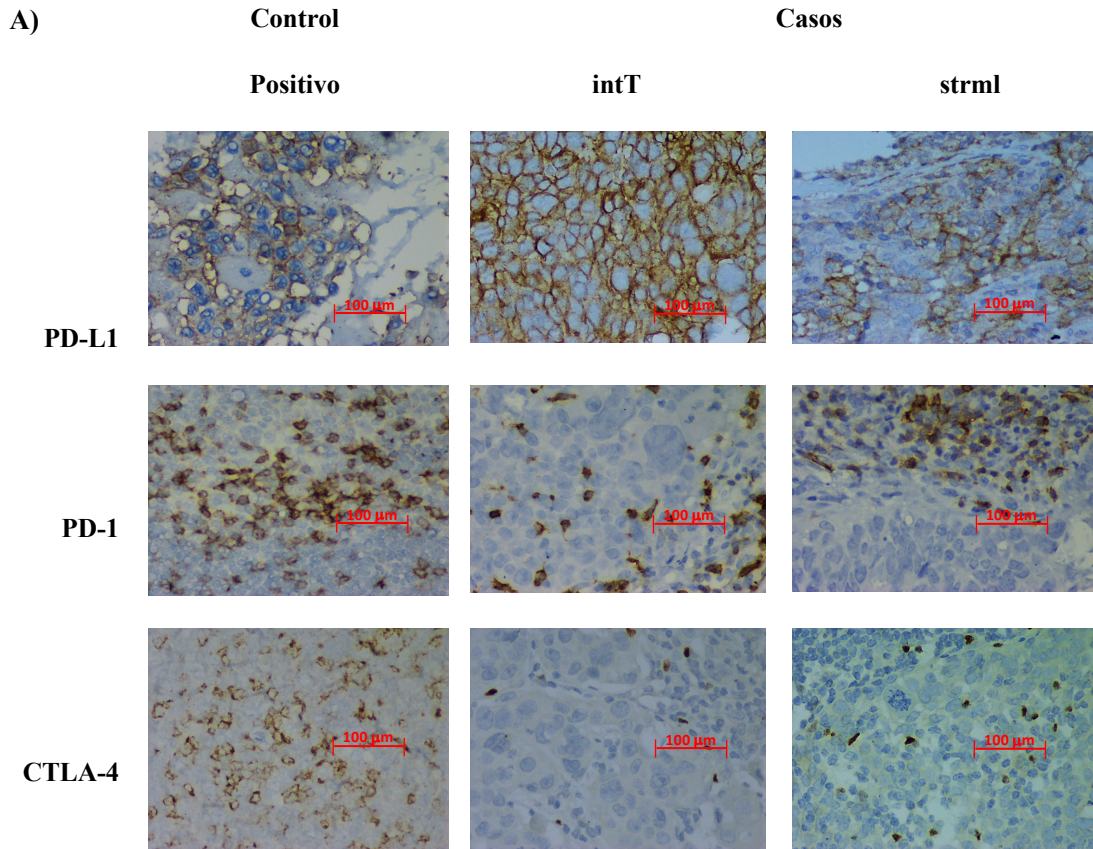


Figura 4. Expresión de los puntos de control inmunitarios en subtipos IM frente a no-IM: (A) Imágenes inmunohistoquímicas de los puntos de control inmunitarios (ICp) intratumorales (intT) y estromales (strml) [PD-L1 + (ctrl x40, intT x40, strml x40); PD-1 + (ctrl x40, intT x40, strml x40) y CTLA-4 + (ctrl x40, intT

x40, strml x40)] en biopsias de CMTN. (B) Gráficos de dispersión (porcentajes) que comparan la mediana y la distribución de datos entre subtipos IM y no-IM, tanto intT como strml por celdas positivas de ICp (con barras de rango intercuartílico y la mediana); diferencias evaluadas mediante la prueba U de Mann-Whitney; Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en cada gráfico.

4.6 Expresión diferencial de ARN codificantes y largos no codificantes entre los subtipos IM y no-IM en CMTN

Llevamos a cabo un análisis de expresión génica diferencial en regiones codificantes y no codificantes largas con el fin de caracterizar las diferencias entre las muestras clasificadas como subtipos IM y no-IM. Los resultados de este análisis mostraron un total de 74 genes con expresión diferencial (DEG) al comparar muestras IM versus no IM. En todos los casos, la expresión diferencial resultó en una regulación positiva significativa de estos genes en el subtipo IM, con $|FC| > 2$ y un valor de $p < 0,0002$ [Tabla 5]. Además, realizamos agrupaciones jerárquicas no supervisadas (Figura 5a), Que identificaron varios patrones en términos de DEG. Esto se ilustra en el mapa de calor que se muestra en la Figura 5a, en el que las muestras IM (mostradas en magenta) se agrupan para mostrar un patrón que indica la sobreexpresión de genes, en comparación con las muestras no-IM (mostradas en verde azulado). Para explorar la función de los genes, un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de los genes expresados en el grupo de IM, identificó procesos biológicos asociados con el sistema inmunológico relevantes para nuestra hipótesis de trabajo. El análisis de vías de señalización, muestra el enriquecimiento de la vía de señalización de la β -catenina (conocida por ser muy relevante en los cánceres humanos) [Figura 5b] en el 16% de los genes que identificamos como expresados diferencialmente.

Tabla 5. Análisis de expresión génica diferencial codificante y regiones largas no codificantes.

ID	LOGFC	AVEEXPR	T	P.VALUE	ADJ.P.VAL	B
<i>FDCSP</i>	2.943361527	6.850946853	3.955305312	0.000208904	0.01170946	0.515853226
<i>IGKC</i>	2.24664711	7.356507915	3.954025916	0.000209787	0.01173637	0.511982038
<i>IGHM</i>	2.231013275	6.286047314	3.847805474	0.000297036	0.01551561	0.193058658
<i>IGKC</i>	2.123936034	8.079436342	3.918282083	0.000235952	0.012891516	0.404112859
<i>IGHA1</i>	2.103705005	5.952013419	4.292874769	6.72×10^{-5}	0.005139488	1.56053933
<i>IGKC</i>	2.069324519	8.551306661	4.440568321	4.04×10^{-5}	0.003517919	2.031150831
<i>IGHG1</i>	2.013379674	7.688921093	4.268084854	7.31×10^{-5}	0.00546486	1.482316947
<i>IGHV4-31</i>	1.982978135	8.208467165	4.08699288	0.000134883	0.008346984	0.917983833
<i>IGLV1-44</i>	1.981639885	3.70740469	4.957223829	6.45×10^{-6}	0.00092192	3.732406847
<i>IGHG1</i>	1.96910446	9.086445794	4.905015932	7.79×10^{-6}	0.001037077	3.55701903

IGKC	1.938970572	6.809754967	4.620531925	2.15× 10 ⁻⁵	0.002295999	2.614586371
CXCL13	1.818226308	5.593121881	6.145128678	7.61× 10 ⁻⁸	7.92×10 ⁻⁵	7.871888858
IGLL5	1.785391259	10.22665725	4.951568066	6.59× 10 ⁻⁶	0.000931851	3.71337264
IGKV@	1.745843704	7.592397044	4.980519724	5.93× 10 ⁻⁶	0.000860145	3.810894316
CXCL9	1.731316043	7.966204912	4.261334825	7.48× 10 ⁻⁵	0.005535427	1.461057195
IGKC	1.695100885	6.158572658	4.898921853	7.97× 10 ⁻⁶	0.001050526	3.536593105
IGKC	1.653521857	10.01740769	3.907324131	0.000244584	0.013275411	0.3711542
IGKV3D-15	1.649032155	8.347893953	4.799719601	1.14× 10 ⁻⁵	0.001381514	3.205503434
TRAJ17	1.645074727	5.680195043	5.019889742	5.14× 10 ⁻⁶	0.000764423	3.943849061
IGHG1	1.578146078	6.779645809	4.255736544	7.63× 10 ⁻⁵	0.00558278	1.443437827
IGLV3-25	1.567399741	8.841218986	3.807293988	0.000338748	0.017111742	0.072741306
CXCL10	1.549755728	8.615580185	4.207080894	9.00× 10 ⁻⁵	0.006305284	1.290800526
IGK	1.533307511	9.65561248	4.459600572	3.78× 10 ⁻⁵	0.003358301	2.092347901
GBP4	1.467080145	7.179058901	4.890195916	8.22× 10 ⁻⁶	0.001069571	3.507363001
IGKC	1.462262791	9.112632218	4.133286272	0.000115473	0.007430553	1.061031265
YME1L1	1.454346779	6.020678752	6.511737909	1.86× 10 ⁻⁸	4.52×10 ⁻⁵	9.187052419
CD38	1.45006825	6.098312657	5.997847749	1.34× 10 ⁻⁷	9.73×10 ⁻⁵	7.346951261
IRF4	1.442298063	6.352035066	5.180562042	2.86× 10 ⁻⁶	0.000491682	4.490319118
FCRL5	1.434365642	5.104564812	4.892925942	8.14× 10 ⁻⁶	0.00106385	3.516505848
IGHM	1.408334848	7.384230397	5.363446283	1.45× 10 ⁻⁶	0.000353343	5.119307099
CD79A	1.398772653	6.883134059	5.902172681	1.92× 10 ⁻⁷	0.000123025	7.007260681
CXCR2P1	1.384830625	6.064015095	6.05509216	1.07× 10 ⁻⁷	8.67×10 ⁻⁵	7.550705343
PIM2	1.383637253	7.001465215	5.567678968	6.79× 10 ⁻⁷	0.000232898	5.829458072
TRAV12-2	1.375753055	5.361220858	5.097362895	3.88× 10 ⁻⁶	0.00062071	4.206589283
YME1L1	1.370614713	4.836545567	5.825355882	2.57× 10 ⁻⁷	0.000138742	6.735358162
IGHG1	1.351807848	5.847076781	4.467101487	3.68× 10 ⁻⁵	0.003291861	2.116500313
UBD	1.335481789	7.503789199	4.853240859	9.39× 10 ⁻⁶	0.001184665	3.383797741
TENT5C	1.334892171	7.181763181	4.605384024	2.27× 10 ⁻⁵	0.002378397	2.565076177
FAM30A	1.265925483	6.835648924	5.825294045	2.57× 10 ⁻⁷	0.000138742	6.735139598
IL2RG	1.255929871	7.464312792	6.776048603	6.69× 10 ⁻⁹	2.36×10 ⁻⁵	10.14048779
CCL19	1.22677208	7.651253468	3.861529069	0.00028406	0.014944919	0.233984184
IGLC1	1.219948285	7.607714531	4.548842393	2.77× 10 ⁻⁵	0.002734128	2.380911705
SLAMF7	1.213199925	6.574147652	6.280428912	4.53× 10 ⁻⁸	5.79×10 ⁻⁵	8.356010201
MZB1	1.197273079	7.35465191	4.944604621	6.75× 10 ⁻⁶	0.000941908	3.689948804
TRAV20	1.165609208	3.733066918	5.33860379	1.60× 10 ⁻⁶	0.000360407	5.03346172
SLAMF6	1.152327487	4.772127079	5.888984425	2.02× 10 ⁻⁷	0.000123025	6.960524665
TRAV20	1.130564502	5.911463894	6.07646435	9.90× 10 ⁻⁸	8.56×10 ⁻⁵	7.626869084
GBP5	1.118917883	6.130462332	4.805756945	1.11× 10 ⁻⁵	0.001366469	3.225575643
LAX1	1.114841438	5.691522904	5.47767354	9.51× 10 ⁻⁷	0.000269933	5.515558511
ANKRD44-IT1	1.114619595	5.398345928	7.186071885	1.36× 10 ⁻⁹	2.14×10 ⁻⁵	11.62370392
OR6C4	1.099240147	6.444723972	5.30191346	1.83× 10 ⁻⁶	0.000394399	4.906901709
YME1L1	1.096860683	5.04075177	4.765745683	1.28× 10 ⁻⁵	0.001540635	3.092743426
YME1L1	1.093800838	4.617918367	3.811595136	0.000334065	0.016933924	0.085480333
GPR174	1.093060811	4.102078365	6.292250112	4.33× 10 ⁻⁸	5.79×10 ⁻⁵	8.398384236
SEL1L3	1.090322848	7.044401313	5.533272873	7.73× 10 ⁻⁷	0.000250206	5.709297909
CCR2	1.078606635	6.115620598	5.275981805	2.01× 10 ⁻⁶	0.000407161	4.817619124
VCAM1	1.065525166	6.15650004	4.501200371	3.27× 10 ⁻⁵	0.003083731	2.226533783
BTG2	1.054206604	9.076613637	5.35724828	1.49× 10 ⁻⁶	0.000356297	5.097877918
IGKC	1.039223904	7.412084324	4.303013122	6.49× 10 ⁻⁵	0.005084913	1.592595057
YME1L1	1.037853606	6.770696289	4.975084582	6.05× 10 ⁻⁶	0.000872718	3.792570132
TRDV2	1.037646389	3.670155434	5.215321289	2.51× 10 ⁻⁶	0.000458124	4.609318714
MIR142	1.033700489	4.774926725	4.763015112	1.30× 10 ⁻⁵	0.001548397	3.083694906
CCL5	1.033222203	7.59358146	5.876897681	2.12× 10 ⁻⁷	0.000123025	6.917711683
IFNG	1.029312304	4.65923508	6.399562831	2.87× 10 ⁻⁸	5.61×10 ⁻⁵	8.783557791
YME1L1	1.028751756	3.414385854	5.601535183	5.98× 10 ⁻⁷	0.000215255	5.94789292
CD2	1.027183095	7.216852064	5.808298453	2.74× 10 ⁻⁷	0.000138742	6.675088041
SLFN12L	1.017642293	5.541069054	6.150462534	7.46× 10 ⁻⁸	7.92×10 ⁻⁵	7.890941865
IL23A	1.013598461	5.190110719	4.729454739	1.46× 10 ⁻⁵	0.001689798	2.972659022
TRAV12-2	1.012090486	5.930724244	4.299928847	6.56× 10 ⁻⁵	0.005084913	1.582839135

<i>ITGAL</i>	1.008762873	6.514419207	6.115592128	8.52×10^{-8}	8.28×10^{-5}	7.766432672
<i>IGKC</i>	1.008642719	5.57773397	5.540534135	7.52×10^{-7}	0.000249032	5.734640302
<i>BCL2A1</i>	1.007547625	5.561778583	4.024974657	0.000165882	0.009729212	0.727703982
<i>YME1L1</i>	1.006633651	4.265723623	4.872486364	8.76×10^{-6}	0.001116699	3.448102231
<i>CTSS</i>	1.005838028	7.306051985	5.04659995	4.66×10^{-6}	0.000708075	4.03426944

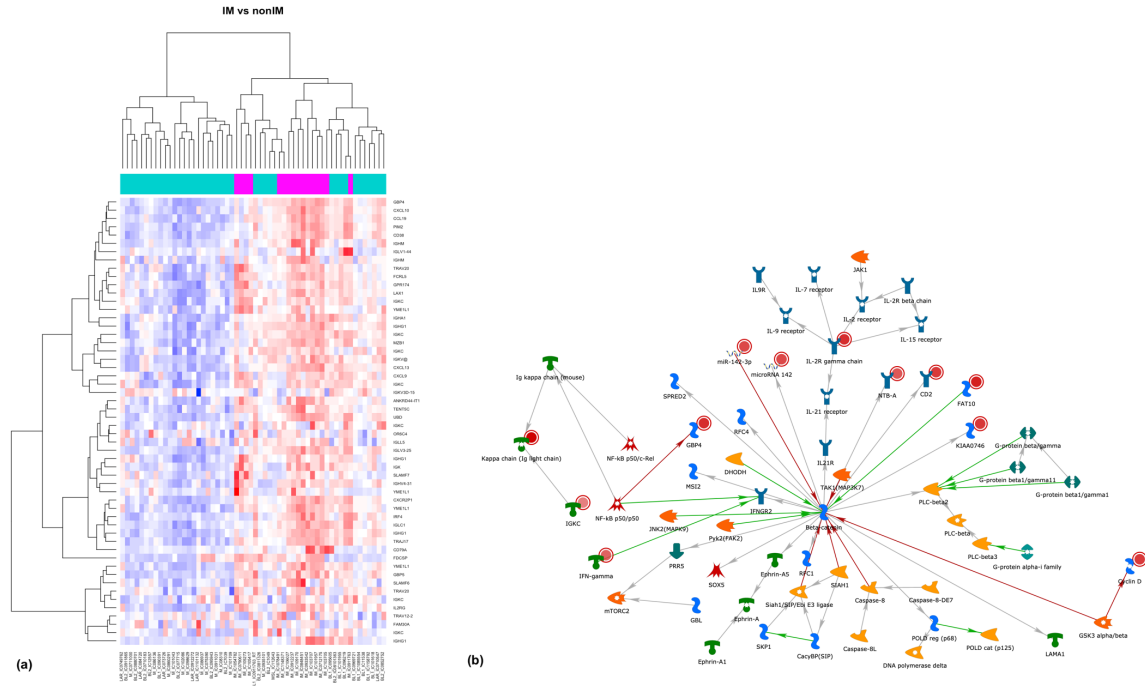


Figura 5. Análisis de expresión génica (a) Mapa de calor resultante de un agrupamiento jerárquico no supervisado, la barra superior del mapa de calor muestra en magenta las muestras IM y en verde claro las no IM. El rojo indica sobreexpresión genética; las columnas son muestras y las filas son genes. (b) El análisis de enriquecimiento con Metacore Clarivate™ destacó la ruta de señalización de β -catenina; los puntos rojos marcan los genes de nuestra lista.

4.7 LncRNA asociados con el subtipo de IM de CMTN

El análisis de expresión diferencial en las regiones no codificantes de lncRNAs entre muestras IM y no-IM fue más escaso en comparación con las secuencias codificantes. A partir de este análisis, identificamos 7 lncRNAs expresados diferencialmente [6 regulados al alza (\uparrow) y 1 regulado a la baja (\downarrow)] basados en $|FC| > 2$ y un valor $p < 0.006$ (LINC00173 \uparrow ,

LINC00854↑, LINC00869↑, LINC00426↑, LINC00861↑, LINC01550↑, LINC00312↓)
(Tabla 6).

Tabla 6. Resumen estadístico de un modelo lineal para determinar la expresión diferencial de lncRNAs en muestras IM frente a muestras no-IM. Tasas de cambio (FCH).

ID	FCH	Promedio de expresión	t-Test	P.value	adj.P.Val
LINC00861	1.64	4.800199	4.982293	5.82E-06	0.00182405
LINC00869	1.49	6.408327	3.61491	6.23E-04	0.083770344
LINC00426	1.38	4.920571	5.373881	1.38E-06	0.000647671
LINC01550	1.35	4.084667	5.5031	8.50E-07	0.000647671
LINC00854	1.32	6.853894	3.699587	4.76E-04	0.074699771
LINC00312	-1.29	3.827583	-2.835162	6.26E-03	0.317551682
LINC00173	1.26	4.548792	3.099832	2.97E-03	0.199410413

La **Figura 6a** muestra los resultados del enfoque de agrupamiento jerárquico no supervisado, destacando los patrones de expresión agrupados por subtipo. El mapa de calor muestra un patrón de expresión opuesto entre las muestras del subtipo mesenquimatoso y del subtipo IM.

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para evaluar el efecto de esos 7 ARN largos no codificantes intergénicos que separan el subtipo IM del resto de los subtipos. **Figura 6b** muestra el PCA utilizando todos los lncRNA anotados en el microarray donde los primeros tres componentes principales solo pueden acumular el 31.7% de la variabilidad total en los datos de todas las muestras. Por el contrario, la **Figura 6c** muestra el PCA usando solo los siete ARNnc estadísticamente significativos; en este caso, los tres primeros componentes principales explican el 77.43% de la variabilidad total. Aunque la clasificación no es perfecta, pudimos identificar aquellos que mejor separan a los dos grupos. Las estadísticas resumidas después de ajustar el modelo lineal se presentan en la **Tabla 6**. Los 7 lncRNA son estadísticamente significativos según el valor p, pero solo 5 siguen siendo significativos después del ajuste FDR para múltiples hipótesis representadas en el valor p ajustado.

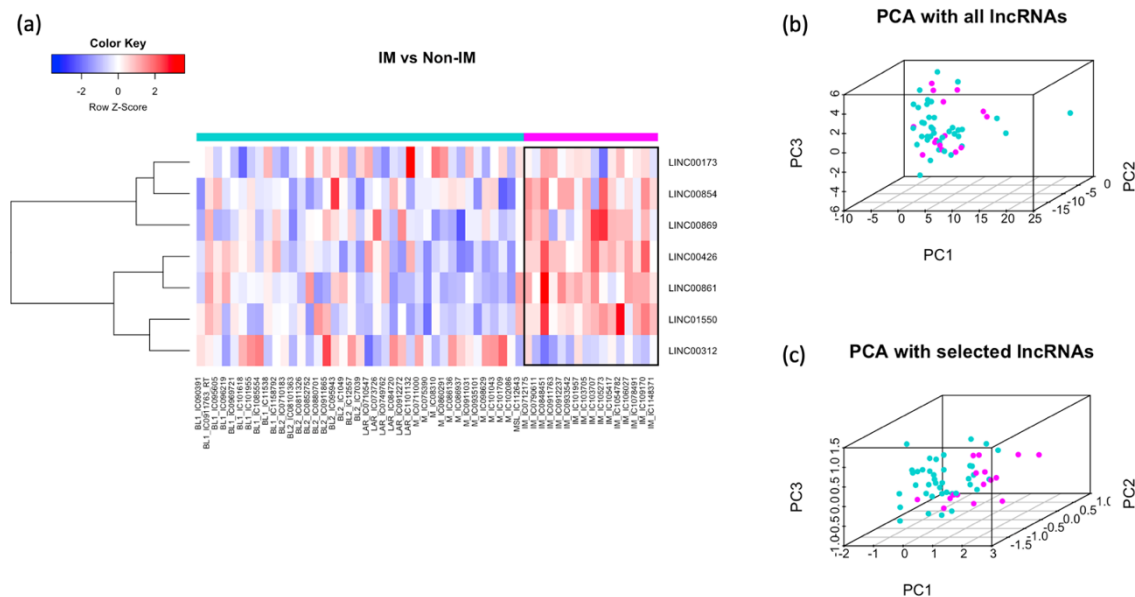


Figura 6. Expresión diferencial de lncRNA entre subtipos IM vs. no IM. (a) Mapa de calor de un agrupamiento jerárquico no supervisado de lncRNA seleccionados basado en pliegues de cambio ≥ 1.2 y nivel de significancia p-valor < 0.006 . La barra superior en magenta muestra muestras clasificadas como IM; la barra verde azulado representa los clasificados como no IM. El rojo representa la regulación al alza y la regulación azul a la baja. (b) Análisis de componentes principales (PCA) que muestra una gráfica en 3D de muestras IM (magenta) frente a muestras no IM (verde azulado) cuando se utilizan todos los ARNnc anotados. (c) El mismo gráfico cuando se utilizan sólo los siete ARNnc más significativos que clasifican mejor los subtipos IM y no IM bajo análisis.

4.8 Comparación de la frecuencia de mutación entre subtipos IM y no IM

Identificamos alteraciones genéticas en 42 genes clínicamente relevantes asociados con tumores sólidos en 29 muestras de CMTN (11 IM y 18 no-IM) (Figura 5). Se identificaron un total de 3216 sustituciones de bases adquiridas somáticamente; entre ellos, 2294 estaban en sitios intrónicos. Hubo 162 mutaciones missense, 13 nonsense, 3 en el sitio de empalme esencial y 281 mutaciones silenciosas en las regiones codificantes de proteínas. Se observaron un total de 176 mutaciones de la región intergénica en el 40% de los genes incluidos en este panel de 42 genes. De los 9 indels identificados, 5 fueron deleciones de Frame-shift, 4 en TP53 y 1 en SMAD4; se identificaron dos deleciones en marco, una en

TP53 y la otra en KIT; además, se observaron 2 inserciones, ambas en TP53. El resumen de mutaciones se muestra en la **Figura 7**.

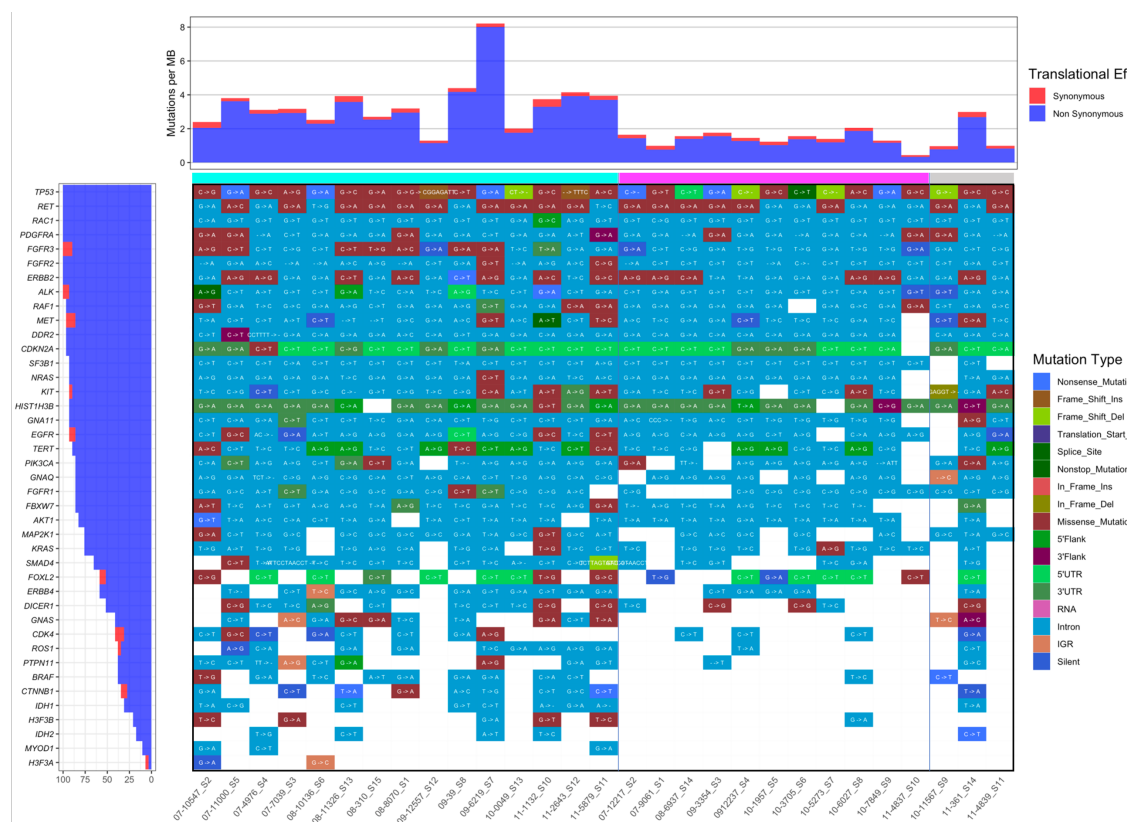


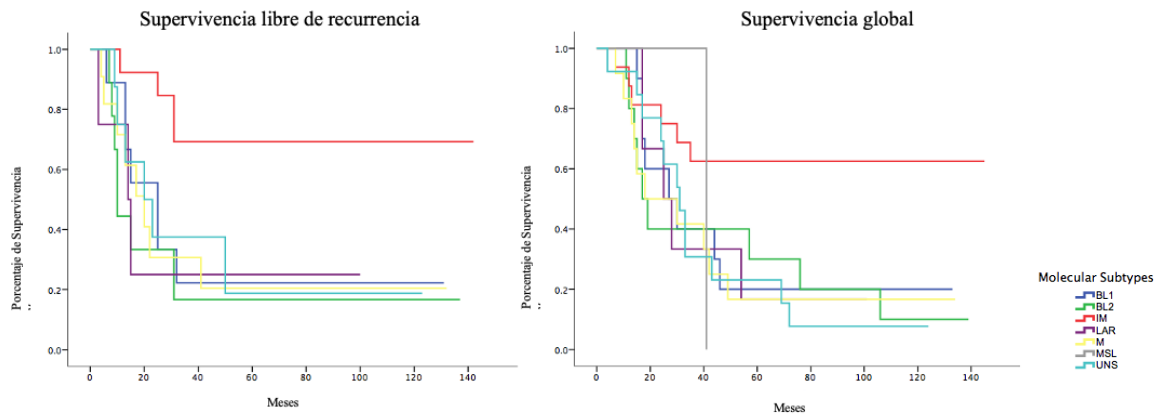
Figura 7. Comparación de mutación patogénica por tipo y frecuencia en subtipo IM(magenta) y subtipos no-IM (verde azulado) según la clasificación de Lehmann para pacientes con TNBC. Las últimas tres muestras (gris claro) son muestras sin clasificar, que se secuenciaron por motivos de comparación. La barra superior muestra la tasa de mutación por efecto de traslación por muestra, y el gráfico de la barra izquierda muestra la tasa de mutación y su efecto de traslación por gen; Las variantes sinónimos están marcadas en rojo y las no sinónimos en azul. El gen mutado superior es TP53, seguido de RET, RAC1 y PDGFRA.

Además, observamos una diferencia en términos de la tasa de mutación entre los subtipos IM (barra superior en magenta) y no IM (barra superior en verde azulado). Dentro de este último, había tres muestras que no se pudieron clasificar con el algoritmo de Lehmann (columnas del extremo derecho con la barra superior en gris claro). Las barras azul/roja en la parte superior

del gráfico principal muestran la tasa de mutación por muestra, representada como alteraciones sinónimas (rojo) y no sinónimas (azul). En particular, el subgrupo no-IM se caracteriza por un mayor número de mutaciones y una mayor abundancia de variantes sin sentido. En la parte inferior del gráfico de barras de la izquierda, tenemos genes con mutación baja, donde vemos un patrón de mutación escasa para las muestras de IM. Encontramos 5 genes libres de mutaciones (GNAS, CTNNB1, IDH1, IDH2, MYOD1) y dos que podrían ser biomarcadores potenciales para inmunoterapia en CMTN; CTNNB1 (Catenina beta-1) e IDH1. Para IDH, no se encontraron mutaciones para las muestras IM y el 50% de las muestras no-IM tenían este gen mutado. Para el caso de IDH2, no se encontraron mutaciones en muestras del grupo IM y un 28% en las muestras no-IM; todos menos uno eran intrónicos y el otro era una mutación sin sentido.

4.9 Variables clínicas y respuesta clínica observada en los subtipos IM y no-IM en CMTN

Las variables clínicas y patológicas asociadas con el subtipo de IM incluyeron invasión vascular y baja probabilidad de metástasis a pulmón, hígado y sistema nervioso central (**Tabla 7**). Las curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de recurrencia (SLR) en pacientes en estadio III y para la supervivencia global (SG) se muestran en la **Figura 8**. Un total de 51 (75%) pacientes murieron debido a la progresión de la enfermedad durante el seguimiento. En ambos gráficos, observamos cuán diferente es la tasa de supervivencia para los pacientes del subtipo IM en comparación con cada uno de los otros subtipos. Este resultado sugiere que el subtipo IM tuvo el pronóstico más favorable.



	Mediana (meses)	(IC 95%)
BL1	25	(11.1-38.9)
BL2	10	(8.5-11.5)
IM	NA	NA
LAR	14	(2.2-25.7)
MSL	-	-
M	20	(9.5-30.5)
UNS	20	(6.1-33.9)

Log-Rank Test, $p=0.049$

	Mediana (meses)	(IC 95%)
BL1	27	(8.4-45.6)
BL2	17	(10.8-23.2)
IM	NA	NA
LAR	25	(11.8-38.2)
MSL	41	-
M	31	(24-38)
UNS	30	(22.9-37.1)

Log-Rank Test, $p=0.139$

Figura 8. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de recurrencia en pacientes con enfermedad en estadio III (izquierda) y supervivencia general (derecha) en todas las muestras clasificadas con diferentes subtipos moleculares de CMTN. NA: No alcanzado; * $p < 0,05$.

En el análisis multivariado, el tipo de cirugía de mama y la radioterapia previa del SNC aumentaron significativamente el riesgo de muerte y recurrencia. Curiosamente, después de ajustar por factores significativos en el análisis univariado, el subtipo de IM influyó positivamente en la SLR y la SG en pacientes con CMTN, lo que representa un factor protector. El modelo completo se muestra en la **Tabla 8**.

Tabla 7. Características clínicas y patológicas de los pacientes con CMTN entre los subtipos IM y No-IM

Características clínicas	IM	No-IM	p-Valor
	%(n/N)	%(n/N)	
Estatus hormonal			
Premenopausia	73.3(11/15)	45.2(19/42)	-
Postmenopausia	26.7(4/15)	54.8(23/42)	0.057
Invasión Vascular			
Si	66.7(10/15)	33.3 (14/42)	-
No	33.3(5/15)	40.4(28/42)	0.026*
RpC			
Si	45.5(5/11)	23.3(7/30)	-
No	54.5(6/11)	76.6(23/30)	0.160
Recurrencia			
Si	33.3 (5/15)	76.2(32/42)	-
No	66.7 (10/15)	23.8 (10/42)	0.004*
Metástasis a Pulmón			
Si	0(0/15)	50 (21/42)	-
No	100 (15/15)	50 (21/42)	<0.001*
Metástasis a Hígado			
Si	0 (0/15)	26.2 (11/42)	-
No	100 (15/15)	73.8 (31/42)	0.023*
Metástasis a Hueso			
Si	6.7 (1/15)	26.2 (11/42)	-
No	93.3 (14/15)	73.8 (31/42)	0.106
Metástasis a SNC			

Yes	20 (3/15)	47.6 (20/42)	-
No	80 (12/15)	52.4 (22/52)	0.022*

Análisis bivariado por Chi-cuadrado/Prueba exacta de Fisher para la asociación entre la variable dependiente (subtipos moleculares) y las variables independientes (variables clínicas y patológicas). RpC: respuesta patológica completa, SNC: sistema nervioso central, EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; $p < 0,05$.

Tabla 8. Análisis univariado y multivariado con SLR y SG en pacientes con CMTN.

Variable	SLR				SG			
	Análisis Univariado		Análisis Multivariado		Análisis Univariado		Análisis Multivariado	
	HR (IC 95%)	p-value	HR (IC 95%)	p-value	HR (IC 95%)	p-value	HR (IC 95%)	p-value
Estadio								
III	-	-	-	-	Referencia	-	-	-
IV	-	-	-	-	2.4 (1.2-4.7)	0.014*	-	-
Mastectomía								
Realizada	Referencia	-	Referencia	-	Referencia	-	Referencia	-
No Realizada	2.7(1.3-5.5)	0.007*	3.6(1.6-7.7)	0.001*	2.3(1.3-4.1)	0.004*	1.9(1.1-3.5)	0.037*
Recurrencia								
No	Referencia	-	-	-	Referencia	-	-	-
Si	36.8(4.9-276.4)	<0.001*	-	-	36.8(4.9-276.4)	<0.001*	-	-
RT a SNC								
No	Referencia	-	Referencia	-	Referencia	-	Referencia	-
Si	3.73(1.9-7.3)	<0.001*	2.6(1.3-5.5)	0.007*	3.5(1.9-6.3)	<0.001*	2.4(1.3-4.5)	0.008*
Metástasis								
Ninguna	Referencia	-	-	-	Referencia	-	-	-
Visceral	3.2(1.5-6.8)	0.004*	-	-	2.6 (1.4-5.1)	0.004*	-	-
No Visceral	3.7(1.03-13.5)	0.045*	-	-	1.9 (0.5-6.5)	0.328	-	-
Ambas	3.3(1.2-9)	0.019*	-	-	2.9(1.2-7.1)	0.017*	-	-
Subtipos Moleculares								
No-IM	Referencia	-	Referencia	-	Referencia	-	Referencia	-
IM	0.3(0.1-0.8)	0.011*	0.3(0.1-0.9)	0.031*	0.3(0.1-0.7)	0.007*	0.4(0.2-0.9)	0.038*
Metástasis a Hueso								
No	Referencia	-	-	-	Referencia	-	-	-
Si	2.01(0.96-4.24)	0.065	-	-	1.6 (0.9-3)	0.124	-	-
Metástasis a Pulmón								
No	Referencia	-	-	-	Referencia	-	-	-
Si	1.91(1-3.7)	0.054	-	-	2.2 (1.2-3.8)	0.007*	-	-
Metástasis a Hígado								
No	Referencia	-	-	-	Referencia	-	-	-
Si	1.8(0.84-3.83)	0.13	-	-	2.3(1.3-4.1)	0.006*	-	-
Metástasis a SNC								
No	Referencia	-	-	-	Referencia	-	-	-
Si	4.74(2.3-9.8)	<0.001*	-	-	4.5 (2.3-8.5)	<0.001*	-	-

Supervivencia libre de recurrencia (SLR), Supervivencia global (SG), Hazard Ratio (HR), Radioterapia (RT), Sistema Nervioso Central (SNC), Inmunomodulador (IM); * $p < 0,05$.

5. Discusión

Aunque la inmunoterapia es actualmente una opción de tratamiento para los pacientes con CMTN en países desarrollados, los datos recientes demuestran que el beneficio parece limitado para los pacientes con PDL-1+ en el contexto de enfermedad avanzada y más recientemente en el escenario neoadyuvante (65,81,82). Sin embargo, dada la heterogeneidad de los tumores de CMTN (20,21), existe una necesidad de definir con precisión el subconjunto de pacientes que podrán ser beneficiados con inmunoterapia. La identificación de biomarcadores, especialmente con utilidad predictiva, puede ayudar a diseñar futuros ensayos clínicos. Aunque se han desarrollado varios clasificadores moleculares para delimitar la heterogeneidad de TNBC, ninguno se ha incorporado a la práctica clínica. Además, se ha sugerido seleccionar terapias de acuerdo con cada subtipo de CMTN (20,21,83). Desde entonces el subtipo IM se ha propuesto como un candidato potencial para inmunoterapia (22,84,85); es por ello que en este estudio nos centramos en el subtipo IM. En el cual, el 23.5% de nuestra cohorte de pacientes se clasificó dentro del subtipo IM.

Recientemente, Leisha y cols. informaron de un sub-análisis en el estudio IMPASSION 130 de acuerdo con tres subgrupos inmunitarios distintos: inflamado, excluido inmunitario y desierto. El fenotipo inmune inflamado se ha correlacionado con una mayor tasa de positividad de PD-L1+ en comparación con los fenotipos inmunes excluidos y desierto. Resultado que es similar a nuestros hallazgos. Los autores también informaron que hubo un beneficio en la supervivencia con la inmunoterapia (HR 0,63, IC del 95 %: 0,49-0,81), que no se observó en los fenotipos inmunes excluidos y desérticos (86) lo cual es alentador y motiva a un más los estudios de los subtipos inmunes de CMTN.

En este trabajo analizamos una cohorte de 68 pacientes con CMTN: 55 tuvieron una clasificación de Lehmann, 13 no pudieron ser categorizados por dicho algoritmo, por lo que permanecieron sin clasificar. Los clasificados se agruparon según su inmunomodulación, IM (n=16) y no-IM (n=39). Presentamos un análisis multiómico complementado con un análisis clínico que contrasta el comportamiento de los pacientes IM frente a los que no lo son, explorando genes codificadores de proteínas, ARN largos no codificantes intergénicos, TILs, tasas de mutación de ADN, patrones clínicos, histopatológicos y de supervivencia.

El análisis de la expresión génica de genes codificantes identificó una lista de 74 genes de expresión diferencial, todos regulados al alza en el subtipo IM cuando fueron contrastados con muestras no-IM. El análisis de enriquecimiento del conjunto de genes reveló la vía de la β -catenina con el 20 % de los genes de nuestra lista. Ya habiendo sido asociada con cáncer, la señalización de Wnt/ β -catenina interrumpe la inmunidad tumoral en la mayoría de los nódulos linfáticos, incluidas las células T y el ciclo de las células tumorales, lo que facilita el desarrollo del cáncer y previene la infiltración espontánea de células T en la mayoría de los cánceres humanos (87,88). Tanto la vía canónica como la no canónica de Wnt/ β -catenina son esenciales para el desarrollo de la glándula mamaria (89) y para el crecimiento y la diseminación del cáncer de mama (90). Un estudio reciente mostró que el inhibidor de β -catenina mejoró la infiltración de células T sin influir en su proliferación. Mientras tanto, su sobreexpresión suprimió la expresión de las quimiocinas CXCR3 reclutadoras de células T CXCL9/10/11 cambiando el microambiente tumoral a un fenotipo inflamado de células T que potencia la eficacia de otras estrategias inmunoterapéuticas (91). Esto sugiere que la señalización de Wnt/ β -catenina podría mejorar potencialmente los resultados clínicos de los pacientes con cáncer al superar la resistencia primaria, adaptativa y adquirida a la inmunoterapia (92). Por lo tanto, proponemos que la vía Wnt/ β -catenina se evalúe en futuros estudios que exploren el efecto del tratamiento en combinación con inmunoterapia.

La evidencia acumulada indica que los lncRNA son biomarcadores alentadores involucrados en la regulación de la expresión génica y la biología del cáncer (93). Como lncKLHDC7B, que participó como modulador transcripcional de señales proapoptóticas y evitó la migración celular y la invasividad (94). De acuerdo con la clasificación de Lehmann, exploramos estas moléculas no codificantes de proteínas a través de un análisis de expresión diferencial entre el subtipo IM y los subtipos no-IM. El análisis identificó siete lincRNA asociados con el subtipo CMTN-IM; este subtipo mostró un mejor pronóstico en comparación con los subtipos no-IM. Nuestro estudio demostró un patrón de expresión opuesto de la expresión de lncRNA entre el subtipo IM y el tipo mesenquimatoso, ambos implicados en la regulación inmune. En este sentido, las células MSL promueven la inflamación cuando el sistema inmunitario no está completamente activado o limitan la inflamación si el sistema inmunitario está abrumado mientras lucha contra el cáncer (95). De esos siete lincRNA, LINC01550 y LINC00426 se identificaron como reguladores de la oncogénesis en tumores que no son de

CM (96,97) y solo tres (LINC00173, LINC00861, LINC00312) se identificaron en CM (98–100). Sin embargo, encontramos evidencia de asociación en cuatro con respecto a la regulación inmune tumoral: LINC00426, LINC00173, LINC00861 y LINC00312. LINC00426 se ha asociado con un aumento en los TIL CD8+ y la infiltración de macrófagos M2 (101). Dos más, LINC00173 (102) y LINC00861, regulan las vías de señalización inmunitaria y los puntos de control inmunitarios, específicamente PD-1 y CTLA-4 (103); y como discutimos más adelante, CTLA-4 se encontró con alta expresión en el subtipo IM. La sobreexpresión de LINC00312 ha sido reportada como un inductor de agresividad en tumores (104) y se encontró que estaba regulada a la baja en el subtipo IM en nuestro estudio, por lo que podríamos asociar esta regulación a la baja con un buen pronóstico. Además, LINC00312 está asociado con la vía Wnt- β -catenina (105), que se enriqueció en el subtipo IM del análisis de genes codificantes, y LINC00173 también se ha informado como un regulador de la expresión de β -catenina (106). Además, LINC00861 (107) y LINC00312 (108) están asociados con la vía PI3K/AKT, que a su vez está asociada con la respuesta inmune (46). También encontramos dos nuevos lincRNA regulados al alza en el subtipo CMTN-IM LINC00854 y LINC00869, con poca o ninguna asociación con la enfermedad o función molecular. Por lo tanto, en conjunto, se sugiere están implicados en la respuesta inmune tumoral, sin embargo, se requieren más estudios para aclarar su participación en dichas vías de señalización.

Por otro lado, las tasas de mutación entre los subtipos IM y no-IM también mostraron diferencias sustanciales. Destacamos dos genes debido a su relevancia para la respuesta del sistema inmunitario y porque no se encontraron mutaciones en las muestras IM. Presentamos CTNNB1 (catenina β -1), un componente clave rip abajo de la vía de señalización canónica de Wnt (109–113); también se encontró relevante para explicar los resultados del análisis transcriptómico y discutir la regulación del microambiente inmune del tumor. Otras vías son las relacionadas con IDH1, la conversión anormal de 2-oxoglutarato a 2-hidroxiglutarato en el sistema inmunitario innato. Aunque este tipo de mutaciones puede hacer que una proteína sea más efectiva o defectuosa; fue notable que los subtipos no-IM mostraron un peor pronóstico comparado con el subtipo IM considerando solo genes relevantes en cáncer. Sin embargo se necesitan más estudios para aclarar la participación de estos genes en el medio inmunológico.

Con el objetivo principal de mejorar los avances en inmunoterapia para CMTN, en diversos estudios se han explorado los TILs y se han sido asociados con un mejor pronóstico y valor predictivo (40–43,59–64); sin embargo, todavía no está claro qué tipos de células inmunitarias contribuyen a obtener dichos resultados. En este sentido, nuestro estudio mostró una mayor cantidad de células FOXP3-TILs infiltradas tanto en *intT* como en *strml* en el subtipo IM. No obstante, tanto la infiltración de FOXP3-TILs como de CD8-TILs se han considerado dianas de inmunoterapia en tumores sólidos (114). Dada la alta infiltración de células FOXP3-TILs (Tregs) en el subtipo IM, al mismo tiempo, mostramos una tendencia hacia una infiltración alta de células CD8-TILs (Th1). Además, las células T reguladoras (Tregs) (115) se han asociado con un alto grado histológico, así como con una SG y sobrevida libre de enfermedad disminuidas en CMTN (116) principalmente a través de la participación del factor de crecimiento transformante (TGF- β) (117–119) producido por células tumorales y Tregs, lo que mejora la proliferación de Tregs y genera inmunosupresión en pacientes con CM que no responden a la inmunoterapia (120).

Sin embargo, el aumento del número de Tregs *intT* se ha asociado con el estado de los ganglios linfáticos y un mejor pronóstico (121). Ergo, a través de este estudio, demostramos que las células FOXP3-TILs (Tregs) son un buen factor de pronóstico a través del análisis de SLR y SG en el subtipo IM. Aunque tal pronóstico no se ha asociado con otros biomarcadores, su pronóstico favorable se confirmó en estudios previos (122). De esta manera, las Tregs trabajan mejorando el pronóstico tumoral asociado con las células Th17 (123) a través del TGF- β , lo que provoca la diferenciación al fenotipo Th17 de las células CD4 (Th2) (en presencia de IL-6) (124) y Tregs (125). Entonces, las células Th17 pueden adquirir características similares a las de Th1 (células ex-Th17 o células Th1 no clásicas) después de la activación, mejorando la inmunidad antitumoral mediante señales proinflamatorias (126). El hecho de que las células Th17 promuevan o inhiban el desarrollo del cáncer depende del tumor (127). Por lo tanto, sugerimos la participación de la respuesta Th17 en el subtipo IM debido a la baja infiltración de la respuesta Th1 clásica, que se esperaba que condujera tal comportamiento en nuestro estudio. Un estudio metagenómico reciente encontró que Th17 altos se asociaron con un buen pronóstico en CMTN (128). De esta manera, las células Th17 pueden causar la regresión tumoral de manera más eficiente que las células Th1 a través de una mejor memoria efectora (129–132) y sinergizar con las

células T CD8⁺ (133,134), lo que explica la tendencia de infiltración de las células T CD8⁺ en el subtipo IM en este estudio. Por otro lado, la ciclofosfamida reduce las Tregs y aumenta las respuestas Th1 y Th2 (135,136). Aquí el 50% de la población recibió el fármaco, y no se observó respuesta Th1 ni Th2, estableciendo la participación de otros linajes de células inmunitarias como el eje Tregs/Th17 regulado por TGF- β como se ha documentado previamente (137–139), reforzando que otras subpoblaciones de células T más allá las respuestas Th1, Th2 y Tregs pueden controlar el comportamiento tumoral, en este estudio en específico, del subtipo IM.

Por otro lado, para ofrecer ICI para CMTN, se evaluó inicialmente la expresión de ICp (140). Encontramos una alta expresión de PD-L1 y CTLA-4 en células T *intT* y *strml* del subtipo IM y una tendencia hacia una alta expresión de PD-1 en la infiltración *intT*, lo que demuestra el potencial de IM como candidato para inmunoterapia (20,83). Aunque la importancia clínica de la ICp todavía se está revisando en el TNBC, la expresión de PD-1 (141–143) se ha relacionado con la expresión de PD-L1 (144). No obstante, las expresiones de PD-1 y PD-L1 se han considerado como biomarcadores predictores de la respuesta a la inmunoterapia en el CMTN (145).

Dada la alta expresión de ICp en el subtipo IM, la expresión de *strml* PD-L1 en células inmunes y la tinción positiva para CTLA-4 se asociaron con una menor mortalidad (145). Asimismo, en nuestro estudio, el subtipo IM tuvo una SG más prolongada. Además, los niveles de tinción de ICps en CMTN no están bien establecidos y varían entre los estudios. Se informó que la positividad de PD-L1 estaba entre el 19% y el 64% (46,47,146). Aquí, observamos 20% de muestras tumorales positivas para PD-L1, 30% de *intT* CTLA-4 y 9% de expresión de *strml* CTLA-4 en el subtipo IM. De acuerdo con nuestros resultados, se encontraron altos niveles de expresión de ARNm de ICp en el subtipo IM (54).

Se han asociado acontecimientos adversos particulares con la inmunoterapia (147); a veces, sin un beneficio clínico claro, especialmente con ipilimumab (Anti-CTLA-4), donde las toxicidades se han correlacionado con la respuesta antitumoral (148,149). Sin embargo, las células Th17 y la IL-17 podrían desempeñar un papel esencial en la eficacia y toxicidad de las ICI (150,151). Ese es el punto de tener en cuenta las células Th17 para estudios posteriores. En este documento, observamos una alta positividad de la tinción CTLA-4 en

pacientes con IM, lo que nos lleva a proponerlo como un tratamiento potencial para pacientes con CMTN-IM. Estudios posteriores son necesarios para esclarecer dicha participación en cáncer.

5.1 Limitaciones del estudio

Este estudio está limitado por el tamaño de la muestra, la naturaleza retrospectiva, unicéntrica y los datos de una cohorte de pacientes no tratados con inmunoterapia. El tamaño de la muestra también impide realizar un análisis de subconjunto de la asociación de los niveles de TILs y las puntuaciones de la firma inmunitaria con las características clínicas y mutaciones puntuales. Además, el uso de TMA puede incorporar algún sesgo; sin embargo, intentamos evitarlo tomando muestras de tres regiones representativas de cada tumor. Finalmente, se necesita la validación de estos resultados no solo a nivel retrospectivo a través de aumentar la cohorte, sino también prospectivo para corroborar los hallazgos aquí presentados y agilizar su traslación a la clínica con el objetivo de proporcionar más opciones terapéuticas a las pacientes con perfiles moleculares aquí descritos.

6. Conclusiones

1. Se incluyeron un total de 68 pacientes con CMTN con una mediana de edad de 49.5 años en el momento del diagnóstico.
2. De los 68 pacientes incluidos en este estudio 14 (24,6%) tuvieron RpC y 43 (75,4%) se fueron sometidos a mastectomía radical modificada.
3. 55 se clasificaron entre los subtipos IM y no-IM. El subtipo IM fue el más común en nuestra cohorte de pacientes, encontrándose en 16/68 (23,5%) de las muestras examinadas, seguido de los subtipos BL1 y BL2 encontrados en el 20% de los casos.
4. Observamos una mayor infiltración *intT* de CD8-TILs (Th1) en el subtipo IM, 20% (95 % IC, 9.4-38.6) frente al 10% (IC 95%, 7.16-15.45), en comparación con el subtipo no-IM, $p=0.058$.
5. Las células FOXP3-TILs mostraron diferencias estadísticas entre los subtipos IM y no-IM, en ambos, 15% *intT* (95% CI, 8.49-23.21; $p=0.004$) y 40% *strml* (95% CI, 26.80-58.27; $p=0.001$).

6. Mostramos una tendencia hacia un mayor infiltrado intT de TILs PD-1+, 10% (95% CI, 4.07-16.54) en el subtipo IM versus 2% en el subtipo no-IM (95% CI, 2.13-7.10), $p=0,051$.
7. PD-L1 fue significativamente mayor en tumores IM (20% [IC 95%, 7,83-43,42]) que tumores no-IM (5% [IC del 95%, 2,57-11,98; $p=0,004$]).
8. Para TILs CTLA-4+, se evaluó la tinción *intT* y *strml*, y ambas fueron mayores en el subtipo IM (9%; IC del 95%, 5,89-19,8) y (30%; IC del 95%, 13,18-36,07), en comparación con [3%, IC del 95%, (2,4-4,6); $p<0,001$] y [8%, IC del 95%, (6,99-12,76); $p=0,006$], respectivamente.
9. Se encontraron 74 genes con expresión diferencial (DEG) al comparar muestras IM versus no IM
10. El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de los genes expresados en el grupo de IM, identificó procesos biológicos asociados con el sistema inmunológico
11. El análisis de vías de señalización, muestra el enriquecimiento de la vía de señalización de la β -catenina en el 16% de los genes que identificamos como expresados diferencialmente.
12. 7 lncRNAs fueron encontrados expresados diferencialmente [6 regulados al alza (-) y 1 regulado a la baja (\square)] basados en $|FC| > 2$ y un valor $p < 0.006$ (LINC00173-, LINC00854-, LINC00869-, LINC00426-, LINC00861-, LINC01550-, LINC00312 \square) (**Tabla 6**).
13. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para evaluar el efecto de los 7 ARN largos no codificantes intergénicos, los cuales separan el subtipo IM del resto de los subtipos.
14. Encontramos 5 genes libres de mutaciones (GNAS, CTNNB1, IDH1, IDH2, MYOD1) y dos que podrían ser biomarcadores potenciales para inmunoterapia en CMTN; CTNNB1 (Catenina beta-1) e IDH1. Para IDH, no se encontraron mutaciones para las muestras IM y el 50% de las muestras no-IM tenían este gen mutado. Para el caso de IDH2, no se encontraron mutaciones en muestras del grupo IM y un 28% en las muestras no-IM; todos menos uno eran intrónicos y el otro era una mutación sin sentido.
15. Las variables clínicas y patológicas asociadas con el subtipo de IM incluyeron invasión vascular y baja probabilidad de metástasis a pulmón, hígado y sistema nervioso central.

16. El subtipo IM tuvo el pronóstico más favorable en la construcción de las gráficas de supervivencia global y supervivencia libre de progresión.
17. Después de ajustar por factores significativos en el análisis univariado, el subtipo de IM influyó positivamente en la SLR y la SG en pacientes con CMTN, lo que representa un factor protector.

7. Bibliografía

1. Zhang J, Wang Z, Hu X, Wang B, Wang L, Yang W, et al. Cisplatin and gemcitabine as the first line therapy in metastatic triple negative breast cancer. *Int J Cancer*. 2015;136(1):204–11.
2. Foulkes W, Smith I, Reis-Filho J. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(20):1938–48.
3. Lara-Medina F, Pérez-Sánchez V, Saavedra-Pérez 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.
4. Balic M, Thomssen C, Würstlein R, Gnant M, Harbeck N. St. Gallen/Vienna 2019: A brief summary of the consensus discussion on the optimal primary breast cancer treatment. *Breast Care*. 2019;14(2):103–10.
5. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsy P, Gnant M, Poortmans P, et al. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: The St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Ann Oncol* [Internet]. 2019;30(10):1541–57. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz235>
6. O'Reilly EA, Gubbins L, Sharma S, Tully R, Guang MHZ, Weiner-Gorzal K, et al. The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clin*. 2015;3:257–75.
7. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13(15):4429–34.
8. Cossetti RJD, Tyldesley SK, Speers CH, Zheng Y, Gelmon KA. Comparison of breast cancer recurrence and outcome patterns between patients treated from 1986 to 1992

and from 2004 to 2008. *J Clin Oncol*. 2014;33(1):65–73.

9. Howlader N, Cronin KA, Kurian AW, Andridge R. Differences in breast cancer survival by molecular subtypes in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27(6):619–26.
10. Zhang FL, Cao JL, Xie HY, Sun R, Yang LF, Shao ZM, et al. Cancer-associated MORC2-mutant M276I regulates an hnRNPM-mediated CD44 splicing switch to promote invasion and metastasis in triple-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2018;78(20):5780–92.
11. Liu YR, Jiang YZ, Xu XE, Yu K Da, Jin X, Hu X, et al. Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2016;18(1):1–10.
12. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(4):304–11.
13. ..., Rosner J, Lai D, Birol I, Varhol R, Tam A, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* [Internet]. 2012; Available from: <https://www.nature.com/articles/nature10933>
14. Turner NC, Reis-Filho JS. Tackling the diversity of Triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(23):6380–8.
15. Telli ML, Stover DG, Loi S, Aparicio S, Carey LA, Domchek SM, et al. Homologous recombination deficiency and host anti-tumor immunity in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2018;171(1):21–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-018-4807-x>
16. Koren S, Bentires-Alj M. Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy. *Mol Cell* [Internet]. 2015;60(4):537–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.031>

17. Hoadley KA, Siegel MB, Kanchi KL, Miller CA, Ding L, Zhao W, et al. Tumor Evolution in Two Patients with Basal-like Breast Cancer: A Retrospective Genomics Study of Multiple Metastases. *PLoS Med.* 2016;13(12):1–20.
18. Gao R, Davis A, McDonald TO, Sei E, Shi X, Wang Y, et al. Punctuated copy number evolution and clonal stasis in triple-negative breast cancer. *Nat Genet.* 2016;48(10):1119–30.
19. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(8):1275–81.
20. 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.
21. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Fuqua SAW, Savage MI, et al. Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-negative Breast Cancer Matthew. 2016;21(7):1688–98.
22. Wang DY, Jiang Z, Ben-David Y, Woodgett JR, Zacksenhaus E. Molecular stratification within triple-negative breast cancer subtypes. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–10.
23. Vinayak S, Gray RJ, Adams S, Jensen KC, Manola J, Afghahi A, et al. Association of increased tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) with immunomodulatory (IM) triple-negative breast cancer (TNBC) subtype and response to neoadjuvant platinum-based therapy in PrECOG0105. *J Clin Oncol.* 2014;32(15_suppl):1000–1000.
24. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell [Internet].* 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
25. de Visser KE, Coussens LM. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Contrib Microbiol.* 2006;13:118–37.
26. Borcherding N, Kolb R, Gullicksrud J, Vikas P, Zhu Y, Zhang W. Keeping Tumors in Check: A Mechanistic Review of Clinical Response and Resistance to Immune

Checkpoint Blockade in Cancer. *J Mol Biol.* 2018;430(14):2014–29.

27. Van Der Burg SH, Arens R, Ossendorp F, Van Hall T, Melief CJM. Vaccines for established cancer: Overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(4):219–33.
28. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: From TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(4):228–41.
29. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(11):836–48.
30. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(1):105–13.
31. Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(8):2796–801.
32. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):486–99.
33. Loi S. Tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer subtypes and therapeutic efficacy. *Oncoimmunology.* 2013;(July):13–5.
34. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol.* 2013;31(7):860–7.
35. Balko JM, Giltnane JM, Wang K, Schwarz LJ, Christian D, Cook RS, et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov.*

2014;4(2):232–45.

36. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018;19(1):40–50.
37. Santoni M, Romagnoli E, Saladino T, Foghini L, Guarino S, Capponi M, et al. Triple negative breast cancer: Key role of Tumor-Associated Macrophages in regulating the activity of anti-PD-1/PD-L1 agents. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2018;1869(1):78–84.
38. Hu-Lieskovan S, Mok S, Homet Moreno B, Tsoi J, Robert L, Goedert L, et al. Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAFV600E melanoma. *Sci Transl Med.* 2015;7(279):139–48.
39. Kakavand H, Wilmott JS, Menzies AM, Vilain R, Haydu LE, Yearley JH, et al. PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes define different subsets of MAPK inhibitor-treated melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 2015;21(14):3140–8.
40. Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8 +lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012;14(2):R48.
41. Baker K, Lachapelle J, Zlobec I, Bismar TA, Terracciano L, Foulkes WD. Prognostic significance of CD8+ T lymphocytes in breast cancer depends upon both oestrogen receptor status and histological grade. *Histopathology.* 2011;58(7):1107–16.
42. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AHS, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):1949–55.
43. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Chan M, Hirakawa H, Suzuki A, et al. Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in triple-negative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast*

Cancer Res Treat. 2014;148(3):525–34.

44. Bai YG, Gao GX, Zhang H, Zhang S, Liu YH, Duan XN, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocyte subtypes in residual tumors of patients with triple-negative breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133(5):552–60.
45. Jafarian AH, Tasbandi A, Gilan H, Sheikhi M, Roshan NM. Evaluation of CD30/CD4/CD8 in triple-negative invasive ductal carcinoma of breast in association with clinicopathological prognostic factors. *Indian J Pathol Microbiol*. 2018;61(4):500–4.
46. Mittendorf E, Philips A, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(4):361–70.
47. Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N, et al. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(12):2965–70.
48. Savas P, Virassamy B, Ye C, Salim A, Mintoff CP, Caramia F, et al. Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. *Nat Med*. 2018;24(7):986–93.
49. Althobiti M, Aleskandarany MA, Joseph C, Toss M, Mongan N, Diez-Rodriguez M, et al. Heterogeneity of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer and its prognostic significance. *Histopathology*. 2018;73(6):887–96.
50. Ochi T, Bianchini G, Ando M, Nozaki F, Kobayashi D, Criscitiello C, et al. Predictive and prognostic value of stromal tumour-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy in triple negative and HER2-positive breast cancer. *Eur J Cancer*. 2019;118:41–8.
51. Tomioka N, Azuma M, Ikarashi M, Yamamoto M, Sato M, Watanabe K ichi, et al.

- The therapeutic candidate for immune checkpoint inhibitors elucidated by the status of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in triple negative breast cancer (TNBC). *Breast Cancer*. 2018;25(1):34–42.
52. Peng Z, Su P, Yang Y, Yao X, Zhang Y, Jin F, et al. Identification of CTLA-4 associated with tumor microenvironment and competing interactions in triple negative breast cancer by co-expression network analysis. *J Cancer*. 2020;11(21):6365–75.
 53. Sun S, Fei X, Mao Y, Wang X, Garfield DH, Huang O, et al. PD-1+ immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(4):395–406.
 54. Jiang YZ, Ma D, Suo C, Shi J, Xue M, Hu X, et al. Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies. *Cancer Cell*. 2019;35(3):428-440.e5.
 55. Yousefi H, Yuan J, Keshavarz-Fathi M, Murphy JF, Rezaei N. Immunotherapy of cancers comes of age. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017;13(10):1001–15.
 56. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells. *Sci Transl Med*. 2013;5(200):1–21.
 57. Gajewski T, Zha Y, Thurner B, Schuler G. Association of gene expression profile in metastatic melanoma and survival to a dendritic cell-based vaccine. *J Clin Oncol*. 2009;27(15_suppl):9002–9002.
 58. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (80-)*. 2011;331(6024):1565–70.
 59. Bai S, Yang X, Zhang N, Zhang F, Shen Z, Yang N, et al. [Function of tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors - a review]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2019;35(12):2308–25.
 60. Disis ML, Stanton SE. Triple-Negative Breast Cancer: Immune Modulation as the New Treatment Paradigm. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2015;(35):e25–30.

61. Dieci M V., Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: A retrospective multicenter study. *Ann Oncol.* 2014;25(3):611–8.
62. Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(3):793–805.
63. Karn T, Pusztai L, Rody A, Holtrich U, Becker S. The Influence of Host Factors on the Prognosis of Breast Cancer: Stroma and Immune Cell Components as Cancer Biomarkers. *Curr Cancer Drug Targets.* 2015;15(8):652–64.
64. Stagg J, Allard B. Immunotherapeutic approaches in triple-negative breast cancer: Latest research and clinical prospects. *Ther Adv Med Oncol.* 2013;5(3):169–81.
65. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(22):2108–21.
66. J C, DW C, HS R, Z N, SA I, MM Y, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355). *Lancet.* 2020;
67. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2020;382(9):810–21.
68. Mittendorf EA, Zhang H, Barrios CH, Saji S, Jung KH, Hegg R, et al. Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet.* 2020;396(10257):1090–100.
69. Bernier C, Soliman A, Gravel M, Dankner M, Savage P, Petrecca K, et al. DZ-2384 has a superior preclinical profile to taxanes for the treatment of triple-negative breast

cancer and is synergistic with anti-CTLA-4 immunotherapy. *Anticancer Drugs*. 2018;29(8):774–85.

70. Bautista RR, Gómez AO, Miranda AH, Dehesa AZ, Villarreal-Garza C, Ávila-Moreno F, et al. Correction: Long non-coding RNAs: Implications in targeted diagnoses, prognosis, and improved therapeutic strategies in human non- and triple-negative breast cancer. [*Clin Epigenetics*., 10, 1, (2018) (88)] DOI: 10.1186/s13148-018-0514-z. *Clin Epigenetics*. 2018;10(1):1–15.
71. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* (80-). 2006;313(5795):1960–4.
72. Wein L, Savas P, Luen SJ, Virassamy B, Salgado R, Loi S. Clinical validity and Utility of Tumor-infiltrating lymphocytes in routine clinical practice for breast cancer patients: Current and future directions. *Front Oncol*. 2017;7(AUG):156.
73. Chen X, Li J, Gray WH, Lehmann BD, Bauer JA, Shyr Y, et al. TNBCtype: A subtyping tool for triple-negative breast cancer. *Cancer Inform*. 2012;11:147–56.
74. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(7):e47.
75. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B*. 1995;57(1):289–300.
76. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILS) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259–71.
77. Vassilakopoulou M, Parisi F, Siddiqui S, England AM, Zarella ER, Anagnostou V, et al. Preanalytical variables and phosphoepitope expression in FFPE tissue: Quantitative epitope assessment after variable cold ischemic time. *Lab Investig*. 2015;95(3):334–

- 41.
78. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–20.
79. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297–303.
80. Skidmore ZL, Wagner AH, Lesurf R, Campbell KM, Kunisaki J, Griffith OL, et al. GenVisR: Genomic Visualizations in R. *Bioinformatics*. 2016;32(19):3012–4.
81. Adams S, Schmid P, Rugo HS, Winer EP, Loirat D, Awada A, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: Cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*. 2019;30(3):397–404.
82. Emens LA, Cruz C, Eder JP, Braiteh F, Chung C, Tolaney SM, et al. Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. *JAMA Oncol*. 2019;5(1):74–82.
83. Zhao S, Ma D, Xiao Y, Li X, Ma J, Zhang H, et al. Molecular Subtyping of Triple-Negative Breast Cancers by Immunohistochemistry: Molecular Basis and Clinical Relevance . *Oncologist*. 2020;25(10).
84. Wellenstein MD, de Visser KE. Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. *Immunity*. 2018;48(3):399–416.
85. Elfgren C, Varga Z, Reeve K, Moskovszky L, Bjelic-Radisic V, Tausch C, et al. The impact of distinct triple-negative breast cancer subtypes on misdiagnosis and diagnostic delay. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;177(1):67–75.
86. Emens LA, Goldstein LD, Schmid P, Rugo HS, Adams S, Barrios CH, et al. The tumor microenvironment (TME) and atezolizumab + nab -paclitaxel (A+nP) activity in metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): IMpassion130. . *J Clin Oncol*. 2021;39(15_suppl):1006–1006.

87. Li X, Xiang Y, Li F, Yin C, Li B, Ke X. WNT/ β -catenin signaling pathway regulating T cell-inflammation in the tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2019;10(SEP).
88. Wang B, Tian T, Kalland KH, Ke X, Qu Y. Targeting Wnt/ β -Catenin Signaling for Cancer Immunotherapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2018;39(7):648–58.
89. Yu QC, Verheyen EM, Zeng YA. Mammary development and breast cancer: A Wnt perspective. *Cancers (Basel).* 2016;8(7).
90. Katoh M. Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (Review). *Int J Oncol.* 2017;51(5):1357–69.
91. Kwee SA, Tiirikainen M. Beta-catenin activation and immunotherapy resistance in hepatocellular carcinoma: Mechanisms and biomarkers. *Hepatoma Res.* 2021;7.
92. Morin PJ, Kinzler KW, Sparks AB. β -Catenin mutations: Insights into the APC pathway and the power of genetics. *Cancer Res.* 2016;76(19):5587–9.
93. Rodríguez Bautista R, Ortega Gómez A, Hidalgo Miranda A, Zentella Dehesa A, Villarreal-Garza C, Ávila-Moreno F, et al. Long non-coding RNAs: Implications in targeted diagnoses, prognosis, and improved therapeutic strategies in human non- and triple-negative breast cancer. *Clin Epigenetics.* 2018;10(1):1–15.
94. Beltrán-Anaya FO, Romero-Córdoba S, Rebollar-Vega R, Arrieta O, Bautista-Piña V, Dominguez-Reyes C, et al. Expression of long non-coding RNA ENSG00000226738 (LncKLHDC7B) is enriched in the immunomodulatory triple-negative breast cancer subtype and its alteration promotes cell migration, invasion, and resistance to cell death. *Mol Oncol.* 2019;13(4):909–27.
95. Koliaraki V, Prados A, Armaka M, Kollias G. The mesenchymal context in inflammation, immunity and cancer. *Nat Immunol.* 2020;21(9):974–82.
96. Li H, Mu Q, Zhang G, Shen Z, Zhang Y, Bai J, et al. Linc00426 accelerates lung adenocarcinoma progression by regulating miR-455-5p as a molecular sponge. *Cell Death Dis.* 2020;11(12).

97. Chen J, Li P, Chen Z, Wang S, Tang S, Chen X, et al. Elevated LINC01550 induces the apoptosis and cell cycle arrest of melanoma. *Med Oncol.* 2021;38(4).
98. Fan H, Yuan J, Li X, Ma Y, Wang X, Xu B, et al. LncRNA LINC00173 enhances triple-negative breast cancer progression by suppressing miR-490-3p expression. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020;125(February):109987. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109987>
99. Zhang Y, Li Y, Wang Q, Zhang X, Wang D, Tang HC, et al. Identification of an incRNA-miRNA-mRNA interaction mechanism in breast cancer based on bioinformatic analysis. *Mol Med Rep.* 2017;16(4):5113–20.
100. Chen Y, Qiu F, Huang L, Liu W, Li L, Ji C, et al. Long non-coding RNA LINC00312 regulates breast cancer progression through the miR-9/CDH1 axis. *Mol Med Rep.* 2020;21(3):1296–303.
101. Li W, Xu C, Guo J, Liu K, Hu Y, Wu D, et al. Cis- and Trans-Acting Expression Quantitative Trait Loci of Long Non-Coding RNA in 2,549 Cancers With Potential Clinical and Therapeutic Implications. *Front Oncol.* 2020;10.
102. Yang Q, Tang Y, Tang C, Cong H, Wang X, Shen X, et al. Diminished LINC00173 expression induced miR-182-5p accumulation promotes cell proliferation, migration and apoptosis inhibition via AGER/NF- κ B pathway in non-small-cell lung cancer. *Am J Transl Res* [Internet]. 2019;11(7):4248–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31396332> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6684891>
103. Hu W, Wang Y, Fang Z, He W, Li S. Integrated Characterization of lncRNA-Immune Interactions in Prostate Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9.
104. Peng Z, Wang J, Shan B, Li B, Peng W, Dong Y, et al. The long noncoding RNA LINC00312 induces lung adenocarcinoma migration and vasculogenic mimicry through directly binding YBX1. *Mol Cancer.* 2018;17(1):1–6.
105. Sun X jie, Wang Q, Guo B, Liu X ying, Wang B. Identification of skin-related

- lncRNAs as potential biomarkers that involved in Wnt pathways in keloids. *Oncotarget*. 2017;8(21):34236–44.
106. Li Q, Chen X, Chen L, Yan H, Li J. LINC00173 promotes the apoptosis of hypertrophic scar fibroblasts through increasing β -catenin expression. *Mol Cell Biochem*. 2021;476(2):1005–14.
 107. Liu H, Zhang L, Ding X, Sui X. LINC00861 inhibits the progression of cervical cancer cells by functioning as a ceRNA for miR-513b-5p and regulating the PTEN/AKT/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2021;23(1).
 108. Guo Z, Wang YH, Xu H, Yuan CS, Zhou HH, Huang WH, et al. LncRNA linc00312 suppresses radiotherapy resistance by targeting DNA-PKcs and impairing DNA damage repair in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis*. 2021;12(1).
 109. Yu Y, Wu J, Wang Y, Zhao T, Ma B, Liu Y, et al. Kindlin 2 forms a transcriptional complex with β -catenin and TCF4 to enhance Wnt signalling. *EMBO Rep*. 2012;13(8):750–8.
 110. Genovese G, Ghosh P, Li H, Rettino A, Sioletic S, Cittadini A, et al. The tumor suppressor HINT1 regulates MITF and β -catenin transcriptional activity in melanoma cells. *Cell Cycle*. 2012;11(11):2206–15.
 111. Satow R, Shitashige M, Jigami T, Fukami K, Honda K, Kitabayashi I, et al. B-Catenin Inhibits Promyelocytic Leukemia Protein Tumor Suppressor Function in Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology*. 2012;142(3):572–81.
 112. Fiset A, Xu E, Bergeron S, Marette A, Pelletier G, Siminovitch KA, et al. Compartmentalized CDK2 is connected with SHP-1 and β -catenin and regulates insulin internalization. *Cell Signal*. 2011;23(5):911–9.
 113. Li H, Ray G, Yoo BH, Erdogan M, Rosen K V. Down-regulation of death-associated protein kinase-2 is required for β -catenin-induced anoikis resistance of malignant epithelial cells. *J Biol Chem*. 2009;284(4):2012–22.
 114. Zhu M, Burugu S, Gao D, Yu J, Kos Z, Leung S, et al. Evaluation of glucocorticoid-

induced TNF receptor (GITR) expression in breast cancer and across multiple tumor types. *Mod Pathol.* 2020;2(55):1753–63.

115. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3⁺ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer.* 2008;122(10):2286–93.
116. Liu F, Lang R, Zhao J, Zhang X, Pringle GA, Fan Y, et al. CD8⁺ cytotoxic T cell and FOXP3⁺ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(2):645–55.
117. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, et al. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4⁺CD25⁺ human thymocytes. *J Exp Med.* 2002;196(3):379–87.
118. W C, SM W. TGF-beta: the missing link in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev.*
119. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *J Exp Med.* 2001;194(5):629–44.
120. Domschke C, Schneeweiss A, Stefanovic S, Wallwiener M, Heil J, Rom J, et al. Cellular Immune Responses and Immune Escape Mechanisms in Breast Cancer: Determinants of Immunotherapy. *Breast Care.* 2016;11(2):102–7.
121. Bareche Y, Buisseret L, Gruosso T, Girard E, Venet D, Dupont F, et al. Unraveling Triple-Negative Breast Cancer Tumor Microenvironment Heterogeneity: Towards an Optimized Treatment Approach. *J Natl Cancer Inst.* 2020;112(7):708–19.
122. Yeong J, Thike AA, Lim JCT, Lee B, Li H, Wong SC, et al. Higher densities of Foxp3⁺ regulatory T cells are associated with better prognosis in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;163(1):21–35.
123. Oldenhove G, De Heusch M, Urbain-Vansanten G, Urbain J, Maliszewski C, Leo O, et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign

- antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2003;198(2):259–66.
124. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med*. 2006;203(12):2715–25.
 125. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Pappu BP, Shah B, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008;29(1):44–56.
 126. Lee Y, Turner H, Maynard C, Oliver J, Chen D, Elson C, et al. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*. 2009;30(1):92–107.
 127. Horlock C, Stott B, Dyson PJ, Morishita M, Coombes RC, Savage P, et al. The effects of trastuzumab on the CD4CD25FoxP3 and CD4IL17A T-cell axis in patients with breast cancer. *Br J Cancer*. 2009;100(7):1061–7.
 128. Fauchoux L, Grandclaude M, Perrot-Dockès M, Sirven P, Berger F, Hamy AS, et al. A multivariate Th17 metagene for prognostic stratification in T cell non-inflamed triple negative breast cancer. *Oncoimmunology* [Internet]. 2019;8(9):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1624130>
 129. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*. 2008;112(2):362–73.
 130. Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, Roychoudhuri R, et al. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity*. 2011;35(6):972–85.
 131. Paulos C, Carpenito C, Plesa G, Suhoski M, Varela-Rohena A, Golovina T, et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci Transl Med*. 2010;2(55):55ra78.
 132. Kryczek I, Zhao E, Liu Y, Wang Y, Vatan L, Szeliga W, et al. Human TH17 cells are long-lived effector memory cells. *Sci Transl Med*. 2011;3(104):104ra100.

133. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, et al. T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity*. 2009;31(5):787–98.
134. Xie Y, Akpınarlı A, Maris C, Hipkiss EL, Lane M, Kwon EKM, et al. Naive tumor-specific CD4⁺ T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J Exp Med*. 2010;207(3):651–67.
135. Loeffler M, Krüger JA, Reisfeld RA. Immunostimulatory effects of low-dose cyclophosphamide are controlled by inducible nitric oxide synthase. *Cancer Res*. 2005;65(12):5027–30.
136. Lutsiak MEC, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SVS, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4⁺25⁺ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*. 2005;105(7):2862–8.
137. Chakraborty NG, Chattopadhyay S, Mehrotra S, Chhabra A, Mukherji B. Regulatory T-cell response and tumor vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes in human melanoma. *Hum Immunol*. 2004;65(8):794–802.
138. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, Von Boehmer H, et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(2):419–24.
139. Coffman RL. Origins of the TH1-TH2 model: A personal perspective. *Nat Immunol*. 2006;7(6):539–41.
140. Webb ES, Liu P, Baleeiro R, Lemoine NR, Yuan M, Wang Y. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer. *Immune Checkp Inhib Cancer*. 2019;32(5):317–26.
141. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased tils and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2014;20(10):2773–82.
142. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: From discovery to clinical application. *Int Immunol*. 2007;19(7):813–24.

143. Muenst S, Schaerli AR, Gao F, Däster S, Trella E, Droeser RA, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;146(1):15–24.
144. Ren X, Wu H, Lu J, Zhang Y, Luo Y, Xu Q, et al. PD1 protein expression in tumor infiltrated lymphocytes rather than PDL1 in tumor cells predicts survival in triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 2018;19(5):373–80.
145. Hutchinson KE, Yost SE, Chang CW, Johnson RM, Carr AR, McAdam PR, et al. Comprehensive profiling of poor-risk paired primary and recurrent triple-negative breast cancers reveals immune phenotype shifts. *Clin Cancer Res.* 2020;26(3):657–68.
146. Beckers RK, Selinger CI, Vilain R, Madore J, Wilmott JS, Harvey K, et al. Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathology.* 2016;69(1):25–34.
147. Hassel JC, Heinzerling L, Aberle J, Bähr O, Eigentler TK, Grimm MO, et al. Combined immune checkpoint blockade (anti-PD-1/anti-CTLA-4): Evaluation and management of adverse drug reactions. *Cancer Treat Rev [Internet].* 2017;57:36–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.05.003>
148. Di Giacomo AM, Biagioli M, Maio M. The emerging toxicity profiles of antiCTLA-4 antibodies across clinical indications. *Semin Oncol [Internet].* 2010;37(5):499–507. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2010.09.007>
149. Sznol M, Ferrucci PF, Hogg D, Atkins MB, Wolter P, Guidoboni M, et al. Pooled analysis safety profile of nivolumab and ipilimumab combination therapy in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 2017;35(34):3815–22.
150. Esfahani K, Miller WH. Reversal of Autoimmune Toxicity and Loss of Tumor Response by Interleukin-17 Blockade. *N Engl J Med.* 2017;376(20):1989–91.
151. Krieg C, Nowicka M, Guglietta S, Schindler S, Hartmann FJ, Weber LM, et al. High-

dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. Nat Med. 2018;24(2):144–53.